



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA**

**Avaliação da concentração de Interferon-gama em
pacientes com Tuberculose pulmonar e contatos diretos,
por Quantiferon TB Gold (In tube method)**

EDUARDO BENTES SANTANA FILHO

**MANAUS – AM
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



Avaliação da concentração de Interferon-gama em pacientes com Tuberculose pulmonar e contatos diretos, por Quantiferon TB Gold (In tube method)

EDUARDO BENTES SANTANA FILHO

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da
Universidade Federal do Amazonas
Como parte dos créditos para
obtenção do título de Mestre**

Orientadora: Prof^a. Dra. Aya Sadahiro

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Júlia Ignez do Nascimento Salem José

**MANAUS – AM
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



Candidato: Eduardo Bentes Santana Filho

Título da dissertação: Avaliação da concentração de Interferon-gama em pacientes com Tuberculose pulmonar e contatos diretos, por Quantiferon TB Gold (In tube method)

Orientador(a): Professora Doutora Aya Sadahiro

Co-orientador(a): Prof^a. Dra. Júlia Ignez do Nascimento Salem José

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa da dissertação de mestrado, em sessão pública realizada a/...../2012, considerou o candidato:

() Aprovado

() Não aprovado

Professora doutora Aya Sadahiro (UFAM)
(Presidente)

Professor doutor Sandro Rogério de Almeida (USP)
(Membro titular)

Professor doutor Felipe Gomes Naveca (FIOCRUZ-AM)
(Membro titular)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Eduardo Bentes e Zenaide Silva que não pouparam esforços para eu concluir minha graduação e pós-graduação e que me acompanham até hoje.

A minha namorada Daniella Venâncio pelo apoio e compreensão, a minha irmã Thaise por todo empenho e dedicação que me permitiram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter colocado na minha vida tantas pessoas especiais durante essa caminhada.

À minha orientadora, Dra Aya Sadahiro, pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela inestimável ajuda e compreensão durante o período que sofri um acidente e precisei passar por cirurgia.

Aos pacientes e os seus contatos pela importante participação neste projeto.

À Dra Júlia Salem, Mauricio M. Ogusku, Luciana B. M. Fujimoto, João Vicente B. de Souza pelas preciosas sugestões e ajuda na elaboração do artigo científico.

Aos Funcionários e colaboradores do laboratório de micobacteriologia do INPA, Francisco, Rai, Rosalvo, Thaís, Mônica, Ana Paula, Alita, Márcia, Andrezza, pela amizade e colaboração em diferentes etapas do projeto.

À Dra Irineide A. Antunes da Policlínica em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes por abrir espaço à pesquisa e pela contribuição para minha vida profissional.

Aos Funcionários da Policlínica em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes pela ajuda no recrutamento dos pacientes, em especial a Dulcilene Castro, Elenilda Rodrigues, Joyce Matsuda, Irene Maia, Maria de Lourdes, Kleiton Rebouças, Milena Cordeiro pela ajuda valiosa no meu projeto.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica (PPGIBA) da UFAM pela formação intelectual e pessoal oferecidas aos alunos.

A Meg e Ricardo da secretaria do PPGIBA, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos meus amigos da Pós-graduação pelo apoio, incentivo e compreensão durante esses árduos dois anos de mestrado, em especial a Isabella da Motta Passos.

Aos Delbanor, Carla, Debora e Luis pelo carinho e pelos momentos agradáveis que vocês puderam proporcionar neste período tão difícil do meu mestrado.

Ao Ministério da Saúde (MS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas-FAPEAM-PPSUS, pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e a Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por permitir a execução

deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, foram importantes para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que ao infectar os indivíduos expostos, iniciam uma resposta imunológica com produção de várias citocinas, dentre elas o Interferon-gama (IFN-gama), que é crucial para ativação da resposta imune celular contra o bacilo da TB. Esta citocina tem sido amplamente estudada como um possível biomarcador para auxiliar no diagnóstico da TB. Neste trabalho foram analisados as concentrações de IFN-gama em resposta a estímulos *in vitro* com ESAT-6, CFP10 e TB7.7, utilizando o QuantiFERON®-TB Gold (In-tube method) (QTF-IT), em 155 participantes, sendo: 47 pacientes com TB pulmonar confirmada (grupo paciente), 49 contatos de pacientes com TB pulmonar (grupo contato), e 59 indivíduos sem história e/ou contato com TB (grupo controle). As concentrações de IFN-gama foram diferentes entre os grupos avaliados ($p=0,0001$), sendo mais elevado nos pacientes com TB (Mediana = 1.43 UI/mL). Dos contatos diretos, 20/49 (40,8%) foram positivos para o QTF-IT (Mediana=0,26 UI/mL), e destes 14/20 (70,0%) apresentaram níveis elevados de IFN-gama, superior à 1,05 UI/mL. O desempenho do teste relacionando os pacientes de TB como os doentes e os controles como sadios, resultou em 80,9% de sensibilidade (IC 95% = 69,6% a 92,1%) e 93,2% de especificidade (IC 95% = 86,8% a 99,6%), mas quando os resultados dos contatos diretos foram adicionados aos controles, a especificidade reduziu para 77,8% (IC 95% = 69,9% a 85,6%). Concluiu-se que há um perfil diferenciado na produção de IFN-gama, com níveis mais elevados nos pacientes de TB ativa, e que os contatos positivos para o QTF-IT, principalmente, aqueles com altas concentrações de IFN-gama, devem ser monitorados, considerando que o perfil ou concentração elevado desta citocina, pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da TB doença. Além disso, o QTF-IT, executado corretamente, pode ser útil em áreas endêmicas para auxiliar no diagnóstico da TB latente (infecção) e ativa, quando avaliados com outros exames de rotina.

Palavras-chave: Ensaio de liberação de interferon-gama; Tuberculose; Interferon-gama; Quantiferon

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex species, which infect the exposed individuals, initiate an immune response with production of several cytokines, among them interferon-gamma (IFN-gamma), which is crucial for activation of cellular immune response against TB bacillus. This cytokine has been extensively studied as a possible biomarker for diagnosis of TB. In this work, we analyzed the levels of IFN-gamma in response to *in vitro* stimulation with ESAT-6, CFP10 and TB7.7, by QuantiFERON®-TB Gold (In-tube method) (QTF-IT) in 155 participants: 47 patients confirmed pulmonary TB (patient group), 49 direct contacts (group contact), and 59 individuals without history or contact with TB (control group). The levels of IFN-gamma were different among the groups ($p=0.0001$); the highest level was observed in the patients group (median=1.43 IU/mL). In contacts group, 20/49 (40.8%) subjects were positive for the QTF-IT (median = 0.26 IU / mL), and among these positive contacts 14/20 (70.0%) exhibited high levels of IFN-gamma, (≥ 1.05 IU/mL). The performance testing of TB patients versus controls, resulted in 80.9% sensitivity (95% CI = 69.6% to 92.1%) and 93.2% specificity (95% CI = 86.8 % to 99.6%), but when the results of contacts and control group were combined, the specificity decreased to 77.8% (95% CI = 69.9% to 85.6%). Thus, according to our data, there is a distinctive profile of IFN-gamma, with higher levels in the patients group. The QTF-IT positive in contacts, especially those with high levels of IFN-gamma, should be monitored, especially those with high levels of IFN-gamma. This result may be a risk factor for developing TB disease. In addition, the QTF-IT, properly executed, can be useful in endemic areas for the diagnosis of latent and active TB (infection) when evaluated with other routine tests.

Keywords: Interferon Gamma Release Assays, Tuberculosis; Interferon-gamma; Quantiferon

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
APC	Células apresentadoras de antígenos
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
CD	“Cluster of differentiation”
CD4	Proteína de superfície de linfócitos T auxiliares
CD8	Proteína de superfície de linfócitos T citotóxicos
CDC	Centers for disease control and prevention
CFP-10	Culture filtrate protein-10
CREPS	Centro regional especializado em pneumologia sanitária
DATASUS	Banco de dados do sistema único de saúde
DEPAM	Diretoria de epidemiologia e ambiente
ESAT-6	Early secretory antigenic target – 6
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FDA	Food and drug administration
IFN	Interferon
IGRA	Ensaio de liberação de interferon-gama
IL	Interleucina
iNKT	Células NKT Invariantes
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
NK	Células natural killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PCNT	Programa de controle Nacional da tuberculose
PPD RT23	Derivado Protéico Purificado
PPR	Receptor de Reconhecimento Padrão
PPSUS	Programa de pesquisa para o SUS
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão
QTF-IT	QuantiFERON ^R -TB Gold (In -Tube Method)
RD	Regiões de Diferença

SUS	Sistema único de saúde
SIM	Sistema de informações sobre mortalidade
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TB	Tuberculose
TB 7.7	Peptídeo 4
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de células T
TGF	Fator de crescimento transformador
Th	Linfócitos T auxiliares
Th1	Subgrupo funcional de linfócitos T auxiliares CD4 ⁺ 1
Th2	Subgrupo funcional de linfócitos T auxiliares CD4 ⁺ 2
Th17	Subgrupo funcional de linfócitos T auxiliares CD4 ⁺ 17
TNF	Fator de necrose tumoral
UI	Unidade internacional
WHO	World health organization

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.1. Tuberculose.....	14
1.1.1. Aspectos Gerais da Tuberculose.....	14
1.1.2 Agente Etiológico	15
1.1.3. Epidemiologia.....	16
1.1.4. Imunopatogenia	17
1.2. Citocinas	19
1.2.1. Características gerais.....	19
1.2.2. Regulação da resposta imunológica.....	21
1.2.3. Função do Interferon-gama na resposta imunológica	23
1.2.4. Interferon-gama e Tuberculose (TB)	24
1.3 Diagnóstico para Tuberculose (TB)	26
1.4 IGRA e Tuberculose (TB).....	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVO	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1. Modelo de Estudo	33
4.2. Universo de Estudo	33
4.2.1. Participantes:	33
4.3. Amostras:	35
4.4. Informações éticas sobre a pesquisa:	35
4.5. Exames Laboratoriais	35
4.5.1. Exames micobacteriológicos:.....	35
4.5.2. Ensaio para detecção de IFN-gama	36
4.5.3. Prova Tuberculínica.....	37
4.6. Formulário clínico:.....	38
4.7. Monitoramento dos participantes:	38
4.8. Análise estatística:.....	38

5. REFERÊNCIAS.....	39
6. RESULTADOS	49
Na seção de Resultados, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada- UFAM, devem ser anexados os artigos na forma que foi submetido para publicação na língua inglesa e na língua portuguesa.	49
Artigo Original em Português.....	49
Avaliação do Interferon-gama em pacientes com Tuberculose pulmonar e contatos diretos, em Manaus, AM, Brasil	49
RESUMO	50
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 Desenho e Grupos de estudo	52
2.2 Procedimentos	52
2.3 Análise estatística.....	53
3. RESULTADOS	54
4. DISCUSSÃO	55
REFERÊNCIAS:.....	58
Artigo Original versão em inglês	67
Interferon-gamma Evaluation in Pulmonary Tuberculosis Patients and their Direct Contacts in Manaus, AM, Brazil	67
SUMMARY	68
1. INTRODUCTION	69
2. MATERIALS AND METHODS	70
3. RESULTS.....	72
4. DISCUSSION	73
REFERENCES	77
ARTIGO DE REVISÃO.....	86
Ensaio de liberação de Interferon gama (IGRA) em regiões de alta endemicidade da Tuberculose	86
RESUMO	86
ABSTRACT	86
INTRODUÇÃO	87
Metodologia.....	88
Ensaio de liberação de interferon gama (IGRA)	89
Desempenho dos IGRAs comerciais nas regiões de alta endemicidade da TB	91
Conclusão	95

REFERÊNCIAS:.....	96
APÊNDICE 1	100
APÊNDICE 2	101
APÊNDICE 3	103
ANEXO 1	104
ANEXO 2	106

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Tuberculose

1.1.1. Aspectos Gerais da Tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* que pode acometer diversos órgãos e sistemas, sendo a forma pulmonar mais frequente e de maior relevância a saúde pública, pois é a forma clínica responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença (BRASIL, 2011b).

A transmissão da TB ocorre por contato direto, quando um portador de TB pulmonar ou laríngea, ao tossir, espirrar ou falar, lança no ar gotículas de tamanhos variados, contendo no seu interior o bacilo. As gotículas mais pesadas depositam-se rapidamente no solo, enquanto as mais leves podem permanecer em suspensão por diversas horas. Somente os núcleos secos das gotículas, denominados de Núcleos de Wells, com diâmetro de até 5 µm e com 1 a 2 bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos, iniciando a infecção (BRASIL, 2008).

A TB pulmonar pode ser apresentada em duas formas, a primária e a pós-primária. A TB primária ocorre a partir da primeira infecção, podendo evoluir tanto a partir do foco pulmonar quanto do foco ganglionar ou, então, em consequência da disseminação hematogênica; a TB pós-primária ocorre nos indivíduos que já tem sua imunidade desenvolvida tanto pela infecção natural quanto pela BCG, sendo que destes, 5% adoecerão tardiamente em consequência do recrudesimento de algum foco já existente em seu organismo ou por receber nova carga bacilar do exterior (BRASIL, 2005).

Além da TB doença, há grande preocupação do Programa de Controle

Nacional da TB (PCNT) em identificar as pessoas infectadas pelo bacilo e sem sintomas da doença (TB latente), principalmente, aquelas que apresentam risco de desenvolverem a TB para que possam realizar tratamento profilático (BRASIL, 2011b).

Além do exame clínico, o diagnóstico da TB pulmonar é baseado em métodos bacteriológicos (baciloscopia e cultura), exames radiológicos e testes auxiliares como a prova tuberculínica (CONDE et al., 2009).

1.1.2 Agente Etiológico

As micobactérias que acometem o homem e causam a TB pertencem ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* constituído por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (BRASIL, 2008).

As bactérias do gênero *Mycobacterium* são aeróbicas, delgadas, em forma de bastão, não esporuladas, que medem em torno de 0,5µm por 3µm. São classificados como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), devido ao alto teor de ácido micólico, ácidos graxos de longa cadeia entrecruzada e outros lipídeos que compõem a parede celular deste microrganismo (KASPER et al., 2006), como a glicose-6-O-monomicolato, sulfaglicolipídeosdiacilados, glicolipídeos baseados em manosil-fosfatidilinositol (LAYRE et al., 2009).

O principal membro do complexo que causa TB em humanos e tem tropismo exclusivo para esse hospedeiro é *M. tuberculosis*, mas outros 2 participantes do complexo têm importante impacto na causa da TB em humanos, como o *M. Bovis* (KANTOR et al., 2010), embora esteja associado mais a TB em bovinos, e o *M. Africanum* que está associado a metade dos casos de TB na África (KALLENIOUS et al., 1999; JONG et al., 2009; JONG et al., 2010).

1.1.3. Epidemiologia

A TB é uma doença contagiosa, que continua sendo um importante problema de saúde pública mundial, e o controle da doença ainda é um grande desafio. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2010 foram diagnosticados 6,2 milhões de pessoas com TB, destes 5,4 milhões foram de casos novos, sendo 2,6 milhões com baciloscopia positiva, 2,0 milhões com baciloscopia negativa e 0,8 milhões com TB extrapulmonar, resultando em 1,1 milhões de mortes.

Dos 22 países priorizados pela OMS e que concentram 80% da carga mundial de TB, o Brasil ocupa a 18^a. posição em relação ao número de casos e a 104^a posição em relação ao coeficiente de incidência. Em 2009, foram notificados no Brasil 72 mil casos novos, correspondendo a um coeficiente de incidência de 38/100.000 habitantes (WHO, 2011a).

No Brasil em 2009 ocorreram aproximadamente 4,8 mil mortes (BRASIL, 2009) e segundo dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) foram notificados 75 mil casos confirmados de TB no ano de 2011 (BRASIL, 2011a).

No Amazonas entre os anos de 1993 e 2007 as taxas de TB foram superiores as da região norte e do Brasil, em 2011 foram notificados 2.549 casos confirmados de TB (BRASIL, 2011a). O Amazonas detém o segundo maior índice de casos de TB do país, registrando aproximadamente 67,7 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2011a).

A capital do Amazonas, Manaus, concentra cerca de 68% dos casos de TB de todo o estado (MARREIRO et al., 2009) e em 2011 foram notificados 1.801 casos confirmados de TB (BRASIL, 2011a). Esses indicadores são preocupantes e estimulam investigar melhor os mecanismos imunológicos envolvidos na TB.

1.1.4. Imunopatogenia

A TB é uma doença que acomete vários órgãos, principalmente, os pulmões que servem como porta de entrada da doença (BOMBARDA et al., 2001), pacientes com TB pulmonar ao falar ou tossir expelem gotículas que contém bacilos que ao serem inalados alcançam o tecido pulmonar e são imediatamente fagocitados por macrófagos alveolares (KAUFMANN, 2002), dos indivíduos que entraram em contato com o bacilo, aproximadamente 10% evoluem para doença e 90% desenvolvem resposta imune contendo a infecção, mas alguns bacilos escapam dos mecanismos microbicidas das células imune e ficam em estado de dormência ou latência, constituindo a TB latente, estes bacilos podem futuramente, após algum desequilíbrio imunológico, causar a TB ativa (AHMAD, 2011).

O bacilo da TB, *Mycobacterium tuberculosis*, contém lipídeos na parede celular responsáveis pelas suas características de álcool ácido resistência, e são estes lipídeos que interagem com os receptores dos fagócitos, sendo também os responsáveis por alguns mecanismos de escape, evitando assim a ação do sistema imune do hospedeiro (GUENIN-MACÉ et al., 2009).

A infecção começa de fato com a internalização do bacilo pelas células apresentadoras de antígenos no pulmão, incluindo macrófagos alveolares e células dendríticas, que reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) por meio dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), tais como os receptores de complemento CR1, CR3, CR4, receptor de manose, receptores CD14 e receptores do tipo toll (TLR2, TLR4 e TLR9), iniciando assim a resposta imune natural ao patógeno (ERNST, 1998; MICHAEL et al., 2004 ; BAFICA et al., 2005; AHMAD, 2011; KAWAI et al., 2011).

As células apresentadoras de antígenos, após o reconhecimento do bacilo,

agem na eliminação das bactérias intracelularmente por meio da maturação do fagossoma com o lisossoma ou pela ubiquitinação do bacilo (FERRARI et al., 1999; COOPER et al., 2009; PIETERS et al., 2008 ; ALONSO et al., 2007) e na produção citocinas e quimiocinas inflamatórias, atraindo as células da imunidade, como os monócitos, neutrófilos e linfócitos que migram para o local da infecção atraídos pelas quimiocinas produzidas pelas células infectadas, o acúmulo celular no local da infecção forma o granuloma (BODNAR et al., 2001; GONZALES-JUARRERO et al., 2001).

A formação do granuloma limita a disseminação bacteriana e cria um microambiente para as interações entre os macrófagos, outras células do sistema imune e as citocinas produzidas por estas células (WOLF et al., 2008). Neste momento o fagócito pode liberar a citocina IL-12, que age na diferenciação de células Th0, para o perfil de resposta Th1, que produz Interferon-gama (IFN-gama), bem como, outras citocinas que ativam os macrófagos potencializando sua ação fagocítica, e conseqüentemente, colaborando no processo de destruição do bacilo (BAFICA et al., 2005).

Além dos linfócitos Th1, que pertencem ao sistema adaptativo, tem sido descrito a participação das células Th17 na resposta imune para *M. tuberculosis*, tanto na infecção humana como em modelos experimentais, há também a produção de IL-17 por essas células que atuam na proteção contra o bacilo da TB (ZENARO et al., 2009; WOZNIAK et al., 2010).

Outras células como os linfócitos T gama/delta e células NKT, que possuem características funcionais de células do sistema imune inato, juntamente com as células NK, são também denominadas de linfócitos inatos, que respondem rapidamente e colaboram na resistência do hospedeiro as diferentes infecções

(BENDELAC et al., 2001). Considerando a função relevante dessas células, Sada-Ovalle et al. (2008) realizaram estudos com camundonos para avaliar o papel as células NKT invariantes (iNKT) na TB, e comprovaram que as células iNKT protegem o camundongo nas infecção por *M. tuberculosis in vivo*, provavelmente por reconhecerem antígenos lipídicos do bacilo e por produzirem a IFN-gama.

Recentemente foi descrito que os mastócitos utilizam os microdomínios ricos em colesterol, para ligação e internalização de *M. tuberculosis*, estimulando esses mastócitos a produzirem citocinas inflamatórias (MUÑOZ et al., 2009), este evento não ocorre apenas nestas células, mas também nos fagócitos como os macrófagos alveolares (KAUL et al., 2004) e neutrófilos (PEYRON et al., 2000).

Apesar dos mecanismos protetores do hospedeiro, as micobactérias são capazes de permanecer viáveis no interior de células fagocitárias (GONZALEZ-JUARRERO et al., 2001) e também sobrevivem em células não fagocitárias, incluindo os pneumócitos tipo II (GARCIA-PEREZ et al., 2003), células epiteliais e fibroblastos (GONZALEZ-JUARRERO et al., 2001; HERNANDEZ-PANDO et al., 2000; GARCIA-PEREZ et al., 2003; RIVAS- SANTIAGO et al., 2005).

Na TB assim como em outras doenças infecciosas o envolvimento celular é intenso e suas atividades são moduladas por várias citocinas, algumas com funções fundamentais na resposta imune celular frente ao bacilo da TB.

1.2. Citocinas

1.2.1. Características gerais

Citocinas são proteínas, de baixo peso molecular, produzidas e secretadas por diferentes tipos celulares do sistema imune inato e adaptativo. As citocinas podem ser produzidas em estado fisiológico, infecciosos e não infecciosos

(OPPENHEIM, 2001; VILCEK et al.; 2004; BILATE, 2007; ABBAS et al., 2008).

Existem mais de 100 tipos diferentes de citocinas descritas que são classificadas de acordo com o seu papel principal. Estas proteínas estão envolvidas em todos os aspectos da resposta imune e tem função chave na regulação da resposta imune. As citocinas produzidas, dependendo do estímulo antigênico podem determinar o tipo de resposta imune que será desenvolvido (LARRUBIA et al., 2009)

As citocinas atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune, sendo que as principais características são as seguintes: 1. A secreção de citocinas é um evento breve e autolimitado, ou seja, uma vez sintetizadas são rapidamente secretadas, e sua ativação transcricional é transitória e os RNAs mensageiros que codificam a maioria das citocinas são instáveis; 2. Uma mesma citocina pode ser produzida por diferentes células (e agir em diferentes tipos celulares, promovendo efeitos biológicos diversos; 3. As ações das citocinas podem ser locais ou sistêmicas, na qual a maioria exerce efeito parácrino (ação sobre células vizinhas) ou autócrino (ação sobre a própria célula) e em menor frequência, pode atuar de forma endócrina (distante do local de produção) (ABBAS et al., 2008; BILATE, 2007; JANEWAY et al., 2007).

Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Dentre as citocinas consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF (fator de necrose tumoral) e das anti-inflamatórias as IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (fator transformador de crescimento β) (OLIVEIRA et

al., 2011).

1.2.2. Regulação da resposta imunológica

Citocinas são importantes mediadores que tem papel significativo na imunoregulação das respostas celulares (ANTAS et al., 2004). Em todos os estágios da resposta imunológica, as citocinas participam dos processos regulatórios e efetores (TEIXEIRA et al., 2007).

Diversos tipos celulares podem secretar citocinas que exercem múltiplas funções, entre as quais se destacam: a regulação da hematopoiese, controle da proliferação e diferenciação celular (BILATE , 2007).

As células da imunidade inata, quando ativadas por antígenos, produzem citocinas que influenciam na diferenciação das células TCD4+ *naïves* da imunidade adaptativa, direcionando de Th0 para Th1, Th2 ou ainda para Th17(MORÁN et al., 2006; BETTELLI et al., 2007;TRIFARI et al., 2009; MIOSSEC et al., 2009).

A base molecular para diferenciação em Th1, pode ter o auxílio de citocinas como o IFN-gama, produzido por células NK, NKT e linfócitos gama/delta (SADA-OVALLE et al., 2008), e principalmente por IL-12 produzida por célula dendrítica (célula apresentadora de antígeno), que ao interagir com linfócito TCD4+ *naïve* permite a sua diferenciação em célula Th1 que passam a produzir IFN-gama e IL-2, determinando uma resposta imune celular (MORÁN et al., 2006; BETTELLI et al., 2007; TRIFARI et al., 2009; MIOSSEC et al., 2009). Outras citocinas, produzidas por macrófagos e células dendríticas, foram descritas tendo atividade semelhante a IL-12, tais como: a IL-18, IL-23, e IL-27, que induzem a produção de IFN-gama, podendo a IL-18 e a IL-27 atuarem em sinergismo com a IL-12 (OTTENHOFF et al., 2006).

Para diferenciação em Th2, é necessário principalmente que a citocina IL-4,

esteja sendo liberada por células do sistema inato, tais como basófilos e mastócitos para que o linfócito TCD4+ *naïves* possa se diferenciar em Th2, e também passe a produzir IL-4 e outras citocinas como IL-5 e IL-13, que estão relacionadas as reações alérgicas e as doenças causadas por helmintos (BETTELLI et al., 2007; TRIFARI et al., 2009; MIOSSEC et al., 2009; SOKOL et al., 2009; SOKOL et al., 2010).

Em relação a diferenciação em Th17, estímulos de células da imunidade inata produzindo IL-1, IL-6 e TGF-beta induzem a diferenciação dos linfócitos TCD4+ *naïves* para linfócitos Th17 que passam a produzir IL-21 e IL-17. Além disso, a citocina IL-23 fornecida por monócitos e células dendríticas ajudam também na expansão e manutenção da célula Th17, sendo estas células associadas a respostas inflamatórias (BETTELLI et al., 2007; TRIFARI et al., 2009; MIOSSEC et al., 2009).

Outras sub-populações de linfócitos T foram descritas de acordo com a sua atividade e padrão de produção de citocinas, como os linfócitos T regulatórios, caracterizados pela produção de TGF- β , associados a um perfil regulador da resposta imune, linfócitos T CD4+ CD25+ produtores de TGF- β e IL-10, também chamados de células T reguladoras (BILATE , 2007).

Nas doenças infecciosas, como a TB, certamente há participação de diversas citocinas, porém a resposta Th1 com liberação de IFN-gama na infecção por *M. tuberculosis* é fundamental para o mecanismo de proteção. Por este motivo o papel do IFN-gama será discutido, tanto para o melhor conhecimento da imunopatogenia da doença, bem como um instrumento para o auxílio diagnóstico da TB ativa ou TB latente.

1.2.3. Função do Interferon-gama na resposta imunológica

Os interferons (IFN) foram originalmente descritos como agentes que interferem com a replicação viral e classificados pelos tipos de células que os secretavam, mas agora são classificados de acordo com o receptor específico e a sequência de homologia, em tipo I, constituído pelos IFN-alfa e IFN-beta , e tipo II por IFN-gama, ambos os tipos são estruturalmente relacionados, mas atuam em receptores diferentes (SCHRODER et al., 2004).

O IFN-gama é uma citocina chave na resposta imune para *M. tuberculosis*, no entanto, defeitos na produção de IFN-gama tornam humanos e camundongos mais suscetíveis à infecção pelo bacilo da TB (FLYNN et al., 2004; COOPER et al., 2009).

O IFN-gama age sobre as células promovendo efeitos no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II, aumentando o nível de expressão dessas moléculas, e consequentemente aumentando a apresentação de antígenos na superfície celular por meio dessas moléculas, para que esses antígenos sejam facilmente reconhecidos pelos linfócitos T citotóxico (CD8) e T helper (CD4), induzindo uma resposta imune celular eficiente (SCHRODER et al., 2004).

Além dos efeitos do IFN-gama sobre o nível de expressão do MHC, também atua potencializando a ação fagocítica do macrófago, com aumento na produção do Fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), de espécies de oxigênio tóxico e do óxido nítrico (pela indução da óxido nítrico sintetase), e consequentemente, aumentando o poder microbicida. Além dessas funções, induzem mecanismos antitumorais, atração de leucócitos, aumento da atividade de células NK e regulação de linfócitos B na produção de imunoglobulinas (SCHRODER et al., 2004). O IFN-gama sem dúvida exerce um papel fundamental na resposta imune celular para diversas doenças

infecciosas, e uma delas é a Tuberculose.

1.2.4. Interferon-gama e Tuberculose (TB)

O IFN-gama participa intensamente na proteção contra *M. tuberculosis*, é um importante elemento na defesa contra micobactérias em geral (COOPER et al.,1993). Essa molécula colabora no tratamento da TB, acelerando em certos casos as respostas clínicas favoráveis, sendo usado no tratamento da TB multirresistente (CONDOS et al.,1997). Ela também impede a dispersão dos bacilos fagocitados pelos leucócitos polimorfonucleares e participa na formação e manutenção do granuloma; (MURRAY, 1999), como também ativam macrófagos outras células, induzindo a produção de óxido nítrico sintetase e tornando-os bactericidas (FENG et al., 1999).

Os fenótipos resultantes de mutações nos genes do IFN-gama são similares em ratos e seres humanos, e a falta de sinalização pelo IFN-gama resulta em infecções por micobactérias, indicando que macrófagos ativados, por esta citocina, têm um papel insubstituível no controle do crescimento bacteriano (FENG et al., 1999; HASHEMI et al., 2011).

A via de sinalização da produção de IFN-gama é a via das proteínas JAK/STAT que é compartilhada por várias citocinas. Estas proteínas são fosforiladas e deslocam-se até o núcleo, acoplando-se ao DNA e promovendo a transcrição de proteínas específicas. Trabalhos em humanos e camundongos mostram que defeitos genéticos nesta via tornam-os mais suscetíveis a infecção por *M. tuberculosis* (COOPER et al., 2009).

Estudos recentes têm demonstrado que a TB em modelos experimentais está associada ao IFN tipo I e II, sendo que estas citocinas podem estar relacionadas à inibição da produção de IL-1 por macrófagos e células dendríticas inflamatórias. O

IFN-gama inibe a via de sinalização de IL-1 somente nos macrófagos, o que é um fato intrigante, pois a mesma citocina parece desempenhar uma função inflamatória e anti-inflamatória (MAYER-BARBER et al., 2012).

Em estudos realizados com modelos de camundongos para TB, na resposta inflamatória, demonstraram que a ação do IFN-gama sobre neutrófilos infectados por *M. tuberculosis* é praticamente nula, contribuindo para que o bacilo possa se multiplicar no interior dos neutrófilos. No entanto, a atuação do IFN-gama sobre macrófagos infectados, torna-os ativos, com eliminação do bacilo (ERUSLANOV et al., 2005).

Nesta relação patógeno-hospedeiro, está bem definido que a citocina IFN-gama exerce um papel crucial durante a resposta imune contra *M. tuberculosis*, por este motivo, ensaios envolvendo a determinação de IFN-gama, *in vitro*, após estímulo das células T com antígenos de *M. tuberculosis*, têm sido investigados em pacientes com TB ativa, TB latente e em comunicantes diretos (CATTAMANCHI et al., 2011; LEE et al., 2011; LUI., 2011; KOMIYA et al., 2011; VIDHATE et al., 2011; KELLAR et al., 2012; CHO et al., 2011; TAKI-EDDIN et al., 2012; VESENBECKH et al., 2012).

1.3 Diagnóstico para Tuberculose (TB)

O diagnóstico da TB depende dos dados detalhados do paciente quanto aos aspectos clínicos e epidemiológicos, dos exames bacteriológicos (baciloscopia direta e cultura para micobactérias), dos exames de imagem (radiografia de tórax, tomografia computadorizada ou ressonância magnética), da prova tuberculínica e do exame histopatológico (BRASIL, 2011b). No entanto, para TB latente não existe um exame confiável que permita o diagnóstico para este estado de infecção por *M. tuberculosis*.

A baciloscopia de escarro é o método preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), para o diagnóstico da TB pulmonar pela técnica de Ziehl-Nielsen, pois trata-se de um exame não invasivo ao paciente, rápido, econômico e que permite detectar de 60% a 80% dos casos de TB (FUJIKI et al., 2006; OPS, 2008; WHO, 1998). A cultura é considerada o método padrão ouro para o diagnóstico da TB, existindo meios de cultivo sólido a base de ovo (Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh) e ágar (Middlebrook 7H10 e 7H11) e meio líquido enriquecido com albumina, dextrose e catalase (Middlebrook 7H9). Este exame quando realizado no escarro pode em geral adicionar 20% dos casos não diagnosticados na baciloscopia, no entanto o tempo de detecção para positividade pode ser de 14 a 28 dias ou até 8 semanas (BRASIL, 2008).

Recentemente tem sido proposto a detecção rápida do bacilo da TB, utilizando um equipamento denominado de XpertMTB/RIF, que se baseia num teste molecular automatizado para detecção *M. tuberculosis* e da resistência a rifampicina, e fornece os dois resultados em apenas duas horas (BOEHME et al, 2010), este teste foi recomendado pela OMS (WHO, 2011b).

Além dos testes citados, os exames de imagem como a radiografia do tórax e ressonância magnética também são muito utilizados para o auxílio diagnóstico da TB ativa.

Em relação aos exames imunológicos, a prova tuberculínica, que é um teste intradérmico e utiliza derivado protéico de *M. tuberculosis* (PPD-TR 23), vem sendo utilizada há décadas para auxiliar na identificação das pessoas com infecção latente pelo bacilo da TB, contudo, reações falso positivas podem ocorrer em indivíduos infectados por outras micobactéria não tuberculosas ou vacinados pelo BCG. Além disso, a leitura do teste é realizada após 48 a 72 horas após a aplicação do PPD.

Na tentativa de reduzir as reações cruzadas, frequentemente, observadas nas provas tuberculínicas, tem sido proposto testes alternativos denominados de ensaios de liberação de IFN-gama (IGRA), que se baseiam na estimulação de células T *in vitro* no interior de tubos contendo antígenos mais específicos de *M. tuberculosis*, tais como: o ESAT-6; CFP 10 e TB7.7

Vários estudos têm sido realizados, ao longo desses últimos dez anos, envolvendo TB e IGRA, utilizando diversos antígenos do bacilo, na tentativa de encontrar um teste imunológico mais confiável para o auxílio diagnóstico tanto da TB ativa quanto da TB latente.

1.4 IGRA e Tuberculose (TB)

Dentre os IGRA, dois testes foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para uso nos laboratórios de rotina, conhecidos como o o QuantiFERON®-TB Gold (in-tube Method) (QTF-IT) (FDA, 2007) e o T-SPOT™ TB (T-SPOT) (FDA, 2008). Sendo que o QTF-IT é a terceira geração de teste dentro da linha Quantiferon.

Estes testes de IGRA se baseiam na resposta imune de células T do sangue total estimulados com antígenos de *M. tuberculosis*, podendo auxiliar no diagnóstico da TB latente (TL) e TB doença (CDC, 2010).

Os testes de IGRA utilizam antígenos codificados das regiões do genoma de *M. tuberculosis*, chamados de regiões de diferença (RD). As proteínas identificadas foram as codificadas pela região de diferença 1 (RD1), tais como: ESAT-6 (early secretory antigenic target-6) e CFP-10 (culture filtrate protein 10), e a da região de diferença 11 (RD11) como a proteína TB 7.7(Rv2654c), responsáveis pela virulência do bacilo da TB (AHMAD , 2011; DIE et al., 2010; JORDAO et al., 2011).

Os antígenos de RD1 e RD11 são importantes na resposta imune celular e na defesa do hospedeiro, havendo vários estudos comprovando sua importância na estimulação de células T com a produção da citocina IFN-gama, essencial na proteção contra *M. tuberculosis* (DIE et al., 2009; CELLESTIS 2011; PAI et al., 2008).

Os QTF-G e QTF-IT medem os níveis de IFN-gama a partir do sobrenadante de um “pool” de células estimuladas do sangue total. O T-SPOT mede a produção individual de células T, que produzem IFN-gama a partir de células antigênicas estimuladas uma a uma (MARTIRE, 2009). Espera-se que estes testes sejam mais sensíveis e específicos que a prova tuberculínica usada rotineiramente, considerando que o QTF-IT e T-SPOT utilizam antígenos mais específicos para o complexo *M. tuberculosis* e, também, que o teste tenha menos reações cruzadas com as micobactérias não tuberculosas e ambientais (CDC, 2010).

Desse modo, estudos em indivíduos expostos a *M. tuberculosis* vêm sendo realizados em diversos países, com resultados de sensibilidade e especificidade bem variáveis. No último consenso realizado pela OMS concluiu que há poucos

estudos sobre os testes de IGRA comerciais sendo executados nos países de baixa e média renda com números elevados de casos de TB e/ou HIV (WHO, 2011c).

Neste contexto, a investigação sobre desempenho dos testes de QTF-G, QTF-IT ou T-SPOT em países como o Brasil torna-se necessária.

2. JUSTIFICATIVA

Na Tuberculose (TB) a resposta imune do hospedeiro às vezes é suficiente para conter a infecção pelo *M. tuberculosis*, mas não tão eficiente para prevenir infecções subseqüentes e nem consegue fornecer uma imunidade esterilizante, ou seja, não há completa eliminação do patógeno. Contudo, a partir dos diversos estudos sobre a resposta imunológica em pacientes com TB, foi possível demonstrar que a citocina IFN-gama, produzida pelas células T, células Natural killer (NK), células NKT e células gama/delta, exerce um papel fundamental durante a infecção por *M. tuberculosis*, limitando o crescimento e ação do bacilo no hospedeiro humano. Por este motivo, a investigação de IFN-gama nos pacientes com TB ativa e TB latente nos contatos diretos tem sido realizada em diversos países, na tentativa de encontrar marcadores imunológicos confiáveis, para auxiliar no diagnóstico da TB, e assim adotar medidas mais efetivas para o combate e transmissão da doença.

Nestes últimos sete anos foram aprovadas pela “Food Drug Administration” (FDA), dois tipos de testes baseados na liberação de IFN-gama (IGRA), o QFT-IT (FDA, 2007) e o T-SPOT (FDA, 2008), os quais podem ser ferramentas úteis, principalmente, para o auxílio diagnóstico da TB ativa paucibacilar e da infecção tuberculosa latente (CDC, 2005; CDC, 2007). Um aspecto comum relevante dos testes é que os antígenos utilizados, ESAT-6, CFP-10 e TB7.7, estão ausentes nas cepas de *M. bovis* atenuada da vacina BCG, e ausentes também na maioria das outras micobactérias não tuberculosas, com exceção à *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*, o que pode aumentar a confiabilidade desses testes (CELLETIS INC., 2007).

Os testes de liberação de IFN-gama (IGRA) vieram para substituir a prova tuberculínica (PT) usada há décadas como único teste imunológico para diagnosticar

a TB infecção, sendo recomendado em diversos trabalhos a substituição pelos testes de IGRAs que devem ser usado de acordo com a história epidemiológica de cada indivíduo, com seu estado atual e outras avaliações diagnósticas, realizadas rotineiramente nos centros médicos (MAZURECK et al., 2005; CDC, 2010).

Considerando que no Estado do Amazonas há uma alta incidência de TB (67,7 casos de TB por 100 mil habitantes) (BRASIL, 2011b), a busca de medidas alternativas para o controle da doença, como a identificação de indivíduos com TB paucibacilar e TB latente faz-se necessária para reduzir a rede de transmissão da doença no Estado.

Diante do exposto, propõe-se investigar, numa região endêmica de TB como a cidade de Manaus, a produção de IFN-gama por células T de pacientes com TB pulmonar (caso índice) e de seus contatos diretos, ou seja, indivíduos que convivem na mesma residência dos pacientes.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a concentração de interferon-gama (IFN-gama) como indicador de infecção tuberculosa em pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar e seus contatos diretos, pelo teste de QuantiFERON® - TB Gold (in- tube Method) (QTF-IT).

3.2. Objetivos específicos

1. Verificar se existe diferença na concentração de IFN-gama entre os portadores de TB pulmonar, em seus contatos diretos e em indivíduos do grupo controle;
2. Avaliar o desempenho do teste QTF-IT nos pacientes com TB pulmonar, contatos diretos e grupo controle.
3. Verificar a correlação entre os resultados da prova tuberculínica e do IFN-gama para QTF-IT em contatos diretos.

4. METODOLOGIA

4.1. Modelo de Estudo

Estudo descritivo, prospectivo, transversal do tipo detecção de caso para verificar a produção de IFN-gama, em indivíduos infectados pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), como possível indicador para TB ativa e TB latente, utilizando o teste de QTF-IT.

4.2. Universo de Estudo

4.2.1. Participantes:

a) Grupo 1: Pacientes

Os pacientes incluídos no estudo tiveram o diagnóstico confirmado para TB pulmonar com isolamento de *Mycobacterium tuberculosis*, foram de ambos os gêneros, com idade entre 15 e 65 anos e residentes na cidade de Manaus.

Foram excluídos do estudo: Gestantes, transplantados, portadores de diabetes, portadores de neoplasias, portadores de doenças autoimunes, indivíduos fazendo uso de qualquer tipo de imunossupressor ou imunomodulador, portadores de imunodeficiência congênita, HIV positivos (vírus da imunodeficiência humana) e Indígenas.

Foi estimado inicialmente o número de 118 pacientes com TB pulmonar, baseados no número de casos notificados de baciloscopia positiva em 2009 na cidade de Manaus (PCT-AM, 2010).

Apesar da estimativa, o número total de pacientes incluídos no estudo foi de 63, mas 16 foram excluídos por não atenderem os critérios de elegibilidade, contabilizando de fato o número de 47 pacientes diagnosticados para TB pulmonar.

b) Grupo 2: Contatos diretos dos pacientes portadores de Tuberculose pulmonar.

Os contatos diretos são as pessoas que convivem no mesmo ambiente com o caso índice no momento do diagnóstico da TB. Esse convívio pode se dar em casa e/ou em ambientes de trabalho, instituições de longa permanência, escola ou pré escola (BRASIL, 2011b). Para este estudo, foram selecionados os contatos que conviviam com o paciente na mesma residência, de ambos os sexos, com idade entre 15 e 65 anos.

Para estimar a seleção dos contatos diretos, foi considerada a “Regra do círculo”, na qual se estima que para cada paciente índice, com nove comunicantes, dois podem ter sido infectados pelo bacilo causador da TB (HUGO et al., 1994). O número estimado foi de pelo menos dois contatos por paciente, ou seja, o dobro do número de pacientes ($n=118$) que corresponderia ao $n= 236$. Contudo, o número obtido foi de 49 contatos.

c) Grupo 3: Indivíduos aparentemente saudáveis (controle)

Foi estimado o número de 118 indivíduos do grupo controle, ou seja, indivíduos aparentemente saudáveis, vacinados para a BCG e sem história anterior de TB pessoal e familiar, de ambos os sexos com idade entre 15 e 65 anos e

residentes na cidade de Manaus. Neste grupo o número alcançado foi de 59 controles.

4.3. Amostras:

As coletas de sangue dos pacientes, contatos e controles foram realizadas no período de março de 2011 a novembro de 2011. De todos os portadores de TB e de seus contatos diretos foram solicitadas amostras de escarro que foram processadas para os exames micobacteriológicos (baciloscopia e cultivo).

4.4. Informações éticas sobre a pesquisa:

A dissertação de mestrado está vinculada ao projeto “Investigar a validade da produção do Interferon-gama como indicador de infecção recente ou latente”, aprovado no Edital PPSUS FAPEAM/SUSAM/MS/CNPq N^o.007/2009, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e aprovado em 31/11/2009, sob número de protocolo 223/09.

4.5. Exames Laboratoriais

4.5.1. Exames micobacteriológicos:

Os pacientes foram convidados a participar do estudo após atendimento no aprazamento I na Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes , sendo solicitado amostras de escarro para realização dos exames de baciloscopia direta e pós centrifugação e cultivo no meio de Ogawa modificado (técnica de PKO) . Esses exames somente foram realizados nos pacientes e nos contatos diretos sintomáticos para definição do comportamento baciloscópico. Os

exames micobacteriológicos foram efetuados conforme estabelecido por Salem et al. (2007).

4.5.2. Ensaio para detecção de IFN-gama

Para a detecção do IFN-gama foi utilizado o teste QTF-IT, aprovado em 12 de outubro de 2007 pela “Food Drug Administration” (FDA, 2007) e recomendado para uso como auxílio diagnóstico de infecção latente pelo complexo *M. tuberculosis* (CDC, 2007).

Foram coletados 3mL de sangue periférico em tubo á vácuo contendo heparina e distribuídos rigorosamente na seguinte ordem: a) 1mL em tubo sem antígeno e sem mitógeno (controle negativo), b) 1mL em tubo com antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB.7.7, c) 1mL em tubo com mitógeno como controle positivo. Em seguida os tubos foram homogeneizados e incubados em estufa a 37°C durante 24 horas. Após este período, o sobrenadante (plasma) foi coletado e testado por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para detecção do IFN-gama.

Os resultados da leitura de absorbância foram transferidos para um programa de computador, o QuantiFERON®-TB Gold - In tube, versão 2.17.3 fornecido pelo fabricante do QTF-IT, no qual foi realizado o cálculo da curva padrão, a conferência do controle de qualidade das duplicatas da curva padrão, o cálculo da concentração de IFN-gama (UI/mL) de todas as amostras testadas.

Foram consideradas positivas para o IFN-gama as amostras que apresentaram valor igual ou superior a 0,35 UI/mL entre o estímulo do antígeno subtraído do controle negativo, ou ainda se o resultado da amostra foi igual ou maior que 25% em relação ao resultado do controle negativo.

A interpretação dos resultados do QTF-IT como auxílio diagnóstico de TB recente ou latent foi baseada no “Guidelines for the Investigation of Contacts of

Persons with Infectious Tuberculosis Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC” (CDC, 2005), “Guidelines for Using the QuantiFERON®-TB Gold Test for Detecting *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States” (CDC, 2005) e o “Updated Guidelines for Using Interferon-gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* infection (CDC,2010).

A sensibilidade e a especificidade do teste QTF-IT foram calculadas utilizando o Programa Win Episcopo 2.0 (TRUSFIELD et al., 2001). Além disso, a curva ROC (Receiver Operator Characteristic Curve) (GREINER, et al., 1995; GREINER, 1996; GREINER et al., 2000) foi utilizada para analisar e ilustrar a relação entre a sensibilidade e especificidade do teste QTF-IT, na qual auxiliou na definição de um limiar de reatividade (Cut off) alternativo (TRUSFIELD et al., 2001; PAGANO, GAUVREAU, 2004).

4.5.3. Prova Tuberculínica

Foi aplicado 0,1 mL do “purified protein derivative” (PPD-RT23 SSI-Statens Serum Institut, Dinamarca), equivalente a 2 UT (unidades de tuberculina), por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, em conformidade com as normas do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2011b).

A prova tuberculínica (PT) foi solicitada somente nos contatos e controles. Esta prova é recomendada somente nos casos de baciloscopia negativa e também como auxílio diagnóstico para infecção latente por *M. tuberculosis* em adultos e crianças realizada de acordo com as orientações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b).

A leitura foi realizada em 72 horas após a aplicação. O maior diâmetro transversal da área do endurecimento palpável foi medido, com régua milimetrada transparente, e o resultado registrado em milímetros. A interpretação foi feita de

acordo com o Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil (BRASIL, 2011b). No presente estudo, a PT igual ou maior que 5 milímetros foi considerada positiva.

4.6. Formulário clínico:

O formulário conteve informações relativas aos dados pessoais, clínicos (sinais e sintomas e antecedentes de doenças), antecedentes de BCG, e exames complementares como radiografia de tórax quando disponíveis.

4.7. Monitoramento dos participantes:

Durante e após a realização de todos os procedimentos previstos na dissertação os participantes foram monitorados para verificação de desenvolvimento de TB, mesmo após o encerramento da proposta.

4.8. Análise estatística:

A análise dos resultados dos testes de IFN-gama, entre os pacientes, contatos e controles, foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

A análise de correlação entre os resultados dos testes intradérmicos e de detecção de IFN-gama foi realizada utilizando o coeficiente de correlação de Spearman (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

A sensibilidade e especificidade foi ilustrada usando-se a curva ROC (GREINER, et al., 1995; GREINER, 1996; GREINER et al., 2000) elaborada no programa Win Episcopo 2.0 (THRUSFIELD et al., 2001).

O nível de significância considerado foi de $\alpha = 0,05$.

5. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAL, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ADETIFA, I.; LUGOS, M.; HAMMOND, A.; JEFFRIES, D.; DONKOR, S.; ADEGBOLA, R.; HILL, P. Comparison of two interferon gamma release assays in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection and disease in The Gambia. **BMC Infectious Diseases**, n. 7, v. 122, p. 1-9, 2007.

ALONSO, S.; PETHE, K.; RUSSELL, D.; PURDY, G. Lysosomal killing of Mycobacterium tuberculosis mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v. 104, n. 14, p. 6031-6036, 2007.

ANTAS, P.; SALES, J.; PEREIRA, K.; OLIVEIRA, E.; CUNHA, K.; SARNO, E.; SAMPAIO, E. Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1119-1129, 2004.

AHMAD, S. Pathogenesis, Immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, p. 814-943, 2011.

BAFICA, A.; SCHANGA, C.; FENG, C.; LEIFER, C.; CHEEVER, A.; SHER, A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715-1724, 2005.

BENDELAC, A.; BONNEVILLE, M.; KEARNEY, J. Autoreactivity by design: Innate B and T lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 3, p. 177-186, 2001.

BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 6, p. 652-657, 2007.

BILATE, A. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de reumatologia clínica**, v. 8, n. 3, 2007.

BOMBARDA, S.; FIGUEIREDO, C.; FUNARI, M.; JÚNIOR, J.; SEISCENTO M.; FILHO, M. **Jornal de Pneumologia**, v. 6, n. 27, 2001.

BODNAR, K.; SERBINA, N.; FLYNN, J.. Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 800-809, 2001.

BOEHME, C.; NABETA, P.; HILLEMANN, D.; NICOL, M.; SHENAI, S.; KRAPP, F.; ALLEN, J.; TAHIRLI, R.; BLAKEMORE, R.; RUSTOMJEE, R.; MILOVIC, A.; JONES, M.; OBRIEN, S.; PERSING, D.; RUESCH-GERDES, S.; GOTUZZO, E.; RODRIGUES,

C.; ALLAND ,D.; PERKINS, M.. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. **The New England Journal of Medicine** , v. 11, p. 1005-1015, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 123, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Tuberculose. Indicadores de mortalidade. **Taxa de mortalidade específica por doenças transmissíveis no ano de 2009**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009 Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/c17.def>>. Acessado em 09 de março de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Tuberculose - **Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação no ano de 2012 - Sinan Net** . Brasília: Ministério da Saúde, 2011a. Disponível em : <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet /tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>>. Acessado em 05 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011b.

CALLEGARI-JACQUES, S. **Bioestatística, princípios e aplicações**. Editora Artmed. Porto Alegre, 2003.

CATTAMANCHI, A.; SSEWENYANA, I.; DAVIS, J.; HUANG, L.; WORODRIA, W.; BOON, S.; YOO, S.; ANDARNA, A.; HOPEWELL, P.; CAO, H. Role of interferon-gamma release assays in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with advanced HIV infection. **BMC Infectious Diseases**, n. 10, v.75, p. 1-7, 2010.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Guidelines for the Investigation of Contacts of Persons with Infectious Tuberculosis, United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 54, RR-15, p. 1-37, 2005.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Trends in tuberculosis incidence, United States, 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 56, p. 245-250, 2007.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection , United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 59, RR-5, 2010.

CELLESTIS INC. QuantiFERON TB GOLD: precision and reproducibility report. **Cellestis**, Valencia, CA., 2007. www.cellestis.com.

CHOI, J.; SHIN, J.; KIM, J.; PARK, W.; CHOI, B.; LEE, M. The Effect of Previous Tuberculin Skin Test on the Follow-up Examination of Whole-Blood Interferon-gamma Assay in the Screening for Latent Tuberculosis Infection. **Journal of the American College of Chest Physicians**, n. 133, p. 1415-1420, 2010.

CONDE, M.; MELO, F.; MARQUES, A.; CARDOSO, N.; PINHEIRO, V.; DALCIN, P.; JUNIOR, A.; LEMOS, A.; NETTO, A.; SANT'ANNA, B.; CAPONE, D.; MATOS, D.; DIAS, E.; MELLO, F.; DAVID, F.; MARSICO, G.; AFIUNE, J.; SILVA, J.; JAMA, L.; TELLES, M.; HIRATA, M.; DALCOLMO, M.; RABAHI, M.; CAILLEAUX-CESAR, F.; CESAR, M.; PALACI, M.; MORRONE, N.; GUERRA, R.; DIETZE, R.; MIRANDA, S.; CAVALCANTE, S.; NOGUEIRA, S.; NONATO, T.; MARTIRE, T.; GALESI, V.; DETTONI, V. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro Pneumologia**, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

CONDOS, R.; ROM, W.; SCHLUGENEIL, W. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-via aerosol. **The Lancet**, v. 349, n. 24, 1997.

COOPER, A.; DALTON, D.; STEWART, T.; GRIFFIN, J.; RUSSELL, D.; ORME, L. Disseminated Tuberculosis in Interferon γ Gene-disrupted Mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n.6, p. 2243-2247, 1993.

COOPER, A. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v.27, p. 393-422, 2009.

DIEL, R.; LODDENKEMPER, R.;NIENHAUS, A. Evidence-Based Comparison of Commercial Interferon- γ Release Assays for Detecting Active TB : A Metaanalysis. **CHEST**, v. 137, p. 952-968, 2010.

ERNST, J. Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1277-1281, 1998.

ERUSLANOV, E.; LYADOVA, I.; KONDRATIEVA, T.; MAJOROV, K.; SCHEGLOV, I.; ORLOVA, M.; ALEXANDER S. Neutrophil Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Genetically Susceptible and Resistant Mice. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1744-1753, 2005.

FENG, C.; BEAN, G.; HOOL, H.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3242-3247, 1999.

FERRARI, G.; LANGEN, H.; NAITO, M.; PIETERS, J. A Coat Protein on Phagosomes Involved in the Intracellular Survival of *Mycobacteria*. **Cell**, v. 97, n. 4, p. 435-447, 1999.

FLYNN, J. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis**, v. 84, p. 93- 101, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **QuantiFERON-TB Gold - P010033/S006**. approved in 2005. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/PMAApprovals/ucm110838.htm>>. Acessado em 11\03\2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **T-SPOT-TB - P070006, approved in 2008.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/PMAApprovals/ucm102794.htm>>. Acessado em 11\03\2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Quantiferon TB Gold Method in tube, approved in 2007.** Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMA/PMA.cfm?ID=4100>>. Acessado em 11\03\2012.

FUJIKI, A. **AFB Microscopy Training.** The Research Institute of Tuberculosis. Tokyo, 2005.

GARCIA-PEREZ, B.; MONDRAGON-FLORES, R.; LUNA-HERRERA, J. Internalization of Mycobacterium tuberculosis by macropinocytosis in non-phagocytic cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, n. 2, p. 49-55, 2003.

GOLETTI, D.; STEFANIA, C.; BUTERA, O.; AMICOSANTE, M.; ERNST, M.; SAUZULLO, I.; VULLO, V.; CIRILLO, D.; BORRONI, E.; MARKOVA, R.; DRENSKA, R.; DOMINGUEZ, J.; LATORRE, I.; ANGELETTI, C.; NAVARRA, A.; PETROSILLO, N.; LAURIA, F.; IPPOLITO, G.; MIGLIORI, G.; LANGE, C.; GIRARDI, E. Accuracy of Immunodiagnostic Tests for Active Tuberculosis Using Single and Combined Results: A Multicenter TBNET-Study. **Plos One**, n. 10, v.3, p. 1-9, 2008.

GONZALEZ-JUARRERO, M.; ORME, I. Characterization of murine lung dendritic cell infected with Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p.1127-1133, 2001.

GREINER, M.; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods** , v. 185, p. 123-132, 1995.

GREINER , M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): update version supports optimisation of cut-off values that minimise overall misclassification costs. **Journal of Immunological Methods** , v. 191, p. 93-94, 1996.

GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine** , v. 45, p. 23-41, 2000.

GUENIN-MACÉ, L.; SIMEONE, R.; DEMANGEL, C. Lipids of Pathogenic Mycobacteria: Contributions to Virulence and Host Immune Suppression. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 56 , n. 6-7, p. 255–268, 2009.

HASHEMI, M.; SHARIFI-MOOD, B.; NEZAMDOOST, M.; MOAZENI-ROODI, A.; NADERI, M.; KOUHPAYEH, H.; TAHERI, M.;GHAVAMI, S. Functional polymorphism

of interferon- γ (IFN- γ) gene +874T/A polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. **Prague Medical Report**, v. 112 , n. 1, p. 38-43, 2011.

HERNÁNDEZ-PANDO, R.; JEYANATHAN, M.; MENGISTU, G.; AGUILAR, D.; OROZCO, H.; HARBOE, M.; ROOK, G.; BJUNE, G. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. **The Lancet**, v. 356, n. 9248, p. 2133 - 2138, 2000.

JANEWAY, C.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia, o sistema immune na saúde e na doença**. 6ª. Edição, Editora Artmed, p. 76-97, 2007.

JONG, B.; ANTONIO, M.; AWINE, T.; OGUNGBEMI, K.; JONG, Y.; GAGNEUX S.; DERIEMER, K.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N.; BORGDORFF, M.; HILL, P.; ADEGBOLA, R. Use of spoligotyping and large sequence polymorphisms to study the population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in a cohort study of consecutive smear-positive tuberculosis cases in the gambia, **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 47, no. 4, p. 994–1001, 2009.

JONG, M.; ANTONIO, M.; GAGNEUX, S. *Mycobacterium africanum*-review of an important cause of human tuberculosis in West Africa, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

JORDAO, L.; VIEIRA, O. Tuberculosis: new aspects of an old disease. **Cell Biology International**, p. 1-13, 2011.

KÄLLENIUS, G.; KOIVULA, T.; GHEBREMICHAEL, S.; HOFFNER, S.; NORBERG, R.; SVENSSON, E.; DIAS, F.; MARKLUND, B.; SVENSON, S. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 3872–3878, 1999.

KASPER, D.; BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.; HAUSER, S.; LONGO, D.; JAMESON, J. **Harrison Medicina Interna**, 16ª edição. Editora McGraw Hill. v. 1, p.1002-1015, 2006.

KAUFMANN, S. Protection against tuberculosis: cytokines, t cells, and macrophages. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, suppl. 2, p. ii54-ii58, 2002.

KAUL, D.; ANAND, P.; VERMA, I. Cholesterol-sensor initiates M. tuberculosis entry into human macrophages. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 258, p. 219-222, 2004.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5. P. 637-650, 2011.

KELLAR, K.; GEHRKE, J.; WEIS, S.; MAHMUTOVIC-MAYHEW, A.; DAVILA, B.; ZAJDOWICZ, M.; SCARBOROUGH, R.; PHILIP, L.; LARDIZABA, A.; DALEY, C.; REVES, R.; BERNARDO, J.; CAMPBELL, B.; WHITWORTH, W.; MAZUREK, G. Multiple Cytokines Are Released When Blood from Patients with Tuberculosis Is Stimulated with *Mycobacterium tuberculosis* Antigens. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 1-17, 2012.

KOMIYA, K.; ARIGA, H.; NAGAI, H.; KURASHIMA, A.; SHOJI, S.; ISHII, H.; NAKAJIMA, Y. 1.Reversion rates of QuantiFERON-TB Gold are related to pre-treatment IFN-gamma levels. **Journal of Infection**, v. 63, n.1, p. 48-53, 2011.

LARRUBIA, J.; BENITO-MARTÍNEZ, S.; MIQUEL-PLAZA, J.; SANZ-DEVILLALOBOS, E.; GONZÁLEZ-MATEOS, F.; PARRA, T. Cytokines – their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis. **Revista Española de Enfermedades**, v. 101, n.5, p. 343-351, 2009.

LAYRE, E.; COLLMANN, A.; BASTIAN, M.; MARIOTTI, S.; CZAPLICKI, J.; PRANDI, J.; MORI, L.; STENGER, S.; DE LIBERO, G.; PUZO, G.; GILLERON, M. Mycolic Acids Constitute a Scaffold for Mycobacterial Lipid Antigens Stimulating CD1-Restricted T Cells. **Chemistry & Biology**, v. 16, n. 1, p. 82–92, 2009.

LEE, Y.; LEE, J.; KIM, Y.; WON, D.; CHA, S.; PARK, J.; JUNG, T.; KIM, C. Performance of whole-blood interferon-gamma release assay in patients admitted to the emergency department with pulmonary infiltrates. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, p 1- 7, 2011.

LEGESSE, M.; AMENI, G.; MAMO, G.; MEDHIN, G.; BJUNE, G.; ABEBE, F. Performance of QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFTGIT) for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) infection in Afar Pastoralists, Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 354, n. 10, p 1-10, 2010.

LUI, G.; LEE, N.; CHEUNG, S.; LAM, J.; WONG, B.; CHOI, K.; WONG, W.; COCKRAM, C.; HUI, D.; CHAN, R. Interferon gamma release assay for differentiating tuberculosis among pneumonia cases in acute healthcare setting. **Journal of Infection** v. 62, n. 6, p. 440-447, 2011.

MARREIRO, L.; SARAIVA, M.; AMORIM, R.; LOPES, L. Fundação de medicina tropical do amazonas.Diretoria de ensino, pesquisa e controle de endemias.Departamento de epidemiologia e saúde pública.Subgerência de vigilância epidemiológica. **Informe epidemiológico n.º 2/2005**, 2005.

MARTIRE, T. Diagnóstico laboratorial da tuberculose na infância: métodos convencionais e métodos rápidos. **Pulmao**, supl. 1, p. S20-S27, 2009.

MAZUREK, G.; JEREB, J.; LOBUE, P.; IADEMARCO, M.; METCHOCK, B.; VERNON, A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. Recommend. Rep. v. 54, RR-15, p. 49–55, 2005.

MAYER-BARBER, K.; ANDRADE, B.; BARBER, D.; HIENY, S.; FENG, C.; CASPAR, P.; OLAND, S.; GORDON, S.; SHER, A. Innate and Adaptive Interferons Suppress IL-1a and IL-1b Production by Distinct Pulmonary Myeloid Subsets during Mycobacterium tuberculosis Infection. **Immunity**, v. 35, p. 1023–1034, 2011.

MICHAEL, B.; DRENNAN, D.; VALERIE, J.; QUESNIAUX, M.; NASIEMA, A.; JOSEPH, M.; CÉCILE, F.; HERMANN, W.; CARSTEN, K.; BERNHARD, R. Toll-Like

Receptor 2-Deficient Mice Succumb to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **American Journal of Pathology**, v. 164, p. 49-57, 2004.

MIOSSEC, P.; KORN, T.; KUCHROO, V. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 9, p. 888-898, 2009.

MORÁN, J.; GONZÁLEZ-POLO, R.; SOLER, G.; FUENTES, J. Th1/Th2 cytokines: an easy model to study gene expression in immune cells. **CBE- Life Sciences Education**, v. 5, n. 3, p. 287-295, 2006.

MUÑOZ, S.; RIVAS-SANTIAGO, B.; ENCISO, J. *Mycobacterium tuberculosis* entry into mast cells through cholesterol-rich membrane microdomains. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 3, p. 256-263, 2009.

MURRAY, P. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 366-372, 1999.

OLIVEIRA, C.; BARROS, M.; SAKATA, R.; ISSY, A.; GEROLA, L.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OPPENHEIM, J. Cytokines: past, present, and future. **International Journal of Hematology**, v. 74, n. 1, p. 3-8, 2001.

Organización Panamericana de la Salud. **Manual para el diagnóstico bacteriológico de La tuberculosis**. Normas y guía técnica, parte 1: baciloscopia. OPS, Washington, 2008.

ORME M. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 5, n. 7, p. 589- 593, 2001.

OTTENHOFF, T.; VERRECK, F.; HOEVEA, M.; VOSSE, E. Erratum to control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberculosis**, v. 86, n. 1, p. 74–75, 2006.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. Princípios de Bioestatística. 2ª. edição traduzida. São Paulo, 2004. p123 – 131.

PCT-AM (PROGRAMA DE CONTROLE DA TUBERCULOSE DO ESTADO DO AMAZONAS). Informe Epidemiológico da Tuberculose no Amazonas. v.I, n. 01, p. 06-10, 2010.

PEYRON, P.; BORDIER, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; N'DIAYE, E. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 9, p. 5186-5191, 2000.

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 6, p. 399-407, 2008.

RIVAS-SANTIAGO, B.; SCHWANDER, S.; SARABIA, C.; DIAMOND, G.; KLEIN-

PATEL, M.; HERNANDEZ-PANDO, R.; ELLNER, J.; SADA, E. Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n.8, p. 4505-4511, 2005.

RUHWALD, M.; DOMINGHES, J.; LATORRE, I.; LOSI, M.; RICHELDI, L.; PASTICCI, M.; MAZZOLLA, R.; GOLETTI, D.; BUTERA, O.; BRUCHFELD, J.; GAINES, H.; GEROGIANNI, I.; TUUMINEN, T.; FERRARA, G.; EUGEN-OLSEN, J.; RAVN, P. A multicentre evaluation of the accuracy and performance of IP-10 for the diagnosis of infection with M. Tuberculosis. **Tuberculosis**, n. 91, p. 260-267, 2011.

RUTHERFORD, M.; ALISJAHBANA, B.; MAHARANI, W.; SAMPURNO, H.; CREVEL, R.; HILL, P. Sensitivity of the Quantiferon-Gold In-Tube Assay in Sputum Smear Positive TB cases in Indonesia. **Plos One**, v. 5, n. 8, p. 1-3, 2010.

SADA-OVALLE, I.; CHIBA, A.; GONZALES, A.; BRENNER, M.; BEHAR, S. Innate invariant NKT cells recognize Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. **PLoS Pathogens**, v.4, n.12, 2008.

SALEM, J.; GONTIJO-FILHO, P.; LÉVY-FRÉBAULT, V.; DAVID, H. Isolation and Characterization of Mycobacteria Colonizing the Healthy Skin. **Acta Leprologica**, v. 7, n. 1, p. 18-30, 1989a.

SALEM, J.; MAROJA, M.; CARVALHO, F.; LIMA, F.; FEUILLET, A. Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli in Sputum Specimens from Patients in Manaus (Amazônia, Brasil). **Acta Amazônica**, v. 19, p. 349-354, 1989b.

SALEM, J.; GADELHA, A.; MAROJA, F.; DAVID, H. Non-cultivable mycobacteria in ulcers of the skin. **Acta Leprologica**, v. 7, s. 1, p. 10-15, 1989c.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P.; RAVASI, T.; HUME, D. Interferon-gama an overview of signals, mechanism and functions. **Journal of Leukocyte**, v. 75, n.2, p. 163-189, 2004.

SOKOL, C.; CHU, N.; NISH, S.; LAUFER, T.; MEDZHITOV, R.; YU, S. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. **Nature Immunology**, v. 10, n. 7, p. 713-720, 2009.

SOKOL, C.; MEDZHITOV, R. Role of basophils in the initiation of Th2 responses. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 1, p. 73-77, 2010.

TAKI-EDDIN, L.; MONEM, F. Utility of an interferon-gamma release assay as a potential diagnostic aid for active pulmonary tuberculosis. **Journal of infection in developing countries**, v. 6, n. 1, p. 67-72, 2012.

TEIXEIRA, H.; ABRAMO, C.; MUNK, M. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n.3, p. 323-334, 2007.

THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; BLAS, I.; NOORDHUIZEN, J.; FRANKENA, K. Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. **Veterinary Record**, v. 148, n. 18, p. 567-572, 2001.

TRIFARI, S.; KAPLAN, C.; TRAN, E.; CRELLIN, N.; SPITS, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. **Nature Immunology**, v. 10, n. 8, p. 864-871, 2009.

VESENBECKH, S.; SCHONFELD, N.; MAUCH, H.; BERGMANN, T.; WAGNER S.; BAUER, T.; RUSSMANN, H.. The Use of Interferon Gamma Release Assays in the Diagnosis of Active Tuberculosis. **Tuberculosis Research and Treatment**, p. 1-4, 2012.

VIDHATE, M.; SINGH, M.; GARG, R.; VERMA, R.; SHUKLA, R. Diagnostic and prognostic value of Mycobacterium tuberculosis complex specific interferon gamma release assay in patients with tuberculous meningitis. **Journal of Infection**, v. 62, p. 400-403, 2011.

VILCEK, J.; FELDMANN, M. Historical review: cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 201-209, 2004.

ZENARO, E.; DONINI, M.; DUSI, S. Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, p. 1393-1401, 2009.

WALZL, G.; RONACHER, K.; HANEKOM, W.; SCRIBA, T.; ZUMLA, A. Immunological biomarkers of tuberculosis. **Nature Review Immunologic**, v. 11, p. 343-354, 2011.

WOLF, A.; DESVIGNES, L.; LINAS, B.; BANAIIE, N.; TAMURA, T.; TAKATSU, K.; ERNST, J. Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 1, p. 105-115, 2008.

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Programme. **WHO laboratory services in tuberculosis control, part II: microscopy**. WHO, Geneva, 1998.

World Health Organization (WHO). **Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report**. WHO, 2009 .

World Health Organization (WHO). **Global tuberculosis control: WHO report 2011**. WHO , 2011a.

World Health Organization (WHO). Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. WHO, 2011b.

World Health Organization (WHO). Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries: policy statement. WHO, 2011c.

WOZNIAK, T.; SAUNDERS, B.; RYAN, A.; BRITTON, W. Mycobacterium bovis BCG-specific Th17 cells confer partial protection against Mycobacterium tuberculosis infection in the absence of gamma interferon. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 10, p. 4187- 4194, 2010.

6. RESULTADOS

Na seção de Resultados, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada- UFAM, devem ser anexados os artigos na forma que foi submetido para publicação na língua inglesa e na língua portuguesa.

Artigo Original em Português

Avaliação do Interferon-gama em pacientes com Tuberculose pulmonar e contatos diretos, em Manaus, AM, Brasil

E. B. Santana Filho^a, M. M. Ogusku^c, M. M. T. Nishikido^a, T. T. Pinto^a, A. M. Lima^b, I. A. Antunes^c, J. S. Matsuda^{c,d}, J. V. B. Souza^b, L. B. M. Fujimoto^{b,e}, J. I. Salem^b, A. Sadahiro^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, 3000, General Rodrigo Octávio Jordão Ramos Av., Zip code 69077-000, Manaus, AM, Brazil

^b Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

^c Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes

^d Fiocruz Amazônia- Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

^e Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas.

RESUMO

Foram analisados os níveis de produção de IFN-gama, no sangue, em resposta a estímulos *in vitro* com ESAT-6, CFP10 e TB7.7, utilizando o teste QuantiFERON^R TB Gold (In-Tube Method) (QTF-IT), sendo considerado positivo a partir do Cut off de 0,35UI/mL. Foram analisadas 155 amostras sendo: 49 contatos diretos de pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar (grupo contato), 47 pacientes com TB pulmonar confirmada (grupo paciente) e 59 indivíduos sem história e contato pessoal com TB (grupo controle). Constatou-se diferença significativa ($p=0,0001$) nos níveis de IFN-gama entre os três grupos avaliados, sendo mais elevado no grupo paciente (Mediana = 1.43 UI/mL), dos quais 38/47 (80,9%) foram positivos para QTF-IT. Dos contatos diretos, 20/49 (40,8%) foram positivos para o QTF-IT (Mediana=0,26 UI/mL), e destes 14/20 (70,0%) apresentaram níveis elevados de IFN-gama, superior à 1,05 UI/mL. A validação realizada entre doentes e controles apresentou uma sensibilidade de sensibilidade 80,9% (IC 95% = 69,6% a 92,1%) e especificidade de 93,2% (IC 95% = 86,8% a 99,6%). Quando os resultados do grupo contato foram adicionados ao grupo controle, a especificidade reduziu para 77,8% (IC 95% = 69,9% a 85,6%). Concluiu-se que há um perfil diferenciado na produção de IFN-gama, com níveis mais elevados nos pacientes de TB ativa. Os contatos positivos para o QTF-IT com níveis elevados de IFN-gama, recomenda-se o monitoramento, pois este resultado pode ser um fator de risco para TB. O QTF-IT apresentou um bom desempenho, na população investigada, e pode ser útil para auxiliar na identificação da TB latente (infecção) e ativa, mas deve ser avaliado em conjunto com outros exames de rotina.

Palavras chave: IGRA; Tuberculose; Interferon-gama; Quantiferon

1. INTRODUÇÃO

Apesar do Brasil atualmente ter a estimativa de sétima economia mundial¹, possui uma distribuição de renda desigual e alta incidência tanto de Tuberculose (TB) quanto de HIV². Ocupa o 18º. lugar entre os 22 países de maior endemicidade da TB³, com coeficiente de incidência 37,7/100.000 hab, sendo o estado do Amazonas o segundo lugar nacional com 67,7/100.000 hab⁴, e a capital do estado com 89,0/100.000 hab⁵, superior ao dobro da a incidência nacional. No referido panorama é fundamental a utilização de testes que possam auxiliar na identificação de indivíduos infectados, sejam contactantes ou não de pacientes com TB.

Entre os atuais testes imunológicos destaca-se o IGRA (Interferon-gamma release assay)⁶⁻¹⁰. O teste depende da presença de células Th1 previamente sensibilizadas no organismo humano pelo bacilo da TB, que na presença, dos derivados protéicos específicos do bacilo, in vitro, produzem o IFN-gama^{11,12}.

A importante participação do IFN-gama na TB tem sido citada em diversos trabalhos^{13,6,14-17}, fato que estimulou a comunidade científica a investigar esta citocina no diagnóstico de pessoas com TB latente e/ou TB ativa.

Segundo avaliação da organização mundial de saúde¹⁸, ainda há dados insuficientes sobre o desempenho do IGRA nos países de baixa e média renda, tipicamente aqueles com alta incidência de TB e ou HIV. Entre esses se situa o Brasil (74º per capita income countries)¹. Este fato motivou a presente pesquisa devido à cidade de Manaus, capital do Estado do Amazonas/Brasil, ter alta incidência de TB e estar na sexta posição brasileira do Produto Interno Bruto (PIB)¹⁹.

Mediante o exposto o principal objetivo deste trabalho foi analisar os resultados do IGRA em pacientes e contatos direto de TB, tendo indivíduos sem

história e contato pessoal com TB como grupo controle, em Manaus, Amazonas, Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho e Grupos de estudo

Estudo descritivo e prospectivo do tipo detecção de caso para avaliar a concentração de IFN-gama, utilizando o teste de QuantiFERON^R TB Gold (In-Tube Method) (QTF-IT)²⁰. O total de participantes foi de 155, na faixa etária de 15 a 65 anos, de ambos os gêneros, distribuídos em três grupos de estudo: 47 pacientes com TB pulmonar confirmadas por baciloscopia e/ou cultivo (grupo paciente), 49 contatos diretos de pacientes recentemente diagnosticados para TB pulmonar (grupo contato), e 59 indivíduos sem história e contato pessoal com TB (grupo controle).

Os pacientes foram selecionados aleatoriamente no período de 01/03/2011 a 01/11/2011, juntamente com seus contatos, na Policlínica em Pneumologia Cardoso Fontes, na cidade de Manaus - AM (Brasil). Os controles foram admitidos no mesmo período, constituído em sua maioria por estudantes de graduação ou pós-graduação. Nenhum dos participantes apresentava, no momento da coleta anti-HIV(+), ou referia câncer, diabetes, doenças auto-imunes ou gravidez.

2.2 Procedimentos

Todos os pacientes foram submetidos a exames clínico, bacteriológico (baciloscopia e cultivo das secreções pulmonares) e a coleta de informações epidemiológicas. Nos contatos realizou-se a coleta de informações epidemiológicas, a Prova tuberculínica (PT) nos que aceitaram e exame bacteriológico daqueles que

apresentavam sintoma de tosse. Nos participantes do grupo controle realizou-se apenas a coleta de informações epidemiológicas visto nenhum dos mesmos apresentarem o sintoma tosse ou secreções respiratórias para realização de exame bacteriológico.

De todos os participantes foram coletados 3 mL de sangue periférico para análise do IFN-gama utilizando o Kit QTF-IT²⁰. As leituras do teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) foram realizadas em espectrofotômetro de placa com filtro de 450nm, conforme orientações do Kit. Os resultados foram transferidos para o programa QFT versão 2.17.3, disponibilizado pelo fabricante do Kit, obtendo-se assim a curva padrão e a concentração de IFN-gama em Unidade Internacional por mililitros (UI/mL). Para definição de positividade utilizou-se o valor recomendado pelo Kit - igual ou superior a 0,35 UI/mL de IFN-gama.

A Prova tuberculínica foi realizada, após a coleta da amostra de sangue, inoculando-se 0,1 mL do “purified protein derivative” (PPD-RT23, Dinamarca), equivalente a 2 UT (unidades de tuberculina), por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo. A leitura do teste foi realizada após 72 horas, e o maior diâmetro transversal da área do endurecimento palpável foi medido e registrado em milímetros (mm). A PT neste estudo foi considerada positiva quando igual ou maior que 5 mm²¹.

Os exames bacteriológicos foram efetuados conforme estabelecido por Salem et al. (2007)²².

2.3 Análise estatística

A análise dos resultados de IFN-gama, entre os pacientes, contatos e controles, foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis. A correlação entre os

resultados da PT e de IFN-gama, nos contatos, foi realizada por teste de Spearman²³. A sensibilidade e especificidade foi ilustrada usando-se a curva ROC (receiver operator characteristic curve)²⁴⁻²⁶ elaborada no programa Win Episcopes 2.0²⁷. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

3. RESULTADOS

Participaram do estudo 155 indivíduos, sendo: 47 participantes no grupo paciente, 49 no grupo contato e 59 no grupo controle.

Vale ressaltar que inicialmente foram incluídos 156 indivíduos, mas no grupo dos contatos uma pessoa apresentava tosse e por isso foi submetida a exame bacteriológico. O resultado do cultivo confirmou TB ativa, motivo pelo qual se excluiu do estudo para manter a aleatoriedade na captação dos diferentes grupos.

As características demográficas dos 155 indivíduos avaliados, distribuídos nos três grupos, estão apresentadas na Tabela 1. Na Tabela 2 os grupos estão distribuídos de acordo com os níveis de IFN-gama.

Os níveis de IFN-gama encontrados estão apresentados na Figura 1. A análise de correlação, entre o QTF-IT e a PT (Figura 2), foi realizada apenas em 34 contatos que aceitaram realizar os dois exames. Os resultados estatísticos indicaram a existência de correlação ($p = 0,0431$) entre os dois parâmetros imunológicos, embora o coeficiente de correlação de Spearman tenha sido baixo ($r=0,4836$) (Figura 2).

O desempenho do QTF-IT foi avaliado considerando os portadores de TB como verdadeiros doentes e o grupo controle como sadios. A sensibilidade e especificidade foram superiores a 80% (Figura 3A), porém quando a avaliação foi

realizada adicionando os contatos ao grupo controle, a especificidade foi de 77,8% (Figura 3B).

4. DISCUSSÃO

Dos 47 pacientes avaliados, 38 foram positivos para o QTF-IT, e destes 27 tiveram níveis elevados de IFN-gama. Neste sentido, vale ressaltar que mesmo com a ativação da resposta imune celular Th1 e produção IFN-gama necessário para o controle bacteriano, esses pacientes não conseguiram evitar o desenvolvimento da doença.

Logo respostas imunitárias adicionais a Th1, necessárias para conferir uma proteção ótima contra o bacilo tem sido analisadas. Estudos têm investigados outros subconjuntos de células T que são estimuladas por *M. tuberculosis*, como as células Th 17 produtora da citocina inflamatórias IL- 17 , mostrando que as respostas Th1 e Th17 regulam a infecção micobacteriana e isto pode ser importante para os processos imunopatológicos na tuberculose ²⁸.

É possível que nesses 27 pacientes, tenha ocorrido o desequilíbrio da resposta Th1/Th17, estabelecendo um predomínio de Th1, que não foi suficientemente capaz de conter o foco da infecção.

Por outro lado, nove pacientes foram negativos para o ensaio de liberação de IFN-gama. As possíveis explicações seriam por não terem conseguido organizar uma resposta imune celular protetora, nem Th1 e nem Th17²⁸, ou devido às condições debilitantes da doença²⁹ ou, ainda, esses indivíduos poderiam ser naturalmente tolerantes aos estímulos testados (ESAT-6, CFP10 e TB7.7) ²⁹. No presente estudo, acreditamos que a última explicação seja a mais provável, pois o

controle de estímulo inespecífico com o mitógeno, que avalia a funcionalidade celular, foi positivo.

Casos negativos de QTF-G em pacientes com TB ativa foram observados no trabalho de³⁰, onde de 140 pacientes 10 foram negativos (7,1%). Os autores sugerem dois padrões, sendo o primeiro devido à idade avançada ou linfopenia dos pacientes e o segundo pelo fato dos linfócitos, de pacientes jovens, não terem conseguido produzir IFN-gama aos estímulos dos antígenos de *M. tuberculosis*. No presente trabalho não foram evidenciadas essas situações, apesar de se ter obtido percentuais de negatividade bem superiores (19,1%).

Em relação aos 49 contatos, 20 foram positivos para o QTF-IT. Destes, 14 tiveram altas concentrações de IFN-gama ($>1,05$ UI/mL), indicando estímulos frequentes ao sistema imunológico, a partir de bacilos transmitidos pelos pacientes índice. Outra possibilidade é de que os contatos não conseguem eliminar todos os bacilos viáveis, e estes induzem estímulos contínuos, mantendo em alerta a resposta imune celular. Vale ressaltar que esses contatos positivos não apresentavam, no momento da coleta de sangue, sinais e sintomas clínicos da TB. Mesmo assim, não se pode descartar a possibilidade de doença, pois ainda, não há parâmetros seguros que possam definir o limite da infecção latente e início da TB ativa¹⁷.

No entanto, Higuchi et al. (2008)³¹ realizaram um estudo com 172 contatos. Destes 111 (64,5%) foram positivos para o QuantiFERON[®] TB GOLD (QTF-G), dos quais 35 (31,5%) foram diagnosticados para TB ativa, baseados somente nas alterações radiológicas. A maioria, destes pacientes, apresentou níveis elevados de IFN-gama, e os autores concluíram que os altos níveis da citocina podem ser um fator de risco para progressão da TB. Comparado ao presente estudo, o número de

contatos positivos ao QTF-IT foi menor (40,8%), e dos que apresentaram níveis elevados de IFN-gama, nenhum apresentou sintomas da TB.

Quanto aos controles, dos 59 analisados quatro foram positivos para o QTF-IT, dados que sugerem infecção prévia ao bacilo da TB, principalmente, por estarem numa região endêmica da doença.

Na análise de correlação entre os níveis de IFN-gama e os resultados da PT, os dados não apresentaram uma distribuição linear evidente, apesar de estatisticamente significativa ($p=0,0431$). É provável que exista uma correlação entre os testes, pois os dois avaliam a resposta imune celular. Além disso, os resultados de contatos com PT positiva e QTF-IT negativo foram comuns, e podem estar refletindo a reatividade cruzada da PT com as micobactérias ambientais e/ou a vacinação pela BCG³². Nesta situação, o QTF-IT poderá ser útil para ajudar na definição dos casos de tratamento preventivo dos contatos de TB.

No entanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) não recomendou a substituição da PT, pelos testes de IGRA, principalmente, nos países de baixa e média renda, que possuem alta incidência de TB e/ou HIV, por concluir que tanto o IGRA quanto a PT não possuem acurácia suficiente para predizer o risco dos indivíduos infectados desenvolverem a TB ativa¹⁸.

Além disso, um estudo recente de meta-análise demonstrou que o IGRA positivo, assim como a PT, apresentam de fraca a média associação com o risco de evoluírem para TB ativa³³.

Neste contexto, um estudo longitudinal rigoroso deve ser realizado, monitorando principalmente, os casos de contatos positivos para o IGRA e com níveis elevados de IFN-gama, padrão observado na maioria dos pacientes com TB, e sugerido por Higuchi et al. (2008)³¹ como um fator de risco para doença ativa.

Em relação ao desempenho do QTF-IT, a sensibilidade e especificidade foram comparáveis aos obtidos nos países de alta renda³⁴⁻³⁶. No entanto, quando os contatos foram adicionados na avaliação do teste, a especificidade reduziu, mas foi superior aos observados nos países de alta endemicidade da TB^{10, 37-39}.

Finalmente, conclui-se que os níveis de IFN-gama foram mais elevados nos pacientes com TB ativa. Apesar da avaliação da OMS sobre os IGRAs, o desempenho obtido do QTF-IT na população de estudo, está dentro de um teste aceitável. Sugerindo que o QTF-IT poderá ser útil como auxílio diagnóstico para TB latente e ativa, mas condicionada a avaliação médica e a outros exames de rotina.

REFERÊNCIAS:

1. IMF, International Monetary Fund. World Economic Outlook Database-September, 2011, [http://www.imf.org/external /pub s/ft/weo/ 2011/02/ weodata/](http://www.imf.org/external/pub s/ft/weo/ 2011/02/ weodata/) (Acesso em março 2012).
2. The WHO. Tuberculosis profile Brazil. www.who.int/tb/data, 2011. (Acesso em janeiro de 2012).
3. The WHO Global Tuberculosis Control: 2011, http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ISBN 1978 92 4 156438 0 (Acesso em outubro de 2011).
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Tuberculose - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação no ano de 2011 – Sinan Net. Brasília: Ministério da Saúde, 2011, <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def> (Acesso em março de 2012).
5. SEMSA, Secretaria Municipal de Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental. Análise das Ações para o Controle da Tuberculose em Manaus. Manaus-Amazonas, 2012, 35p.

6. Pai M, Riley L, Colford Jr J. Interferon-gamma assay in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:761-776.
7. Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, Magdorf K. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007; 45(3):322-328.
8. Kanunfre K, Leite O, Lopes M, Litvoc M, Ferreira A. Enhancement of Diagnostic Efficiency by a Gamma Interferon Release Assay for Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(6):1028–1030.
9. Janssens JP, Roux-Lombard P, Perneger T, Metzger M, Vivien R, Rochat T. Contribution of a IFN-gamma assay in contact tracing for tuberculosis in a low-incidence, high immigration area. *Swiss Med Wkly*. 2008; 138(39-40):585-593.
10. Legesse M, Ameni G, Mamo G, Medhin G, Bjune G, Abebe F. Performance of QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFTGIT) for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) infection in Afar Pastoralists, Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2010;10:354.
11. Goletti D, Vincenti D, Carrara S, Butera O, Bizzoni F, Bernardini G, Amicosante M, Girardi E. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunospot assay. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(11):1311-1316.
12. Goletti D, Raja A, Ahamed Kabeer BS, Rodrigues C, Sodha A, Butera O, Carrara S, Vernet G, Longuet C, Ippolito G, Thangaraj S, Lepointier M, Girardi E, Lagrange PH. J Infect. IFN-gamma, but not IP-10, MCP-2 or IL-2 response to RD1 selected peptides associates to active tuberculosis. 2010; 61(2):133-143.

- 13.** Kaufmann S. Protection against tuberculosis: cytokines, t cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: ii54-ii58.
- 14.** Rayamajhi M, Humann J, Kearney S, Hill KK, Lenz LL. Antagonistic crosstalk between type I and II interferons and increased host susceptibility to bacterial infections. *Virulence*. 2010; 1(5):418-22.
- 15.** Robinson C, O'Dee D, Hamilton T, Nau G. Cytokines Involved in Interferon-gamma Production by Human Macrophages. *J Innate Immun* 2010;2:56–65.
- 16.** Ahmad S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. *ClinDevImmunol*. 2011:814-943.
- 17.** Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba T, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis, *Nat Rev Immunol* 2011;11: 343-354 .
- 18.** The WHO. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries: policy statement. http://www.who.int/tb/.../policy_statement_igra_oct20 (Acesso em dezembro de 2011).
- 19.** IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Posição ocupada pelos 100 maiores municípios em relação ao Produto Interno Bruto, segundo os municípios e as respectivas Unidades da Federação – 2009. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica> (Acesso em março de 2012).
- 20.** CELLESTIS INC. QuantiFERON TB GOLD: precision and reproducibility report. Cellestis, Valencia, CA., 2007. www.cellestis.com (Acesso em agosto de 2009).
- 21.** BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, p.40, 2011.

- 22.** Salem J, Carvalho C, Ogusku M, Maia R, Ruffino-Netto A. Pko – Alternativemethod for isolatingmycobacteriumfromsputum. *Acta Amazônica* 2007; 37:419-424.
- 23.** Callegari-Jacques S. Bioestatística, princípios e aplicações. EditoraArtmed. Porto Alegre, 2003.
- 24.** Greiner M, Sohr D, Gobel P.A modified ROC analysis for the selection of cut off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Methods.*, v. 185, p.123-132, 1995.
- 25.** Greiner M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): update version supports optimisation of cut-off values that minimiseoverall misclassification costs. *J. Immunol. Methods.*, v. 191, p.93-94, 1996.
- 26.** Greiner M, Pfeiffer D, Smith R. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.*, v. 45, p.23-41, 2000.
- 27.** Thrusfield M, Ortega C, De Blas I, Noordhuizen J, Frankena K. Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*, v.148, p. 567-572, 2001.
- 28.** Chatterjee S, Dwivedi V, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, Van Kaer L, Chattopadhyay D, Das G. Early Secreted Antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Protective T Helper 17 Cell Responses in a Toll-Like Receptor-2-dependent Manner.*PLoSPathog* 2011; 7: 1-12.
- 29.** Hang N, Lien L, Kobayashi N,Shimbo T, Sakurada S,Thuong P, Hong L, Tam D,Hijikata M, Matsushita I, Hung N, Higuchi K, Harada N,Keicho N.Analysis of factors lowering sensitivity of interferon- γ release assay for tuberculosis. *PLoS One* 2011;6:1-8.

- 30.** Kobashi Y, Shimizu H, Ohue Y, Mouri K, Obase Y, Miyashita N, Oka M. False Negative Results of quantiFERON TB – 2G test in Patients with Active Tuberculosis. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62:300-302.
- 31.** Higuchi K, Harada N, Fukazawa K, Mori T. Relationship between whole-blood interferon-gamma responses and the risk of active tuberculosis. *Tuberculosis* 2008; 88: 244-248.
- 32.** Zwerling A, Behr M, Verma A, Brewer T, Menzies D, Pai M. The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. *PLoS Med.* 2011;8:1-8.
- 33.** Rangaka M, Wilkinson K, Glynn, J, Ling D, Menzies D, Mwansa-Kambafwile J, Fielding K, Wilkinson R, Pai M. Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012; 12:45-55.
- 34.** Harada N, Higuchi K, Yoshiyama T, Kawabe Y, Fujita A, Sasaki Y, Horiba M, Mitarai S, Yonemaru M, Ogata H, Ariga H, Kurashima A, Wada A, Takamori M, Yamagishi F, Suzuki K, Mori T, Ishikawa N. Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect* 2008;56:348–353.
- 35.** Ruhwald M, Dominguez J, Latorre I, Losi M, Richeldi L, Pasticci MB, Mazzolla R, Goletti D, Butera O, Bruchfeld J, Gaines H, Gerogianni I, Tuuminen T, Ferrara G, Eugen-Olsen J, Ravn P. A multicentre evaluation of the accuracy and performance of IP-10 for the diagnosis of infection with *M. Tuberculosis*. *Tuberculosis* 2011;91:260-267.

36. Vesenbeckh S, Schönfeld N, Mauch H, Bergmann T, Wagner S, Bauer T, Rüssmann H. The Use of Interferon Gamma Release Assays in the Diagnosis of Active Tuberculosis. *Tuberculosis Research and Treatment*, 2012; 1-4.
37. Kang YA, Lee HW, Hwang SS, Um SW, Han SK, Shim YS, Yim JJ. Usefulness of whole-blood interferon-gamma assay and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest*. 2007;132(3):959-965.
38. Leung WL, Law KL, Leung VS, Yip CW, Leung CC, Tam CM, Kam KM. Comparison of intracellular cytokine flow cytometry and an enzyme immunoassay for evaluation of cellular immune response to active tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(3):344-351.
39. Khalili T, Nakhaee A, Salehi M, Kariminia A. A validity study of the QuantiFERON-TB Gold (QFT-TB) method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high risk population. *Swiss Med Wkly*. 2010;140(5-6):95-96.

Agradecimentos:

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e a Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por permitir a execução deste trabalho.

Aspectos éticos: Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética do (INPA) sob No.223/09

Conflito de interesses: Não há conflito de interesse

Tabela 1. Características gerais dos pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar, contatos diretos e controles investigados no presente estudo:

Característica	Pacientes de TB (n=47)	Contatos diretos (n=49)	Controles (n=59)
Idade (anos) (Média e Desvio padrão)	35 ± 14	36 ± 14	28,0 ± 7,0
Tabagismo (%) :			
Sim	21,3%	24,3%	3,6%
Não	78,7%	75,5%	96,4%
Vacina BCG (%) :			
Sim	90,9%	85,7%	97,6%
Não	9,1%	14,3%	2,4%
Gênero (%) :			
Masculino	68,1%	34,7%	37,3%
Feminino	31,9%	65,3%	62,7%

Tabela 2. Distribuição dos pacientes de TB, contatos e controles de acordo com os níveis de IFN-gama:

IFN-gama (UI/mL)	Pacientes N (%)	Contatos N (%)	Controles N (%)
> 1,05 (Alta)	27 (57,5)	14 (28,6)	3 (5,1)
0,71 a 1,05 (Média)	1 (2,1)	1 (2,0)	0 (0,0)
0,35 a 0,70 (Baixa)	10 (21,3)	5 (10,2)	1 (1,7)
< 0,35 (negativo)	9 (19,1)	29 (59,2)	55 (93,2)
TOTAL	47 (100,0)	49 (100,0)	59 (100,0)

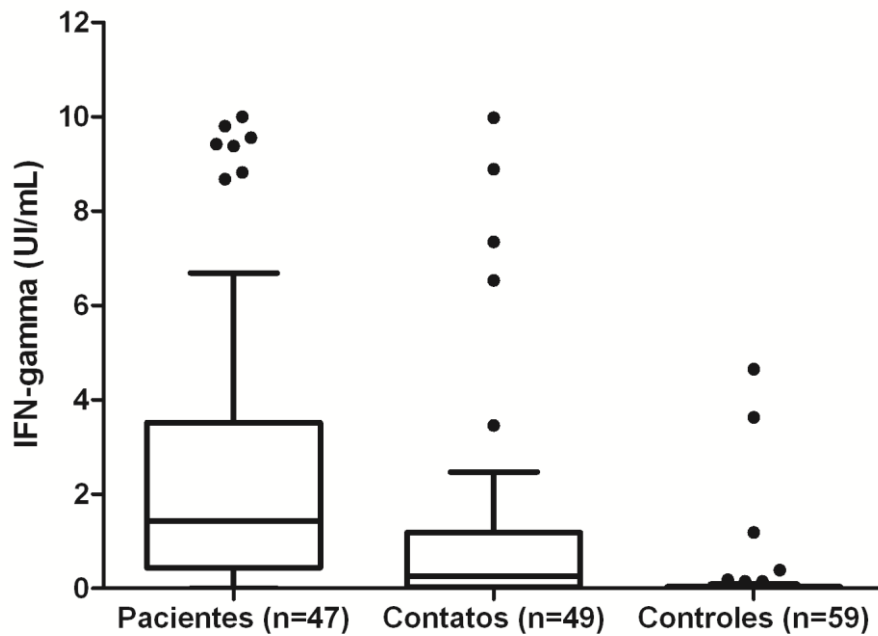


Figura 1. Níveis de IFN-gama (UI/mL), detectados pelo QuantiFERON[®] TB Gold (In-tube Method), de pacientes com TB pulmonar (n=47), contatos (n=49) e controles (n=59). Para comparações dos níveis de IFN-gama entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ($p=0,0001$), e para as comparações múltiplas foi aplicado o pós-teste de Dunn's: Pacientes x Contatos ($p=0,001$); Pacientes x Controles ($p=0,0001$); Contatos x Controles ($p=0,001$). No gráfico de "Box-Whisker Plot", os pontos fora do Box indicam os valores "outlier". Valores das Medianas (Med): Pacientes Med = 1.43 UI/mL, Contatos Med = 0,26 UI/mL e controles Med = 0,01 UI/mL.

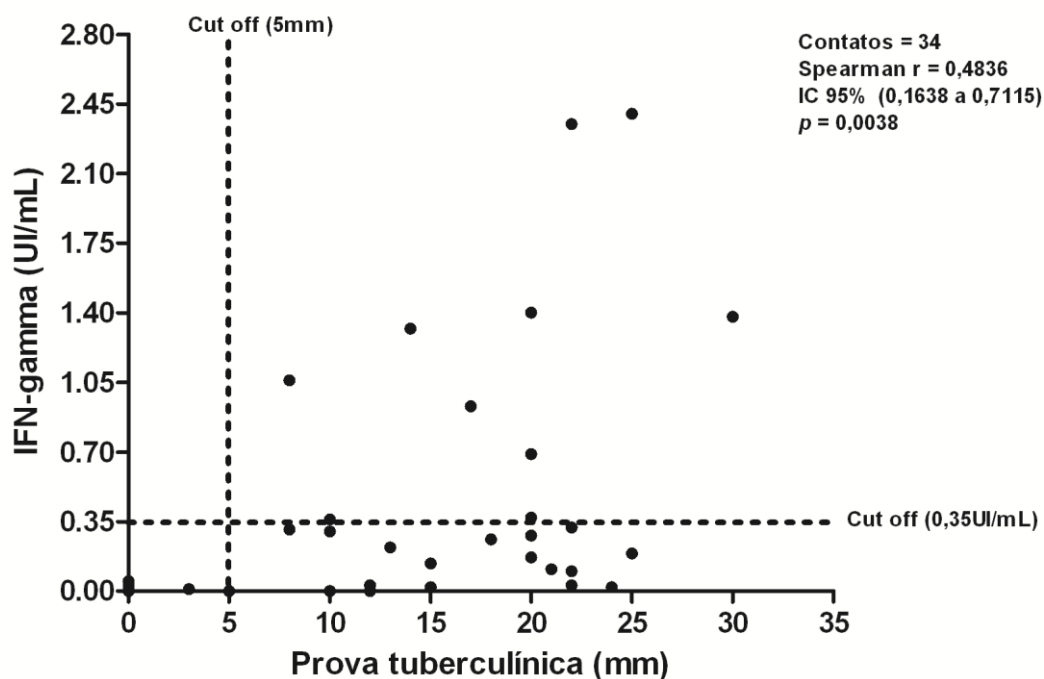
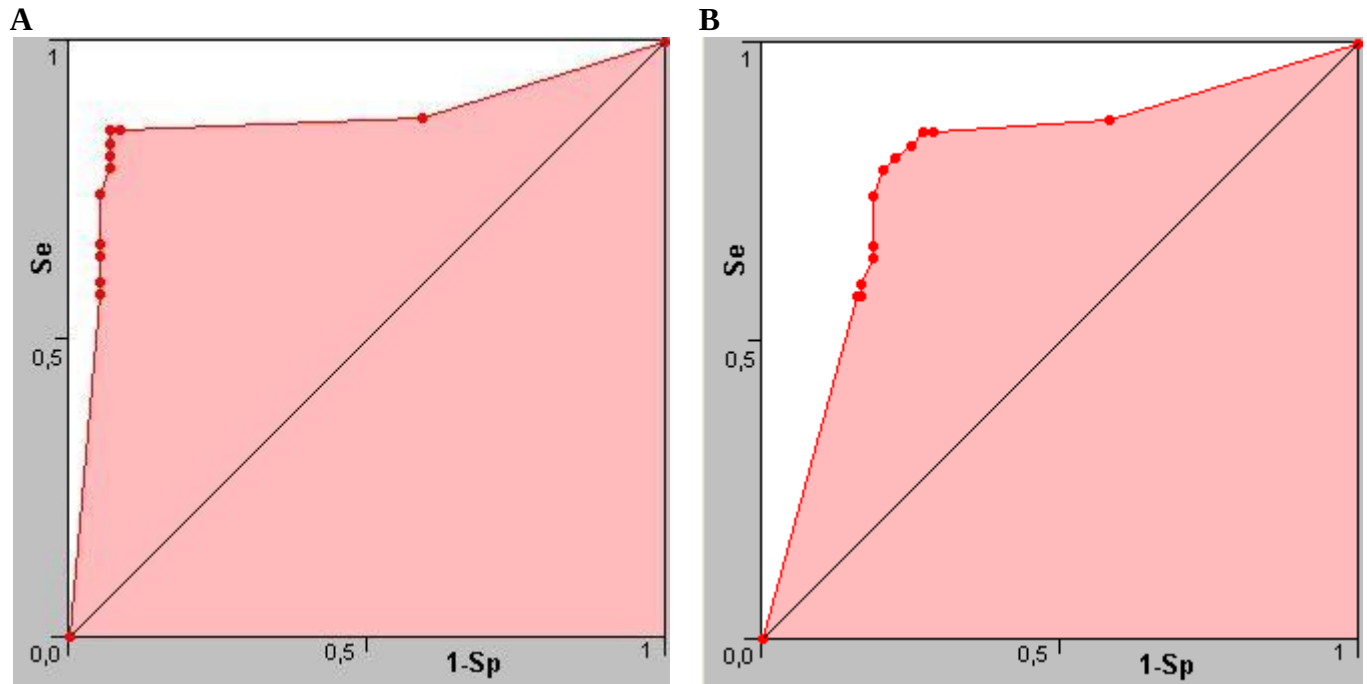


Figura 2. Correlação entre os níveis de produção de IFN-gama (UI/mL) e Prova tuberculínica (mm) em contatos (n=34) de pacientes com TB recentemente diagnosticados. Teste de correlação de Spearman.



Se – Sensibilidade 1-Sp – um menos a Especificidade

Figura 3 A Curva ROC (Receiver Operator Characteristic Curve) representando os resultados de sensibilidade e especificidade, do desempenho do teste QuantiFERON[®] TB Gold (In-tube Method). **A**-Resultados dos testes em pacientes (n=47) versus controles (n=59), sensibilidade 80,9% (IC 95% = 69,6% a 92,1%) e especificidade 93,2% (IC 95% = 86,8% a 99,6%); área da curva 86,1% (Mínimo 81,8 – Máximo 90,4); VPP= 90,5% (IC 95% = 81,6% a 99,4%) e VPN= 85,9% (IC 95% = 77,4% a 94,5%). **B**-Resultados dos testes em pacientes (n=47) versus controles (n=59) acrescidos dos contatos (n=49) e, sensibilidade 80,9% (IC 95% = 69,6% a 92,1%) e especificidade 77,8% (IC 95% = 69,9% a 85,6%); área da curva 79,0% (Mínimo 74,9 – Máximo 83,2); VPP= 61,3% (IC 95% = 49,2% a 73,4%) e VPN= 90,3% (IC 95% = 84,3% a 96,3%). Cut off = 0,35 UI/mL de IFN-gama.

Artigo Original versão em inglês

Interferon-gamma Evaluation in Pulmonary Tuberculosis Patients and their Direct Contacts in Manaus, AM, Brazil

E. B. Santana Filho ^a, M. M. Ogusku ^c, M. M. T. Nishikido ^e, T. T. Pinto ^a, A. M. Lima ^b, I. A. Antunes ^c, J. S. Matsuda ^{c,d}, J. V. B. Souza ^b, L. B. M. Fujimoto ^{b,e}, J. I. Salem ^b, A. Sadahiro ^{a,b*}

^a Post Graduate Program for Basic and Applied Immunology, Institute of Biological Sciences, , 3000, General Rodrigo Octávio Ramos Jordão Avenue, Zip code 69077-000, Manaus, AM, Brazil

^b Mycobacteriology Laboratory of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, 2936, André Araújo Avenue, Aleixo, Zip code 69060-001, Manaus, AM, Brazil.

^c Polyclinic of Pulmonology Cardoso Fontes, Reference Center, 222, Lobo D'almada Street, Zip Code 69010-030, Manaus, AM, Brazil.

^d Fiocruz, Amazon Research Center Leonidas and Maria Deane, 476, Teresina Street, Adrianópolis, Zip Code 69057-070, Manaus, AM, Brazil.

^e Federal University of Amazonas, UFAM, Medicine School, 1053, Afonso Pena Street, Praça 14, Zip Code 69020-000, Manaus, AM, Brazil.

SUMMARY

The level of IFN- γ produced in response to *in vitro* stimulation with ESAT-6, TB7.7 and CFP10 was measured using the QuantiFERON^R TB Gold assay (in-tube method) (QTF-IT). Levels ≥ 0.35 IU/mL were considered to be positive. A total of 155 samples were evaluated: 47 confirmed tuberculosis (TB) cases (Patient Group), 49 direct contacts (Contact Group) and 59 individuals without history or contact with TB (Control Group). Significant differences ($p = 0.0001$) were found in the levels of IFN- γ among the three groups; the highest level was observed in the Patient Group (median = 1.43 IU/mL), in which 38/47 (80.9%) patients were positive according to the QTF-IT assay. In the Contact Group, 20/49 (40.8%) subjects were positive according to the QTF-IT assay (median = 0.26 IU/mL), and among these positive contacts, 14/20 (70.0%) exhibited high levels of IFN- γ (>1.05 IU/ml). Analysis of the QTF-IT results for the Patient and Control Groups showed a sensitivity of 80.9% (95% CI = 69.6% to 92.1%) and a specificity of 93.2% (95% CI = 86.8 to 99.6%). However, this specificity decreased to 77.8% (95% CI = 69.9% to 85.6%) when the Contact and Control Groups were combined. Thus, according to our data, the IFN- γ results yielded distinguishable profiles, and higher levels were observed in the Patient Group. The QTF-IT-positive individuals in the Contact Group should be monitored, especially those individuals with high levels of IFN- γ . This result may be a risk factor for active TB. The QTF-IT assay exhibited good performance in the studied population and may be useful in the identification of cases of latent and active TB (infection), but the results should be carefully evaluated in conjunction with the results of other routine tests and clinical examination.

Keywords: Tuberculosis; Interferon-gamma; QuantiFERON^R TB Gold (in-tube method); IGRA

1. INTRODUCTION

Brazil is the seventh largest economy in the world ¹; however, it also has unequal income distribution and high incidences of tuberculosis (TB) and HIV ². In 2010, Brazil was 18th among the 22 countries in the world with the highest endemicity of TB ³.

In 2011, the incidence of TB in Brazil was 36.0/100,000 inhabitants ⁴, with Amazonas state having the highest incidence of TB in Brazil at 62.6/100,000 inhabitants ⁴. Manaus, the capital city of Amazonas state, has an incidence twice the national rate (89.0/100,000 inhabitants) ⁵.

Because of this high incidence of TB, it is essential to use tests that can assist in the identification of infected individuals, including infected contacts of TB patients.

Among the current immunological tests for TB, the IGRA (interferon-gamma release assay) has been extensively investigated ⁶⁻¹⁰. This test is based on the pre-sensitization of Th1 cells by the TB bacillus; in the presence of specific proteins (derived from *Mycobacterium tuberculosis*), these cells produce IFN- γ *in vitro* ^{11,12}.

The importance of IFN- γ in TB has been described in several papers ^{6,13,14-17}, which has prompted the scientific community to investigate this cytokine in the diagnosis of latent or active TB.

Many factors motivated this study, as described below. According to the World Health Organization ¹⁸ (WHO), there are insufficient data regarding the performance of the IGRA in low- and middle-income countries, which are typically the countries with high incidences of TB and HIV. Brazil ranks 74th in the world with respect to per capita income ¹. The city of Manaus ranks sixth with respect to the Brazilian gross domestic product (GDP) ¹⁹; however, it has a high incidence of TB.

The aim of this study was to analyze the results of IGRA used to evaluate TB cases and their direct contacts in Manaus, Amazonas, Brazil.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Design and Study Groups

A prospective and descriptive study was carried out to determine the concentration of IFN- γ using the QuantiFERON^R TB Gold assay (in-tube method) (QTF-IT)²⁰. The test was performed on individuals of both sexes between 15 and 65 years old. The study subjects were divided into three groups: 1) patients with confirmed pulmonary TB (Patient Group), 2) direct contacts of patients recently diagnosed with pulmonary TB (Contact Group) and 3) individuals with no history or personal contact with TB (Control Group).

The patients and their contacts were randomly selected between March and November 2011 among patients of the Polyclinic of Pulmonology Cardoso Fontes, city of Manaus, Amazonas (AM), Brazil. The Control Group was recruited during the same period and was mostly composed of undergraduate students. At the time of this study, none of the subjects had HIV (+) or reported cancer, diabetes or autoimmune diseases, and none of the subjects were pregnant.

2.3 Procedures

The Patient Group was subjected to clinical and bacteriological assays (smear analysis and culturing of pulmonary secretions). The subjects in the Contact Group were subjected to the tuberculin skin test (TST), and those with a cough were also subjected to the bacteriological assays. Epidemiological data were obtained for all of the groups, including the Control Group; in this group, none of the individuals

presented with cough or respiratory secretions that required a bacteriological examination.

Peripheral blood (3 mL) was collected from all of the participants for IFN- γ analysis using the QTF Kit-IT²⁰. An ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was conducted with a spectrophotometer plate (iMark™ Bio-Rad Laboratories, USA), and the results were read at 450 nm and 620 nm (reference) as described in the kit guidelines. The results were transferred to the QFT program, version 2.17.3, which was provided by the kit manufacturer, and this program was used to obtain the standard curve and quantify IFN- γ concentration in International Units (IU/mL). Samples were considered to be positive if the value was greater than or equal to 0.35 IU/mL IFN- γ .

The tuberculin test was performed by injecting 0.1 mL of purified protein derivative (PPD) RT 23 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark), equivalent to 2 TU (tuberculin units), intradermally into the middle third of the left forearm. The result of the test was read after 72 hours by measuring the largest transverse diameter (mm) of the induration. In this study, the TST was considered positive if the diameter of the induration was equal to or greater than 5 mm²¹.

The bacteriological examinations were performed as previously described by Salem et al. (2007)²².

2.4 Statistical Analysis

Analysis of the IFN- γ results was performed using the Kruskal-Wallis test. The correlation between the results of the TST and the IFN- γ assay was analyzed using Spearman's test²³. The sensitivity and specificity of the test were determined using a ROC curve (receiver operator characteristic curve)²⁴⁻²⁶ and confirmed using Win Episcopy 2.0²⁷. Statistical significance was defined by $p < 0.05$.

3. RESULTS

This study included 155 individuals: 47 participants in the patient group, 49 in the contact group and 59 in the control group. Initially, 156 individuals were included, but one individual from the Contact Group was excluded. This individual presented with a cough, and a bacteriological examination confirmed that this individual had active TB. This individual was excluded from the study to maintain the randomness in selecting subjects for the different groups.

The general characteristics (age, smoking habit, vaccination history and sex) of the 155 individuals were recorded and are presented in Table 1.

Table 2 presents the levels of IFN- γ for each evaluated group.

The levels of IFN- γ are shown in Figure 1. The correlation analysis between the QTF-IT and TST (Figure 2) results was performed using data from 34 individuals in the Contact Group who agreed to undergo both tests. The statistical analysis showed a correlation ($p = 0.0038$) between the two immune parameters, although Spearman's correlation coefficient was low ($r = 0.4836$) (Figure 2).

The performance of the QTF-IT assay was evaluated in the Patient and Control Groups. The sensitivity and specificity were higher than 80% (Figure 3A). However, when the same analysis was performed including the individuals from the Contact and Control Groups, who were negative for tuberculosis, the specificity of the test decreased to 77.8% (Figure 3B).

4. DISCUSSION

In the Patient Group, 38/47 individuals were positive according to the QTF-IT test, and 27 of them had high levels of IFN- γ (> 1.05 IU/mL). These individuals developed the disease despite an activation of the Th1 response. However, a study with experimental models indicated that in addition to the Th1 response, a Th17 response would be needed to confer sufficient protection against TB ²⁸. Thus, it is possible that in these 27 patients with high levels of IFN- γ , there was an imbalance between the Th1 and Th17 responses, resulting in a predominantly Th1 response that was not sufficient to control the infection.

In the Patient Group, 9 subjects were negative for IFN- γ . These negative results could be explained by the following: a) an inability to mount a protective cellular immune response, either Th1- or Th17-based ²⁸; b) the debilitating conditions of the disease ²⁹; or c) natural tolerance to the stimuli used in the test (ESAT-6, CFP10 and TB7.7) ²⁹. In our patients, we believe that these negative results were due to natural tolerance because during the experiments, a test that assessed cellular function using a nonspecific stimulus (mitogen) was positive.

Negative results for subjects with active TB using QTF-G were previously described in Kobashi et al. (2009) ³⁰. The authors observed that among 140 patients, 10 were negative (7.1%). These authors suggested two possible explanations: advanced patient age or lymphocytopenia and lymphocytes from patients without underlying disease not producing IFN- γ in response to stimulation with *M. tuberculosis* antigens. The latter scenario may have contributed to the high percentage of negative results in our study, which was higher (19.1%) than the results of Kobashi et al. (2009) ³⁰.

In the Contact Group, 20/49 of the individuals were positive according to the QTF-IT assay, and of these individuals, 14 had high levels of IFN- γ . This response is indicative of frequent stimulation of the immune system, most likely as the result of contact with bacilli transmitted by the index patients. These individuals did not present clinical signs or symptoms of TB at the time at which blood was collected. However, we cannot exclude the possibility that these patients had the disease because there are no parameters that define the limit between latent and active TB

Higuchi et al. (2008)³¹ conducted a study with 172 contacts of TB patients: 111/172 of them (64.5%) were positive for QuantiFERON^R TB Gold (QTF-G) assay, and 35/111 (31.5%) were diagnosed with active TB based on the radiological findings. Most of these patients had high levels of IFN- γ , and the authors suggested that high levels of this cytokine may be a risk factor for the progression of TB. In our study, the number of contacts who were positive according to the QTF-IT assay was lower (40.8%), and individuals who had higher levels of IFN- γ did not present with symptoms of TB.

Among the 59 individuals from the Control Group, 4 were positive according to the QTF-IT assay; these results suggest previous TB infection, especially because TB is endemic in this region.

The analysis of the correlation between the IFN- γ levels in the IGRA and TST did not reveal a clear linear distribution; however, the correlation was statistically significant. This response was expected because both tests measure the cellular immune response. The combination of a positive TST result and a negative QTF-IT result was frequent among the contacts. This combination of results may reflect the cross-reactivity of TST with environmental mycobacteria and/or vaccination with BCG

³², both of which have been reported in the studied area ^{33,34}. The QTF-IT assay using *M. tuberculosis* antigens with greater specificity could be more useful than the TST in identifying cases and for the preventive treatment of TB contacts.

The WHO has not recommended the replacement of the TST by the IGRA, especially in low- and middle-income countries, which have high incidences of TB and HIV. This lack of recommendation is because neither the IGRA nor the TST is sufficiently accurate to predict the likelihood that infected individuals will develop active TB ¹⁸. A recent meta-analysis confirms this recommendation by demonstrating that the IGRA and the TST exhibit a low to medium association with the risk of progression to active TB. The authors affirm that IFN- γ could be used as a biomarker of sensitization to *M. tuberculosis*; however, IFN- γ alone cannot be used to predict the development of active TB ³⁵.

Regarding the performance of the QTF-IT assay in the present work, the sensitivity and specificity were comparable to those obtained in high-income countries ³⁶⁻³⁸. When the contacts were added into the evaluation as TB-negative cases, the specificity decreased; however, the specificity was still greater than that observed in countries with high TB endemicity ^{10, 39-41}.

Finally, the present work demonstrated that IFN- γ levels were higher in patients with active TB. Despite the recommendations of the WHO regarding IGRAs, according to our data, the QTF-IT assay yielded acceptable results. Therefore, the QTF-IT assay may be useful as a diagnostic test for latent and active TB in combination with medical evaluation and other routine tests.

Ethical Approval

This study was approved by the Human Ethics Committee of the INPA under registration N°. 223/09.

Conflict of interests

The authors of this work have no commercial relationship with suppliers of diagnostic products that have an interest in the subject of this research.

Acknowledgments

We would like to thank the Research Foundation of the State of Amazonas (FAPEAM) for financial support and the Mycobacteriology Laboratory of the Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonia (INPA) and the Federal University of Amazonas (UFAM) for allowing the execution of this work.

REFERENCES

1. IMF, International Monetary Fund. World Economic Outlook Database-September, 2011, <http://www.imf.org/external/pubs/ft/weo/2011/02/weodata/> (Visited in March 2012).
2. The WHO. Tuberculosis profile Brazil , 2011, www.who.int/tb/data (Visited in January 2012).
- 3.The WHO Global Tuberculosis Control , 2011, [http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ISBN 978 92 4 156438 0](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ISBN%209789241564380) (Visited in October de 2011).
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Tuberculose - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação no ano de 2011. Boletim Epidemiológico. Especial Tuberculose, 2012: 43-45.
5. SEMSA, Secretaria Municipal de Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental. Análise das Ações para o Controle da Tuberculose em Manaus. Manaus-Amazonas, 2012: 1-35.
6. Pai M, Riley LM, Colford JM. Interferon-gama assay in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:761-776.
7. Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, Magdorf K. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007; 45:322-328.
8. Kanunfre KA, Leite OH, Lopes MI, Litvoc M, Ferreira AW. Enhancement of Diagnostic Efficiency by a Gamma Interferon Release Assay for Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1028–1030.

- 9.** Janssens JP, Roux-Lombard P, Perneger T, Metzger M, Vivien R, Rochat T. Contribution of a IFN-gamma assay in contact tracing for tuberculosis in a low-incidence, high immigration area. *Swiss Med Wkly* 2008; 138:585-593.
- 10.** Legesse M, Ameni G, Mamo G, Medhin G, Bjune G, Abebe F. Performance of QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFTGIT) for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection in Afar Pastoralists, Ethiopia. *BMC Infect Dis* 2010;10 : 2-10.
- 11.** Goletti D, Vincenti D, Carrara S, Butera O, Bizzoni F, Bernardini G, Amicosante M, Girardi E. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunospot assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12 :1311-1316.
- 12.** Goletti D, Raja A, Ahamed KB, Rodrigues C, Sodha A, Butera O, Carrara S, Vernet G, Longuet C, Ippolito G, Thangaraj S, Leportier M, Girardi E, Lagrange PH. IFN-gamma, but not IP-10, MCP-2 or IL-2 response to RD1 selected peptides associates to active tuberculosis. *J Infect* 2010; 61:133-143.
- 13.** Kaufmann SH. Protection against tuberculosis: cytokines, t cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: ii54-ii58.
- 14.** Rayamajhi M, Humann J, Kearney S, Hill KK, Lenz LL. Antagonistic crosstalk between type I and II interferons and increased host susceptibility to bacterial infections. *Virulence*. 2010; 1:418-22.
- 15.** Robinson CM, O'Dee D, Hamilton T, Nau GJ. Cytokines Involved in Interferon-gamma Production by Human Macrophages. *J Innate Immun* 2010; 2: 56–65.
- 16.** Ahmad S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Clin Dev Immunol* 2011:814-943.

- 17.** Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2011;11: 343-354 .
- 18.** The WHO. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries: policy statement. http://www.who.int/tb/.../policy_statement_igra_oct20 (Visited in December 2011).
- 19.** IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Posição ocupada pelos 100 maiores municípios em relação ao Produto Interno Bruto, segundo os municípios e as respectivas Unidades da Federação ,2009, <http://www.ibge.gov.br/home/estistica> (Visited in March 2012).
- 20.** CELLESTIS INC. QuantiFERON^R TB GOLD: precision and reproducibility report. Cellestis, Valencia, CA ,2007, www.cellestis.com (Visited in August de 2009).
- 21.** BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2011, p.40.
- 22.** Salem JI, Carvalho CM, Ogusku MM, Maia R, Ruffino-Netto A. PKO – Alternative method for isolating *Mycobacterium* from sputum. *Acta Amazônica* 2007; 37:419-424.
- 23.** Callegari-Jacques SM. Bioestatística, princípios e aplicações. Editora Artmed. Porto Alegre, 2003.
- 24.** Greiner M, Sohr D, Gobel P. A modified ROC analysis for the selection of cut off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol Methods* 1995; 185:123-132.
- 25.** Greiner M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): update version supports optimisation of cut-off values that minimise overall misclassification costs. *J. Immunol Methods* 1996; 191:93-94.

- 26.** Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000; 45: 23-41.
- 27.** Thrusfield M, Ortega C, De Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K. Win Episcopes 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec* 2001; 148:567-572.
- 28.** Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, Van KL, Chattopadhyay D, Das G. Early Secreted Antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Protective T Helper 17 Cell Responses in a Toll-Like Receptor-2-dependent Manner. *PLoS Pathog* 2011; 7: 1-12.
- 29.** Hang NT, Lien LT, Kobayashi N, Shimbo T, Sakurada S, Thuong PH, Hong LT, Tam D B, Hijikata M, Matsushita I, Hung NV, Higuchi K, Harada N, Keicho N. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon- γ release assay for tuberculosis. *PLoS One* 2011;6:1-8.
- 30.** Kobashi Y, Shimizu H, Ohue Y, Mouri K, Obase Y, Miyashita N, Oka M. False Negative Results of quantiFERON TB – 2G test in Patients with Active Tuberculosis. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62:300-302.
- 31.** Higuchi K, Harada N, Fukazawa K, Mori T. Relationship between whole-blood interferon-gamma responses and the risk of active tuberculosis. *Tuberculosis* 2008; 88: 244-248.
- 32.** Zwerling A, Behr MA, Verma A, Brewer TF, Menzies D, Pai M. The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. *PLoS Med* 2011;8:1-8.
- 33.** David HL, Papa F, Cruaud P, Berlie HC, Maroja MF, Salem JI, Costa MF. Relationships between titers of antibodies immunoreacting against glycolipid

antigens from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*, the Mitsuda and Mantoux reactions, and bacteriological loads: implications in the pathogenesis, epidemiology and serodiagnosis of Leprosy and Tuberculosis. *Int J lepr other mycobactdis* 1992; 60:208-224.

34. Salem JI, Marója MF, Carvalho FF, Lima MO, Feuillet A. Mycobacteria other than tubercle bacilli in sputum specimens from patients in Manaus Amazonia, Brasil. *Acta Amaz* 1989;19:349-54.

35. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, Mwansa-Kambafwile J, Fielding K, Wilkinson RJ, Pai M. Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012; 12:45-55.

36. Harada N, Higuchi K, Yoshiyama T, Kawabe Y, Fujita A, Sasaki Y, Horiba M, Mitarai S, Yonemaru M, Ogata H, Ariga H, Kurashima A, Wada A, Takamori M, Yamagishi F, Suzuki K, Mori T, Ishikawa N. Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect* 2008;56: 348–353.

37. Ruhwald M, Dominguez J, Latorre I, Losi M, Richeldi L, Pasticci MB, Mazzolla R, Goletti D, Butera O, Bruchfeld J, Gaines H, Gerogianni I, Tuuminen T, Ferrara G, Eugen-Olsen J, Ravn P. A multicentre evaluation of the accuracy and performance of IP-10 for the diagnosis of infection with *M. Tuberculosis*. *Tuberculosis* 2011;91:260-267.

38. Vesenbeckh SM, Schönfeld N, Mauch H, Bergmann T, Wagner S, Bauer TT, Rüssmann H. The Use of Interferon Gamma Release Assays in the Diagnosis of Active Tuberculosis. *Tuberculosis Research and Treatment*, 2012: 1-4.

- 39.** Kang YA, Lee HW, Hwang SS, Um SW, Han SK, Shim YS, Yim JJ. Usefulness of whole-blood interferon-gamma assay and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest* 2007;132 :959-965.
- 40.** Leung WL, Law KL, Leung VS, Yip CW, Leung CC, Tam CM, Kam KM. Comparison of intracellular cytokine flow cytometry and an enzyme immunoassay for evaluation of cellular immune response to active tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16 :344-351.
- 41.** Khalili T, Nakhaee A, Salehi M, Kariminia A. A validity study of the QuantiFERON-TB Gold (QFT-TB) method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high risk population. *Swiss Med Wkly* 2010;140 :95-96.

Table 1. General characteristics of study population (n=155).

Characteristics	TB Patients (n=47)	Contacts (n=49)	Controls (n=59)
Age (years) (Mean and SD)	35 ± 14	36 ± 14	28 ± 7
Smoking (%)			
Yes	21.3%	24.3%	3.6%
No	78.7%	75.5%	96.4%
BCG Vaccinated (%)			
Yes	90.9%	85.7%	97.6%
No	9.1%	14.3%	2.4%
Gender (%)			
Male	68.1%	34.7%	37.3%
Female	31.9%	65.3%	62.7%

SD – Standart Deviation

Table 2. Distribution of the groups according to the levels of IFN- γ .

IFN-γ (UI/mL)	TB Patients n (%)	Contacts n (%)	Controls n (%)
> 1.05 (High)	27 (57.5)	14 (28.6)	3 (5.1)
0.71 a 1.05 (Medium)	1 (2.1)	1 (2.0)	0 (0.0)
0.35 a 0.70 (Low)	10 (21.3)	5 (10.2)	1 (1.7)
< 0.35 (Negative)	9 (19.1)	29 (59.2)	55 (93.2)
TOTAL	47 (100.0)	49 (100.0)	59 (100.0)

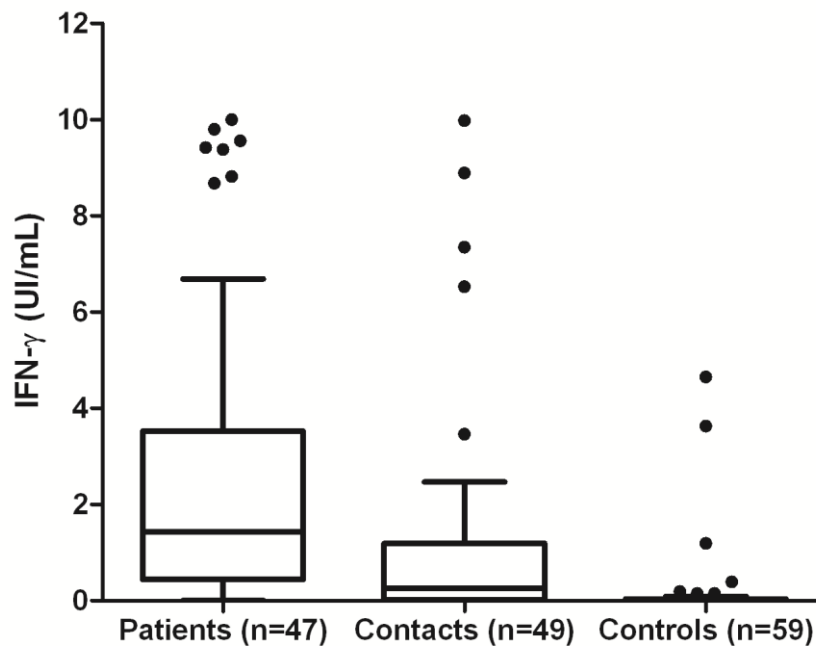


Figure 1. Response of IFN- γ (Interferon-gamma), detected by QuantiFERON[®] TB Gold (In-Tube Method) test, in pulmonary TB Patients, Contacts and Controls. For comparison of IFN- γ levels among groups was applied Kruskal-Wallis test ($p < 0.0001$), and for multiple comparison was applied post-Dunn's test: Patients x Contacts ($p < 0.001$); Patients x Controls ($p < 0.0001$); Contacts x Controls ($p < 0.001$). In box-whisker plot graph, the points indicate outlier values and horizontal line in the box represents median (Med). The values of Med: Patients = 1.43 IU/mL, Contacts = 0.26 IU/mL and Controls = 0.01 IU/mL.

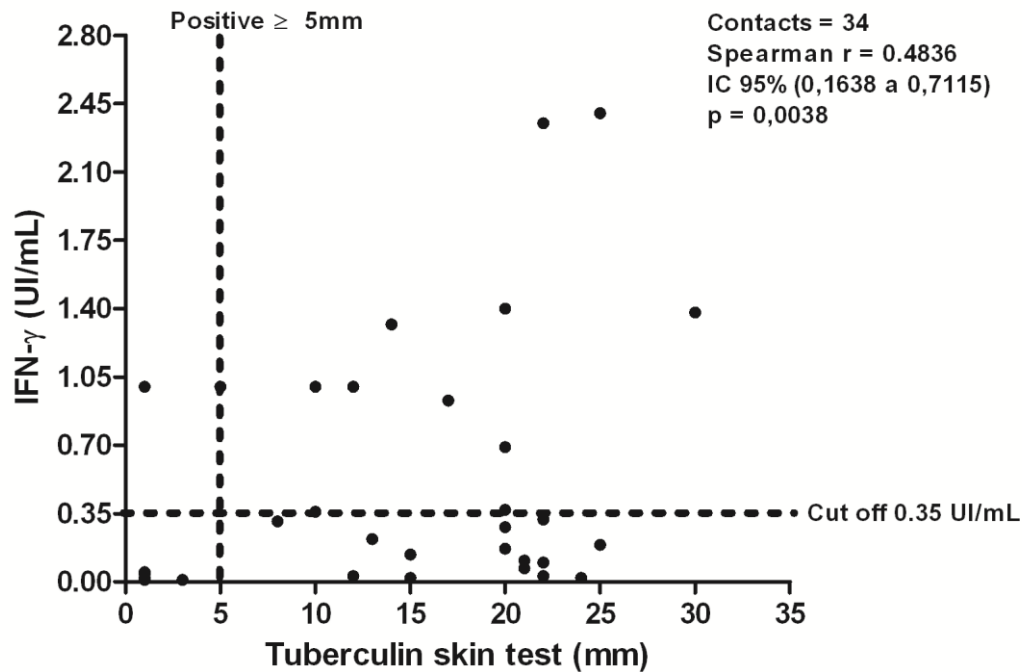


Figure 2. Correlation between the levels of IFN- γ (Interferon-gamma) and Tuberculin skin test in Contacts of patients recently diagnosed for TB.

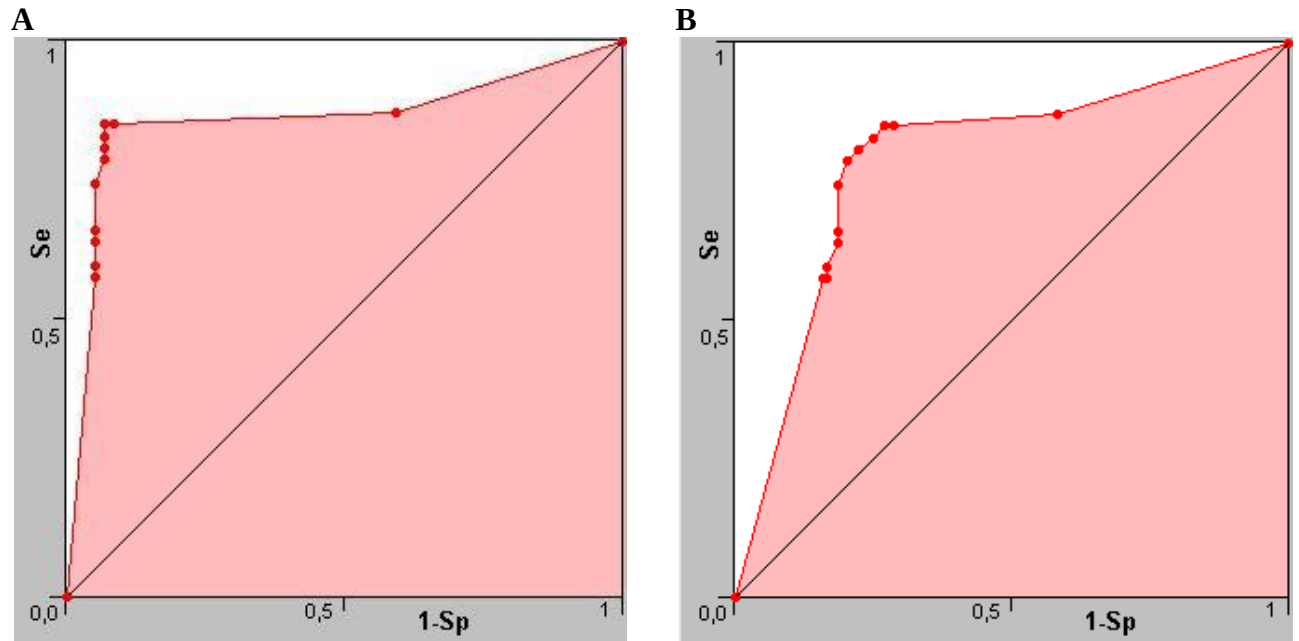


Figure 3. ROC curve (Receiver Operating Characteristic Curve) representing sensitivity (Se) and specificity (Sp) results for QuantiFERON[®] TB Gold (In-Tube Method) (QTF-IT) test. **A.** QTF-IT results: Patients (n=47) x Controls (n=59), Se 80.9% (95% CI 69.6% to 92.1%) and Sp 93.2% (95% CI 86.8% to 99.6%), area under the curve 86.1% (min 81.8 - max 90.4), Positive Predictive Value (PPV) 90.5% (95% CI 81.6% to 99.4 %) and Negative Predictive Value (NPV) 85.9% (95% CI 77.4% to 94.5%). **B.** QTF-IT results: Patients (n=47) x Controls (n=59) and Contacts (n=49), Se 80.9% (95% CI 69.6% to 92.1%) and Sp 77.8% (95% CI 69.9% to 85.6%), area under the curve 79.0% (min 74.9 - max 83.2), PPV 61.3% (95% CI 49.2% to 73.4%) and NPV 90.3% (95% CI 84.3% to 96.3%). Cut off 0.35 IU/mL IFN- γ .

ARTIGO DE REVISÃO

Ensaio de liberação de Interferon gama (IGRA) em regiões de alta endemicidade da Tuberculose

Eduardo Bentes Santana Filho¹, Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto^{2,3}, Mauricio Morishi Ogusku³, João Vicente Braga de Souza³, Júlia Ignez do Nascimento Salem³, Aya Sadahiro^{1,3}

¹ Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e aplicada, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus-AM, Brasil.

² Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, Brazil.

³ Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus-AM, Brazil

RESUMO

O ensaio de liberação de interferon gama (IGRA) é baseado na estimulação *in vitro* de células sanguíneas com derivados protéicos de *Mycobacterium tuberculosis*, que pode indicar sensibilização prévia ao bacilo da Tuberculose (TB). As proteínas utilizadas no teste estão ausentes na vacina BCG e na maioria das micobactérias ambientais, evitando desta forma as reações cruzadas. Esta revisão teve como objetivo avaliar a utilidade dos IGRAs comerciais nos países de alta endemicidade para TB, em especial o T-SPOTTM TB (T-SPOT) e o QuantiFERON^R TB Gold (In tube method) (QTF-IT) que utilizam dois e três antígenos respectivamente de *M. tuberculosis*.

Palavras Chave: IGRA; Tuberculose; Interferon gama

ABSTRACT

Interferon-gamma release assays (IGRA) is based on *in vitro* stimulation of blood cells with protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, which may indicate previous sensitization to bacillus of tuberculosis (TB). The proteins used in the test are absent in BCG and most environmental mycobacteria, thus avoiding cross-reactions. This review aimed to evaluate the usefulness of commercial IGRAs in countries of high endemicity for TB, especially the T-SPOTTM TB (T-SPOT) and QuantiFERON^R TB Gold (In tube method) (QTF-IT) using two and three respectively antigens of *M. tuberculosis*.

Keywords: IGRA; Tuberculosis; Interferon gamma

INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (BRASIL, 2008), e continua sendo um grave problema de saúde pública mundial, representando a causa mais freqüente de morte por um único agente infeccioso.

A doença acomete tipicamente os pulmões (TB pulmonar), mas pode afetar outros órgãos e tecidos (TB extrapulmonar). A transmissão acontece pelo ar, quando um indivíduo doente, ao tossir, espirrar ou falar, libera bacilos que podem infectar outras pessoas (BRASIL, 2011). Em geral uma pequena proporção dos infectados desenvolve a doença. Entretanto, o risco da infecção evoluir para TB doença é maior nos indivíduos portadores de HIV (vírus da imunodeficiência humana) (WHO, 2011).

Em 2010, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), foram notificados 6,2 milhões de casos de TB no mundo, e destes 5,4 milhões foram casos novos. A China e a Índia contribuem com 40% dos casos notificados de TB e o Brasil está entre os 22 países que concentram as maiores cargas de TB (WHO, 2011a). No Brasil em 2011, as maiores taxas de incidência foram nos estados do Amazonas (62,6/100.000 hab.), Rio de Janeiro (57,6/100.000 hab.) e Pará (47,3/100.000 hab.) (BRASIL, 2012).

O diagnóstico da TB ativa é baseado principalmente nos dados clínico-epidemiológicos, exames de imagem e confirmação laboratorial por métodos microbiológicos, como a baciloscopia direta e o cultivo. No entanto, a baciloscopia apresenta uma sensibilidade bem variável e o cultivo, embora seja considerado o método padrão ouro, a liberação do resultado final é muito demorada, podendo chegar até 60 dias de espera (RICHELDI, 2006; LIMA et al., 2008). Por este motivo, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de elaborar protocolos de diagnóstico mais rápidos para TB.

Os exames disponíveis ainda não conseguem determinar de forma segura e confiável os casos de TB latente, para que um tratamento preventivo possa ser instituído. O teste

utilizado há décadas, para auxiliar a identificar TB latente, tem sido a prova tuberculínica (PT), que usa uma mistura de antígenos de *M. tuberculosis*, o PPD (Purified protein derivative), que estão também presentes nas cepas atenuadas da vacina BCG e nas micobactérias ambientais, o que pode ocasionar reações cruzadas e, consequentemente, interferir na interpretação do teste (MAZUREK et al., 2005).

Os fatos citados estimulam a pesquisa de testes alternativos, envolvendo a identificação de biomarcadores, que possam ajudar de forma rápida e eficiente o diagnóstico tanto para a TB ativa como para TB latente.

Assim, a combinação dos conhecimentos genéticos do bacilo causador da TB e da resposta imunológica do hospedeiro levou a elaboração de testes imunológicos para auxiliar no diagnóstico da TB. Dentre os testes, está o ensaio de liberação de interferon-gama (IGRA), sendo que dois deles estão disponíveis comercialmente, para uso em seres humanos, é o T-SPOTTMTB (T-SPOT) e o QuantiFERON^R TB-Gold (in tube method) (QTF-IT).

Neste contexto, a presente revisão visou analisar e discutir os trabalhos que utilizaram os IGRAs comerciais, em especial T-SPOT e QTF-IT, em regiões de alta endemicidade para TB, inclusive os realizados no Brasil.

Metodologia

Modelo de Estudo: Foi realizada revisão bibliográfica do assunto, considerando principalmente as características dos grupos populacionais investigados, a sensibilidade e especificidade obtidas nos testes de IGRA em regiões de alta endemicidade para TB.

Base de dados: Os artigos foram selecionados no site de busca da PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), com as seguintes palavras chave: IGRA and Tuberculosis (237 artigos acesso em 28 de abril de 2012); QuantiFERON (655 artigos acesso

em 29 de abril de 2012); T-SPOT and ELISPOT and Tuberculosis (60 artigos acesso em 05 de maio de 2012). Destes foram selecionados os artigos que utilizaram o T-SPOT e a terceira geração do teste QuantiFERON TB Gold (In tube method) (QTF-IT), os estudos que foram realizados nos países de alta endemicidade para Tuberculose (TB), excluindo aqueles estudos longitudinais e extrapulmonares. Contudo, foram também selecionados alguns estudos realizados nos países de alta renda para avaliação comparativa com os países de baixa e média renda, com alta carga de TB. Foram consultados também as publicações das páginas do Portal Saúde do Ministério da Saúde do Brasil (<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm>) e da Organização Mundial de Saúde (<http://www.who.int/en/>).

Ensaio de liberação de interferon gama (IGRA)

Os IGRAs são baseados na detecção de Interferon-gama (IFN-gama), produzido por células sensibilizadas do sangue periférico, após estímulos *in vitro* com derivados protéicos de *M. tuberculosis*. O IGRA foi desenvolvido como um teste alternativo a PT, para pesquisa de pessoas infectadas por *M. tuberculosis*.

Dentre os IGRAs, dois deles foram aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) e encontram-se disponíveis comercialmente (CONDE et al., 2009), o QuantiFERON^R TB-Gold (In-Tube Method) (QTF-IT) (FDA, 2005 e FDA, 2007) e o T-SPOTTM TB (FDA, 2008).

A primeira geração do QuantiFERON^R TB aprovada pela FDA foi em 2001, na qual utilizava como estímulo o PPD; em 2004 a FDA aprovou a segunda geração do teste que foi denominado de QuantiFERON^R TB Gold, passando a utilizar antígenos sintéticos mais específicos de *M. tuberculosis*, o ESAT-6 (Early secretory antigenic target 6) e CFP 10 (Culture filtrate protein 10), e em 2007 a FDA aprovou a terceira geração do teste, o QTF-IT,

na qual foi incluído mais um antígeno além dos dois existentes, o TB7.7 (Rv 2654c) com adaptação do ensaio de estímulo celular no próprio tubo de coleta de sangue (PAI et al., 2006; ARIAS GUILLÉN, 2011).

No QTF-IT, o sangue periférico coletado é submetido à incubação, a 37°C por 24 horas, em 3 tubos simultaneamente: Nil (controle negativo), Antígenos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7) e Mitógeno (controle positivo). Após a coleta do plasma, o IFN-gama é quantificado por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

No T-SPOT™ TB, utiliza-se como estímulo dois antígenos, o ESAT-6 e CFP-10, e quantifica-se diretamente o número de células T secretoras de IFN-gama por ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot).

Os antígenos ESAT-6 e CFP-10 utilizados nos dois testes são fortes alvos para Th1, nas infecções por *M. tuberculosis*, e são codificados por sequências gênicas da região de diferenciação 1 (RD-1), que estão ausentes nas estirpes da BCG e na maioria das micobactérias ambientais, com exceção de *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. flavescens* e *M. gastrii*.

As vantagens do QTF-IT e T-SPOT™ TB tem sido por: ser um teste *ex vivo*, não necessitar do retorno do paciente ao posto médico para a leitura do teste e não reagir cruzadamente com pessoas vacinadas pela BCG ou sensibilizadas com micobactérias ambientais, conforme descrito pelos fabricantes. As limitações são por apresentarem custos mais elevados que a PT, necessitar de equipamentos e profissionais treinados para realização do teste.

Desempenho dos IGRAs comerciais nas regiões de alta endemicidade da TB

Os testes com os dois IGRA comerciais, o T-SPOT e QTF-IT, têm sido realizados em diversas populações de países de baixa, média e alta renda, apresentando resultados extremamente diversificados. A grande dificuldade em estabelecer a sensibilidade e especificidade desses testes, está principalmente na ausência de um teste padrão ouro para o diagnóstico da TB infecção.

Nos países de alta endemicidade para TB, o desempenho dos IGRA apresentou grande variação nos resultados, em que a sensibilidade foi de 45,0 a 96,6% e a especificidade foi de 36,8 a 86,0%, conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado das avaliações dos IGRA comerciais, QuantiFERON[®] TB GOLD (in tube method) e T-SPOT[™] TB, em pacientes com Tuberculose (TB), realizados no período de 2007 a 2012, em países com alta taxa de endemicidade para TB.

Ordem	Autores	Indivíduos (n)	T-SPOT		QTF-IT		País
			S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	
1	Adetifa et al., 2007	80	78,7	-	64,0	-	Gambia*
2	Kang et al., 2007	141	92,0	47,0	-	-	Coreia do Sul*
3	Raby et al., 2008	112	-	-	74,0	-	Zambia
4	Legesse et al., 2010	107	-	-	64,5	36,8	Etiópia
5	Goletti et al., 2010	129	-	-	68,0	86,0	Índia
6	Stavri et al., 2010	60 ^{Cr}	-	-	45,0	-	Romênia*
7	Lee et al., 2010	59	-	-	96,6	-	Coreia do Sul*
8	Cattamanchi et al., 2010	236 ^{HIV}	73,0	54,0	-	-	Uganda
9	Dayal et al., 2011	130 ^{Cr}	-	-	51,2	48,0	Índia
10	Hang et al., 2011	459	-	-	95,2	-	Vietnam
11	Feng et al., 2012	71	95,6	69,2	-	-	China
12	Santana-Filho et al., 2012 (dados não publicados)	106	-	-	80,9	77,8	Brasil

QTF-IT = QuantiFERON[®] TB Gold (In tube method); S=Sensibilidade; E=Especificidade; % = percentual; Cr= Crianças; HIV= portadores do vírus da imunodeficiência humana;

* Não estão entre os 22 países de maior carga de TB, mas apresentam taxas de incidência elevadas

para TB.

As médias combinadas das sensibilidades e das especificidades dos IGRAs dos resultados observados na Tabela 1 foram de 75,3% e 59,8% respectivamente, dados estes considerados inferiores aos observados nos países de baixa endemicidade da TB, em que a média combinada dos resultados estava acima de 80% para os dois parâmetros (KOBASHI et al., 2006; DEWAN et al., 2006; PAI et al., 2006; LOSI et al., 2007; DETJEN et al., 2007; GOLLETTI et al., 2008; AICHELBURG et al., 2009; KAMPMANN et al., 2009; HIGUCHI et al., 2009; BOYD et al., 2011; RUTHERFORD et al., 2010; RUHWALD et al., 2011; FUJITA et al., 2011;).

Os IGRAs apresentaram baixa especificidade nas regiões de alta endemicidade para TB, pois pessoas sensibilizadas e que não apresentam os sinais e sintomas da doença, obviamente, são mais frequentes nessas regiões, e os testes imunológicos, conforme descrito anteriormente, não conseguem distinguir TB infecção de TB doença ativa (WHO, 2011b).

Na última avaliação realizada pela OMS em 2011, sobre o uso dos IGRAs em países de baixa e média renda, adotou a seguinte recomendação, que os IGRAs, assim como a PT, não devem ser utilizados para diagnóstico de TB pulmonar e extrapulmonar, devido a baixa especificidade desses testes (WHO, 2011b).

Apesar destas recomendações em relação aos IGRAs, no estudo realizado pelo nosso grupo, utilizando o QTF-IT, a sensibilidade (80,9%) e a especificidade (77,8%) foram comparáveis aos observados nos países de baixa endemicidade da TB (dados não publicados). Além disso, os níveis de IFN-gama foram significativamente mais elevados nos pacientes de TB ativa em comparação aos seus contatos. Neste contexto, o teste do IGRa pode ser útil no diagnóstico da TB, mas em conjunto com a avaliação médica e os demais exames de rotina.

Recentemente, Denkinger et al. (2011), relataram que na maioria dos países que disponibilizam os manuais para o diagnóstico da TB ativa, apontam limitações dos IGRAs. E quando o uso do teste é recomendado, principalmente nos países de alta renda, está

claramente descrito que o IGRA deve ser utilizado apenas como um teste auxiliar, sem substituição dos testes microbiológicos e radiográficos.

Outro aspecto amplamente discutido é a identificação de pessoas com TB latente, que devem ser submetidas a um tratamento preventivo. Contudo, nos países de alta endemicidade da doença o percentual de sensibilidade dos contatos tem sido muito elevado na maioria dos estudos, ou seja, acima de 40%, incluindo também nestas populações os profissionais de saúde, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado das avaliações dos IGRA comerciais, QuantiFERON^R TB GOLD (In tube-method) e T-SPOT, em contatos diretos de pacientes com TB realizados no período de 2005 a 2012, em regiões de média a alta endemicidade para TB.

Ordem	Autores	Indivíduos (n)	T-SPOT S (%)	QTF-IT S (%)	País
1	Pai et al., 2005	726 ^{PS}	-	40,0	Índia
2	Mahomed et al., 2006	358	-	56,0	África do Sul
3	Jackson-Sillah et al., 2007	1656	-	29,0	Gâmbia*
4	Adetifa et al., 2007	194	57,1	58,8	Gâmbia*
5	Lien et al., 2009	300 ^{PS}	-	47,3	Vietnam
6	Machado et al., 2009	298	-	42,6	Brasil
7	Santana-Filho et al., 2012 (dados não publicados)	49	-	40,8	Brasil

QTF-IT = QuantiFERON^R TB Gold (In tube method); S=Sensibilidade; % = percentual; PS= profissionais de saúde;

* A Gâmbia não está entre os 22 países de maior carga de TB, mas apresenta taxas de incidência elevada para TB.

Embora a Gâmbia não esteja entre os 22 países de alta carga de TB no mundo, este país apresenta uma taxa de incidência elevada de TB, 273 casos/100 mil habitantes (WHO, 2010a). Nos dois estudos realizados no país, houve uma diferença significativa de 29,0% para 58,8%, sendo que os estudos foram realizados em períodos próximos por JACKSON-SILLAH et al., 2007 no período de 2002 à 2004 e ADETIFA et al., 2007 no período de 2004 à 2006, e os contatos foram recrutados na mesma área da Gâmbia.

Outro estudo interessante, foi realizado em Hamburgo na Alemanha, que apesar de ser um país de baixa endemicidade da TB, 4,8 casos/100 mil habitantes (WHO, 2010b), a cidade de Hamburgo, possui a maior taxa da doença na Alemanha, 10,8 casos/100 mil habitantes (DIEL et al., 2009), demonstrando que mesmos nos países de baixa carga de TB, o percentual de sensibilidade nos contatos foi de 30,2 %, ou seja, comparável aos países de alta endemicidade da doença (Tabela 2). Na maioria desses estudos com os contatos de TB, a situação “PT positiva e IGRAs negativo” foi mais frequente, a provável explicação é que tenha ocorrido reações cruzadas na PT à vacinados pela BCG ou por sensibilização prévia à micobactérias ambientais.

Alguns pesquisadores relatam que os indivíduos com níveis mais elevados de IFN- γ , nos testes do IGRAs, podem apresentar maior risco de desenvolverem ou estarem com TB ativa, por terem observado uma diferença significativa do perfil de produção desta citocina entre pacientes de TB e os seus contatos diretos (HIGUCHI et al., 2008; LIENHARDT et al., 2010).

Recentemente um trabalho de meta-análise, sobre o valor preditivo dos IGRAs para TB ativa, avaliou 15 estudos que tiveram uma amostragem combinada de 26.680 participantes, os autores concluíram que os IGRAs e a PT não possuem alta acurácia para predição de TB ativa, embora o uso dos IGRAs em algumas populações possa reduzir o número de pessoas selecionadas para um tratamento preventivo (RANGAKA et al. 2012).

A política de recomendação da OMS (2011) nos países de baixa e média renda para TB latente, é que a PT não deve ser substituída pelos IGRAs, pois os estudos realizados apresentaram resultados muito variáveis.

Nos países de baixa e média renda, onde a carga de TB é alta, o desempenho dos IGRAs não tem sido favorável, mas além dos resultados, há fatores epidemiológicos e técnicos importantes que também devem ser considerados. O estudo de qualquer citocina

necessita de um grande rigor técnico, pois trata-se de moléculas termolábeis, em que o tempo de coleta até incubação e o armazenamento adequado, devem ser rigorosamente executados. Há trabalhos que questionam se o tempo de incubação de 24 horas é o suficiente para produção de IFN-gama, pois há estudos que descrevem uma diferença significativa na produção de 1 dia (24 horas) a 6 dias (144 horas) (LEYTEN et al, 2007).

A baixa sensibilidade e especificidade dos testes podem também ser atribuídas ao número reduzido de linfócitos em pacientes imunocomprometidos ou de idade avançada (KOBASHI et al., 2009). Além disso, tem sido relatado que pacientes de TB que são *HLA-DRB1*07* podem não responder aos antígenos utilizados nos IGRAs comerciais (HANG et al, 2011). Neste contexto, os IGRAs devem ser interpretados juntamente com outros exames sanguíneos, que permitam avaliar o número de linfócitos, bem como conhecer o perfil imunogenético da população de interesse, ou ainda permitir a inclusão de outros peptídeos antigênicos do bacilo que possam induzir respostas em maior número de pacientes.

Conclusão

O uso dos IGRAs nas regiões de alta endemicidade para TB não pode ser descartado, mas é evidente a necessidade de otimizar o teste para estas regiões, tanto nos aspectos técnicos, como nos cuidados das interpretações dos IGRAs de acordo com o perfil dos pacientes. Deve-se continuar investigando novos biomarcadores imunológicos, que possam ajudar em combinação com o IFN-gama para aumentar a confiabilidade dos atuais IGRAs.

REFERÊNCIAS:

AICHELBURG, M.; RIEGER, A.; BREITENECKER, F.; PFISTERSHAMMER, K.; TITTES, J.; ELTZ, S.; AICHELBURG, A.; STINGL, G.; MAKRISTATHIS, A.; KOHRGRUBER, N. Detection and prediction of active tuberculosis disease by a whole-blood interferon-gamma release assay in HIV-1-infected individuals. **Clinical Infectious Diseases**, n. 48, v.7, p. 954-62, 2009.

ARIAS GUILLÉN, M. Advances in the diagnosis of tuberculosis infection. **Archivos de Bronconeumología**, n. 47, v.10, p. 521-30, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 123, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Tuberculose - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação no ano de 2012 - Sinan Net**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>>. Acessado em 05 de maio de 2012.

BOYD, A.; ASHCROFT, A.; LIPMAN, M.; BOTHAMLEY. Limited added value of TSPOT. TB blood test in diagnosing active TB: A prospective Bayesian analysis. **Journal of Infection**, n.62, p.456-461, 2011.

CONDE, M. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro Pneumologia**, p. 1018-1048, 2009.

DENKINGER, C.; DHEDA, K.; PAI, M. Guidelines on interferon- γ release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? **Clinical Microbiology and Infection**, n.17, v. 6, p. 806-814, 2011.

DETJEN, A.; KEIL, T.; ROLL, S.; HAUER, B.; MAUCH, H.; WAHN, U.; MAGDORF, K. Interferon-gamma Release Assays Improve the Diagnosis of Tuberculosis and Nontuberculosis Mycobacterial Disease in Children in a Country with a Low Incidence of Tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, n.45, p. 322-328, 2007.

DEWAN, P.; GRINSDALE, J.; KAWAMURA, L. Low Sensitivity of a Whole-Blood Interferon-gama Release Assay for Detection of Active Tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, n. 44, p. 69-73, 2007.

DIEL, R.; LODDENKEMPER, R.; NIENHAUS, A. Evidence-Based Comparison of Commercial Interferon- γ Release Assays for Detecting Active TB : A Metaanalysis. **CHEST**, v. 137, p. 952-968, 2009.

Food and Drug Administration (FDA). QuantiFERON-TB Gold - P010033/S006. Disponível em: <<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/PMAApprovals/ucm110838.htm>>. Acesso em: 23/02/2012.

Food and Drug Administration (FDA). QuantiFERON-TB Gold In-Tube - P010033/S011. Disponível em : <<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/PMAApprovals/ucm106548.htm>> Acesso em: 23/02/2012.

Food and Drug Administration (FDA). T-SPOT-TB - P070006. Disponível em: <<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/PMAApprovals/ucm102794.htm>> Acesso em : 23/02/2012.

FUJITA, A.; AJISAWA, A.; HARADA, N.; HIGUCHI, K.; MORI, T. Performance of a Whole-Blood Interferon-Gamma Release Assay with *Mycobacterium* RD1-Specific Antigens among HIV-Infected Persons. **Clinical and Developmental Immunology**, pii: 325295, 2011.

GOLETTI, D.; STEFANIA, C.; BUTERA, O.; AMICOSANTE, M.; ERNST, M.; SAUZULLO, I.; VULLO, V.; CIRILLO, D.; BORRONI, E.; MARKOVA, R.; DRENSKA, R.; DOMINGUEZ, J.; LATORRE, I.; ANGELETTI, C.; NAVARRA, A.; PETROSILLO, N.; LAURIA, F.; IPPOLITO, G.; MIGLIORI, G.; LANGE, C.; GIRARDI, E. Accuracy of Immunodiagnostic Tests for Active Tuberculosis Using Single and Combined Results: A Multicenter TBNET-Study. **Plos One**, n. 10, v.3, p. 1-9, 2008.

Higuchi K, Harada N, Fukazawa K, Mori T. Relationship between whole-blood interferon-gamma responses and the risk of active tuberculosis. **Tuberculosis**; n. 88, p. 244-248, 2008.

KOBASHI, Y.; OBASE, Y.; FUKUDA, M.; YOSHIDA, K.; MIYASHITA, N.; OKA, M. Clinical Reevaluation of the QuantiFERON TB-2G Test as a Diagnostic Method for Differentiating Mycobacteriosis. **Clinical Infectious Diseases**, n. 43, p. 1540-1546, 2006.

KAMPMANN B.; WHITTAKER E.; WILLIAMS A.; WALTERS S.; GORDON A.; MARTINEZ-ALIER N.; WILLIAMS B.; CROOK A.; HUTTON A.; ANDERSON S. Interferon-gamma release assays do not identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test. **European Respiratory Journal**, n.6, v.33, p. 1374-1382, 2009.

LIENHARDT, C.; FIELDING, K.; HANE, A.; NIANG, A.; NDAO, C.; KARAM, F.; FLETCHER, H.; MBOW, F.; GOMIS, J.; DIADHIOU, R.; TOUPANE, M.; DIEYE, T.; MBOUP, S. Evaluation of the prognostic value of IFN-gamma release assay and tuberculin skin test in household contacts of infectious tuberculosis cases in Senegal. **PLoS One**. 6;5(5) 2010:e10508. Erratum in: **PLoS One**, n. 5, v.12 2010.

LIMA, S.; CLEMENTE, W.; PALACI, M.; ROSA, R.; ANTUNES, C.; SERUFO, J. Conventional and molecular techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis : a comparative study. **Jornal Brasileiro Pneumologia**, n. 34, v.12, p. 1056 – 1062, 2008.

LOSI, M.; BOSSINK, A.; CODECASA, L.; JAFARI, C.; ERNST, M.; THIJSEN, S.; CIRILLO, D.; FERRARESE, M.; GREINERT, U.; FABBRI, L.; RICHELDI, L.; LANGE, C.; European Tuberculosis Network TBNET. Use of a T-cell interferon-gamma release assay

for the diagnosis of tuberculous pleurisy. **European Respiratory Journal**, n. 30, v.6, p.1173-1179, 2007.

MAZUREK, G.; JEREB, J.; LOBUE, P.; IADEMARCO, M.; METCHOCK, B.; VERNON, A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommend.** Rep. v. 54, RR-15, p. 49–55, 2005.

PAI, M.; KALANTRI, S.; DHEDA, K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis. **Expert Rev Mol Diagn.** n. 6, v.3, p. 413-422, 2006.

Rangaka, M; Wilkinson, K.; Glynn, J.; Ling, D.; Menzies D, Mwansa-Kambafwile J, Fielding K, Wilkinson R, Pai M. Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, n. 12, p. 45-55, 2012.

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

RUTHERFORD, M.; ALISJAHBANA, B.; MAHARANI, W.; SAMPURNO, H.; CREVEL, R.; HILL, P. Sensitivity of the QuantiFERON-Gold In-Tube Assay in Sputum Smear Positive TB cases in Indonesia. **Plos One**, n. 8, v. 5, p. 1-3, 2010.

RUHWALD, M.; DOMINGHES, J.; LATORRE, I.; LOSI, M.; RICHELDI, L.; PASTICCI, M.; MAZZOLLA, R.; GOLETTI, D.; BUTERA, O.; BRUCHFELD, J.; GAINES, H.; GEROGIANNI, I.; TUUMINEN, T.; FERRARA, G.; EUGEN-OLSEN, J.; RAVN, P. A multicentre evaluation of the accuracy and performance of IP-10 for the diagnosis of infection with *M. Tuberculosis*. **Tuberculosis**, n. 91, p. 260-267, 2011.

WHO. Tuberculosis country profiles – Gambia, **2010a** Source: www.who.int/tb/data. Generated: May 5, 2012.

WHO. Tuberculosis country profiles – Germany, **2010b** Source: www.who.int/tb/ data. Generated: May 5, 2012.

WHO. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report **2011a**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>>, acesso em 05 de maio de 2012.

WHO World Health Organization. Guidelines on tuberculosis. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle- income countries. Policy Statement. **2011b**. Disponível em: <http://www.who.int/tb/features_Archive/policy_statement_igra_oct2011.pdf>.

Agradecimentos:

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e a Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por permitir a execução deste trabalho.

Aspectos éticos: Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética do (INPA) sob No. 223/09

Conflito de interesses: Não há conflito de interesse

APÊNDICE 1

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA COORDENAÇÃO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (COMUNICANTE DIRETO)

Nº de Registro na Pesquisa:

Os pesquisadores Eduardo Bentes Santana Filho, Aya Sadahiro, Julia Ignez Salem e Mauricio Morishi Ogusku pedem sua autorização para realizar as atividades do Projeto de Pesquisa “Interferon gama como indicador de infecção pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*”. O projeto pretende estudar um componente do sangue, denominado de Interferon-gama (IFN-gama). A pesquisa deste componente poderá ajudar no diagnóstico da tuberculose, assim como saber se as pessoas que convivem diretamente com os pacientes podem estar com a bactéria causadora da tuberculose, ou se podem estar começando a adoecer. Por este motivo, as pessoas que moram na mesma casa dos pacientes com tuberculose também serão examinados. Além da pesquisa do IFN-gama no sangue, será realizado outro teste na pele chamado de teste intradérmico de tuberculina.

1) Pesquisa de IFN-gama: para realizar este teste será necessário coletar um pouco do seu sangue (10 mililitros), com uma seringa acoplada a agulha ou um tubo de vidro com agulha (sistema à vácuo), a coleta será realizada por uma pessoa habilitada. Este exame é para saber se a pessoa produzirá no sangue o IFN-gama que é um importante componente de defesa contra a bactéria da tuberculose.

2) Teste intradérmico de tuberculina: Após a coleta de sangue, será aplicada com uma seringa, na parte anterior do antebraço esquerdo, uma pequena quantidade (0,1 mililitro) de um líquido chamado de PPD (derivado protéico purificado), utilizado com frequência nos centros de saúde para auxiliar no diagnóstico da tuberculose. Após 72 horas (3 dias), da aplicação do teste intradérmico, uma pessoa do laboratório irá fazer a leitura deste exame. No local da aplicação poderá ficar um pouco vermelho ou formar uma pápula, que desaparecerá completamente após alguns dias. Este teste será realizado em conformidade com as normas do Ministério da Saúde do Brasil.

Durante a coleta de sangue e teste intradérmico você poderá sentir um desconforto na hora que for introduzida a agulha, mas não trará nenhum risco a sua saúde, pois todos os materiais utilizados serão limpos e descartáveis, não havendo risco de contaminação.

O participante não receberá nenhum benefício em dinheiro ou bem material em troca. A pessoa selecionada, mesmo após aceitar participar, terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem nenhum prejuízo. Os resultados serão divulgados nos meios científicos, sem os nomes ou características que possam identificar os participantes. Se a pessoa quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa basta se dirigir ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) que fica na Av. André Araújo 2936, Bairro do Aleixo em Manaus ou telefonar para (92) 3643-3216 que os pesquisadores darão todas as informações.

Solicitamos ainda a sua autorização para que sua amostra de sangue seja armazenada no laboratório de Micobacteriologia do INPA, para que estudos futuros possam ser realizados, mas sempre com aprovação do comitê de ética em pesquisa.

Eu, _____, entendi e dou meu consentimento para realizarem os exames do projeto. Atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

.....

Data:/...../.....

Assinatura do participante



Impressão do polegar, caso o participante não saiba escrever seu nome.

Data:/...../.....

Nome do pesquisador(a) que conversou com a pessoa selecionada

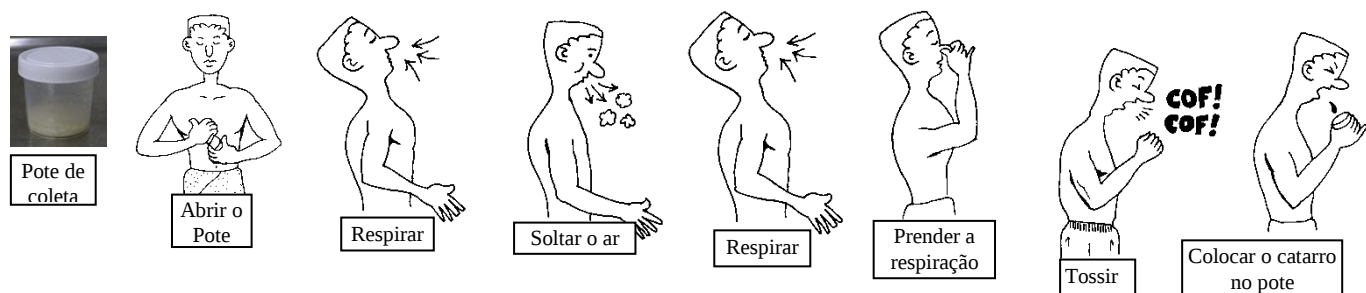
APÊNDICE 2

**MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTE)

Nº de Registro na Pesquisa:

Os pesquisadores Eduardo Bentes Santana Filho, Aya Sadahiro, Julia Ignez Salem e Mauricio Morishi Ogusku pedem sua autorização para realizar as atividades do Projeto de Pesquisa “Interferon gama como indicador de infecção pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*”. O projeto pretende estudar a produção de um componente no sangue, denominado de Interferon-gama (IFN-gama). A pesquisa deste componente poderá ajudar os médicos, e os demais profissionais da área de saúde, a saberem se as pessoas estão com a tuberculose, ou se apenas entraram em contato com a bactéria causadora desta doença, ou ainda, se podem estar começando a adoecer. Serão realizados exames de laboratório no escarro (catarro) dos pacientes com tosse para descobrir se tem a doença tuberculose. O escarro será coletado em um frasco, não dói e nem prejudica a saúde. Veja como é:



Os pesquisadores vão fazer primeiramente 2 tipos de exames no escarro:

1. Baciloscopia - vão colocar um pouco numa lamina e olhar no microscópio para procurar a “bactéria” da



tuberculose.

2. Cultivo - vão colocar em tubos com comida para fazer a “bactéria” crescer

Se os pesquisadores encontrarem a bactéria da tuberculose vão utilizá-la para realizar um teste chamado PCR e Antibiograma. Isto é, vão tentar descobrir por dois diferentes exames se a bactéria que está causando a tuberculose é resistente ou não aos remédios que serão dados pelos médicos para seu tratamento. Além desses exames, serão realizados outros testes, um de sangue para pesquisa do IFN-gama e outro de pele (teste intradérmico da tuberculina).



Na pesquisa do IFN-gama será necessário coletar um pouco do seu sangue (10 mililitros) com seringa e agulha ou direto em um tubo de vidro com agulha, esta coleta será realizada por um profissional habilitado. Este exame é para saber se o senhor(a) produzirá o IFN-gama que é um componente importante na defesa do seu corpo contra a bactéria da tuberculose.

No teste intradérmico será aplicado com uma seringa pequena, no seu braço esquerdo, uma pequena quantidade (0,1 mililitro) de um líquido chamado PPD (derivado protéico purificado), este teste é conhecido como tuberculina e é muito utilizado nos centros médicos para ajudar no diagnóstico da tuberculose. Após 72 horas (3 dias), da aplicação do teste intradérmico, uma pessoa do laboratório irá fazer a leitura deste exame. No local da aplicação poderá ficar um pouco vermelho ou formar uma pápula que desaparecerá completamente após alguns dias. Este teste será realizado em conformidade com as normas do Ministério da Saúde do Brasil.

No local da aplicação poderá ficar vermelho ou formar uma pápula que depois de alguns dias desaparecerá completamente.

Durante a coleta de sangue e teste intradérmico, o paciente poderá sentir apenas um desconforto na hora que for introduzida a agulha, mas não trará risco a sua saúde, pois todos os materiais utilizados serão limpos e descartáveis, não havendo risco de contaminação.

O paciente não receberá nenhum benefício em dinheiro ou bem material em troca. Se tiver um paciente que não queira participar da pesquisa, os exames também serão realizados apenas para saber se está doente de tuberculose e se tem que ser tratado. Os resultados da pesquisa serão informados diretamente ao paciente, que mesmo após aceitar participar, terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento fornecido pelos pesquisadores.

Os resultados serão divulgados nos meios científicos, sem os nomes ou características que possam identificar os participantes. Se o paciente quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa basta se dirigir ao INPA ou telefonar para (92) 3643-3216 que os pesquisadores darão todas as informações.

Solicitamos ainda a sua autorização para que a bactéria e as suas amostras de escarro e de sangue sejam armazenadas no laboratório de Micobacteriologia do INPA, para que estudos futuros possam ser realizados, mas sempre com aprovação do comitê de ética em pesquisa

Eu, _____, entendi e dou meu consentimento para realizarem os exames do projeto. Atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

.....

Data:/...../.....

Assinatura do paciente



Impressão do polegar, caso o paciente não saiba escrever seu nome.

Data:/...../.....

Nome do profissional que conversou com o paciente

APÊNDICE 3

**MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTROLES)

Nº de Registro na Pesquisa:

Os pesquisadores Eduardo Bentes Santana Filho, Aya Sadahiro, Julia Ignez Salem e Mauricio Morishi Ogusku pedem sua autorização para realizar as atividades do Projeto de Pesquisa “Interferon gama como indicador de infecção pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*”. Neste projeto de pesquisa pretende-se estudar a produção de um componente no sangue, denominado de Interferon-gama (IFN-gama). A pesquisa deste componente poderá ajudar os médicos, e os demais profissionais da área de saúde, a saberem se as pessoas que convivem diretamente com o paciente estão com bactéria da tuberculose. A pesquisa do IFN-gama, será realizada nos pacientes, mas também nas pessoas aparentemente saudáveis, que não tiveram no passado a tuberculose, e nem entraram em contato com pessoas que estão com a doença. As pessoas que preenchem estes requisitos serão convidadas a participar do estudo, como o grupo controle, e deverão fazer um teste de sangue para pesquisa do IFN-gama e um teste de pele (teste intradérmico de tuberculina).

1) Pesquisa de IFN-gama: para realizar este exame será necessário coletar um pouco do seu sangue (10 mililitros) com uma seringa e agulha, ou um tubo de vidro com agulha (tubo com sistema à vácuo), a coleta será realizada por um profissional habilitado. Este exame é para saber se o(a) senhor(a) produz o IFN-gama que é um componente importante na defesa contra a bactéria da tuberculose.

2) Teste intradérmico de tuberculina: Com uma seringa será aplicada no seu braço esquerdo, uma pequena quantidade (0,1 mililitro) de um líquido chamado PPD (derivado protéico purificado), este líquido não causa doença, é como se estivesse recebendo uma vacina, e é muito utilizada nos centros médicos para ajudar no diagnóstico da tuberculose. Após 72 horas (3 dias), da aplicação do teste intradérmico, uma pessoa do laboratório irá fazer a leitura deste exame. No local da aplicação poderá ficar um pouco vermelho ou formar uma pápula que desaparecerá completamente após alguns dias. Este teste será realizado em conformidade com as normas do Ministério da Saúde do Brasil.

Durante a coleta de sangue e teste intradérmico a pessoa poderá sentir apenas um desconforto na hora que for introduzida a agulha, mas não trará nenhum risco a sua saúde, pois todos os materiais utilizados serão limpos e descartáveis, não havendo risco de contaminação. O participante não receberá nenhum benefício em dinheiro ou bem material em troca. A pessoa selecionada, mesmo após aceitar participar, terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem nenhum prejuízo. Os resultados serão divulgados nos meios científicos, sem os nomes ou características que possam identificar os participantes. Se a pessoa quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa basta se dirigir ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) que fica na Av. André Araújo 2936, Bairro do Aleixo em Manaus ou telefonar para (92) 3643-3216 que os pesquisadores darão todas as informações.

Solicitamos ainda a sua autorização para que sua amostra de sangue seja armazenada no laboratório de Micobacteriologia do INPA, para que estudos futuros possam ser realizados, mas sempre com aprovação do comitê de ética em pesquisa.

Eu, _____, entendi e dou meu consentimento para realizarem os exames do projeto. Atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

.....

Data:/...../.....

Assinatura do participante



Impressão do polegar, caso o paciente não saiba escrever seu nome.

Data:/...../.....

Nome do pesquisador que conversou com o participante

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS COM SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO

Protocolo de Pesquisa nº:	223/09	Data de entrada:	27/08/09
Título do Projeto:	Investigar a validade da produção do interferon-gama como indicador de infecção tuberculosa recente ou latente		
Áreas do Conhecimento:	ciências Biológicas - Imunologia		
Grupo Temático:	Grupo III		
Data de Início:	Fev-2010	Data de Término:	Fev-2012
		Valor Orçamento:	R\$ 130.000,00
Pesquisador Responsável:	Aya Sadahiro		
Financiamento:	Não: ☐	Sim: ☒	Órgão: FAPEAM (submetido)
Currículos no CNPq:	todos		
Currículos anexos ao Projeto:	não		
Instituição Responsável:	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA		
Resumo do Projeto: O Interferon-gama (IFN-gama) tem sido amplamente estudado nos pacientes com Tuberculose (TB), pois esta citocina exerce um papel fundamental durante a infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, limitando o crescimento e ação do bacilo no hospedeiro. Por este motivo, a investigação da produção de IFN-gama em grupos de pacientes com TB ativa multibacilares e paucibacilares, TB latente e nos comunicantes direto tem sido intensamente realizada. A maioria desses estudos busca determinar marcadores imunológicos confiáveis, para auxiliar no diagnóstico da doença e na infecção tuberculosa latente, e assim adotar medidas mais efetivas no controle da TB. Recentemente, foi aprovada pela "Food Drug Administration" (FDA) em 2007 mais um novo método de detecção de IFN-gama, o "Quantiferon TB Gold (Method In-Tube)". Este teste apresenta uma grande vantagem, pois utiliza antígenos mais específicos (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7) do <i>M. tuberculosis</i>, e que estão ausentes em cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> atenuada da vacina BCG e ausentes também na maioria das outras micobactérias, evitando desta forma reações cruzadas e aumentando a confiabilidade do teste. Considerando que no			

estado do Amazonas é alta a incidência de TB, a inclusão de testes que possam auxiliar no diagnóstico das diversas formas clínicas da TB, inclusive da TB infecção (recente ou latente), faz-se necessária para reduzir a rede de transmissibilidade da doença. Neste contexto, propõe-se investigar o nível de produção de IFN-gama, utilizando o “Quantiferon TB Gold (Method In-Tube)” em pacientes com TB pulmonar (caso índice) e em seus comunicantes diretos residentes em Manaus. A partir desses resultados, espera-se poder incluir um teste que possa ser mais confiável na decisão do tratamento preventivo de indivíduos com infecção tuberculosa latente, e com risco em potencial de desenvolverem a doença.

PALAVRAS CHAVE (máximo de 6):	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Tuberculose, Interferon-gama, Quantiferon TB Gold in tube.
--------------------------------------	--

Objetivos (conforme Projeto de Pesquisa)

4. OBJETIVOS, METAS E INDICADORES QUANTITATIVOS PARA CADA META (acrescentar ou excluir linhas conforme necessidade).		
OBJETIVOS	METAS	Indicador Quantitativo
Investigar a validade da produção do interferon-gama (IFN-gama) como indicador de infecção tuberculosa recente ou latente.	1. Verificar o perfil de produção do IFN-gama em portadores de TB e seus contatos diretos, profissionais de saúde e indivíduos aparentemente não portadores de TB para determinação do “Cut-off” indicativo de positividade;	180 resultados para IFN-gama
	2. Verificar a transmissibilidade da TB no círculo de contatos intra-domiciliares conforme a determinação do “Cut-off”;	Avaliar 126 comunicantes diretos dos pacientes com TB
	3. Verificar o nível de concordância entre o teste intradérmico (PPD-RT23) e a produção de interferon-gama em contatos diretos de portadores de TB e indivíduos aparentemente não portadores de TB.	Avaliar 180 resultados de IFN-gama e teste de PPD

PARECER FINAL

Após análise por pareceristas e membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do INPA, informo-lhe que seu protocolo teve a indicação de APROVAÇÃO.

Indicação: APROVAR
Comentários: O protocolo atende as exigências da Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares.

Informo-lhe que deverá apresentar ao CEP-INPA, ao final da pesquisa, cópia da tese prevista como produto do projeto, que servirá como relatório de conclusão da pesquisa. Assim, e conforme cronograma apresentado no protocolo, solicitamos que a mesma seja entregue até MAIO/2012.

Data de liberação do Parecer: 30/11/09 na 52ª Reunião Ordinária do CEP-INPA.

Atenciosamente,


Dra. Suelly de Souza Costa
Coordenadora do CEP-INPA
PO nº 246/2009

ANEXO 2

A manuscript number has been assigned to your paper

De: Tuberculosis

Para: asadahiro@uol.com.br

Assunto: A manuscript number has been assigned to your paper

Data: 20/04/2012 06:54

Ms. Ref. No.: TUBE-D-12-00088

Title: Interferon-gamma Evaluation in Tuberculosis Patients and their Direct Contacts in Manaus, AM, Brazil
Tuberculosis

Dear Mrs Aya Sadahiro,

Your submission entitled "Interferon-gamma Evaluation in Tuberculosis Patients and their Direct Contacts in Manaus, AM, Brazil" has been assigned the following manuscript number: TUBE-D-12-00088.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/tube/>.

Your username is: asadahiro

If you need to retrieve password details please go to: http://ees.elsevier.com/tube/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

D. Jones

Administrative Support Agent [16-Mar-11]
Tuberculosis