

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES

Doutorado em Saúde Pública

FABIANA CRISTINA FULCO SANTOS

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO TESTE QUANTIFERON-TB GOLD® PARA O
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE LATENTE EM PACIENTES
IMUNODEPRIMIDOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO.

Recife

2018

FABIANA CRISTINA FULCO SANTOS

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO TESTE QUANTIFERON-TB GOLD® PARA
O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE LATENTE EM PACIENTES
IMUNODEPRIMIDOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado Acadêmico em Saúde
Pública do Instituto Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, para a obtenção do grau de
doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Haiana Charifker Schindler

Coorientadoras: Dra. Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel

Dra. Gabriela Moraes Rego Guedes

Recife

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

S237a Santos, Fabiana Cristina Fulco.
Avaliação do desempenho do teste QUANTIFERON-TB GOLD® para o diagnóstico da tuberculose latente em pacientes imunodeprimidos do estado de Pernambuco / Fabiana Cristina Fulco Santos. - Recife: [s.n.], 2018.
97 p. : il., tab. ; 30 cm

Tese (doutorado em saúde pública) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

Orientadora: Haiana Charifker Schindler; coorientadoras: Lílian Maria Lapa Montenegro Pimentel, Gabriela Moraes Rego Guedes.

1. Tuberculose - diagnóstico. 2. Tuberculose latente. 3. Teste tuberculínico. I. Schindler, Haiana Charifker. II. Pimentel, Lílian Maria Lapa Montenegro. III. Guedes, Gabriela Moraes Rego. III. Título.

CDU 614

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO TESTE QUANTIFERON-TB GOLD® PARA
O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE LATENTE EM PACIENTES
IMUNODEPRIMIDOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado Acadêmico em Saúde
Pública do Instituto Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, para a obtenção do grau de
doutor em Ciências.

Aprovada em: 29/08/2018

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Haiana Charifker Schindler

Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr^a Sílvia Maria Lucena Montenegro

Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr^a Zulma Maria de Medeiros

Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti

Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr^a Andrea Santos Lima

Faculdades Integradas de Vitória de Santo Antão e Faculdade IBGM

**Dedico este trabalho a minha família,
aos amigos e pacientes.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado coragem, saúde e força para enfrentar os desafios para realizar este trabalho. E por tantas bênçãos recebidas.

Aos meus pais, Genival pelo exemplo de caráter e determinação, e Edla minha grande amiga, por todo incentivo e dedicação. Muito obrigada pelo suporte, ensinamentos e pelo grande amor incondicional.

Ao meu amor Márcio, por me sentir sempre amada, pela sua amizade, pela compreensão dos meus sonhos, me incentivando e ajudando a encarar as dificuldades. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado.

Aos meus filhos Tiago e Lucas que são os meus maiores incentivadores para continuar lutando e buscando sempre a felicidade. E que eles nunca desistam de seus sonhos, com caráter e humildade. Amo muito vocês!

À minha irmã Ticiania pelo seu amor, amizade e confiança. E a nossa Maria pelo apoio, ajuda e carinho.

À minha amiga e sogra Pérola Campos pelo seu legado, me ensinando a acreditar no meu potencial e fazendo crescer a minha sede de conhecimento.

À minha orientadora Haiana Schindler, pela grande oportunidade da realização deste trabalho, pela sua valiosa orientação, competência, paciência, ensinamentos, respeito e acima de tudo por termos construído uma amizade. Obrigada por tudo!

À minha coorientadora Lílian Montenegro, amiga querida, por fazer acreditar que sou capaz, pela sua competência, dedicação, atenção, pela ajuda com nossos pacientes e por sempre tentar uma solução para os nossos obstáculos. Sempre serei grata!

À minha coorientadora Gabriela Guedes pelo incentivo, amizade e pelo apoio em continuar esse projeto. Grata!

A toda a equipe do laboratório de Imunoepidemiologia, obrigada por ser uma grande família, por toda amizade, ajuda, apoio, meus grandes cientistas, pelo ambiente maravilhoso de trabalho e por nossas terapias diárias, que foram e serão essenciais na minha vida. Muito obrigada! As “tuberculetes” : Aline, Dany, Deza, Renatinha, Luana, Ilyana, Kessia, Thais, Duda, Raíssa, Larissa, Marcela, Rosana, Juliana, Lílian, Haiana e todas as outras que passaram nesses anos. Gratidão a vocês! Aos meus Menudos: Leonardo, Romário, João Paulo, Yuri e todos que já estiveram presentes, uma vez Menudo sempre serão!

Aos amigos e agregados das “tuberculetes”: Neide, Bruna, Simone, Deinha, Fábio Lopes, Debys, Kaly, Romero, Danilo, Heidi, Gabi, Laís que apoiaram, estimularam e contribuíram de alguma forma para realização e construção deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

Às minhas amigas Laís e Heidi pelo incentivo e a grande amizade. Por sempre estarem presentes na minha vida e pela ajuda constante.

Aos meus três tesouros: Leonardo, Aline e Marcela por tanta paciência, amor e amizade. Pela ajuda e sempre dispostos sem medirem esforços para mim. Pelas terapias e amizade verdadeira! Pelas tardes do laguinho! E Nina pela paciência de todos os dias e ajuda científica! Amo vocês!

Agradecimento a Aline, Juliana, Deza e Marcela pela participação de campo comigo. E Romário pela formatação e paciência no final da tese. A Michelle Rabelo pelo ensinamento e crescimento tecnológico.

A todos os amigos e amigas de longas datas que sempre estiveram de alguma forma torcendo, orando, incentivando e apoiando durante essa fase. Aos meus familiares que estiveram torcendo e apoiando nessa caminhada. Muito Obrigada!

Aos meus amigos e amigas do doutorado acadêmico de saúde pública CPqAM/FIOCRUZ, turma 2014/2018 um agradecimento pelos momentos em que convivemos, compartilhamos, pela amizade e tanta contribuição científica. E professores pela contribuição à ampliação dos conhecimentos.

Aos membros e colaboradores do departamento de Imunologia CPqAM/FIOCRUZ, que de forma direta ou indireta contribuíram com este trabalho. A equipe do professor da entomologia que estão me recebendo com tanto carinho e na torcida. Obrigada!!

Aos membros da banca examinadora Silvia Montenegro, Zulma Medeiros, Milena Cavalcanti e Andrea Santos, Idê Gurgel e Rosana Montenegro pela competência, estando sempre disponíveis e pelas contribuições que enriqueceram ainda mais este trabalho. Obrigada!

Aos funcionários e colaboradores CPqAM/FIOCRUZ que de alguma forma contribuíram e me receberam com tanto respeito. Obrigada!

A Dra. Magda Caruzo e Dr. Rafael Sacramento pela colaboração, incentivo e pela dedicação, competência e por amar o que fazem. Obrigada!

A todos os pacientes, médicos, enfermeiros, biólogos, biomédicos e contatos que cuja participação foi fundamental para que este trabalho se concretizasse.

A todos que me apoiaram, acreditaram, colaboraram para meu crescimento pessoal e realização, o meu imenso agradecimento.

SANTOS, Fabiana Cristina Fulco. **Avaliação do desempenho do teste QUANTIFERON-TB GOLD® para o diagnóstico da tuberculose latente em pacientes imunodeprimidos do estado de Pernambuco.** 2018. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

A infecção latente da tuberculose (ILTB) é o período entre a entrada do bacilo no organismo e o aparecimento da tuberculose ativa, onde o paciente não apresenta sintomas nem evidência clínica ou radiológica da doença. Pode ocorrer principalmente em pacientes imunodeprimidos, que tem os mecanismos imunológicos deficientes por doenças ou condições que alteram as defesas imunitárias. A ILTB é diagnosticada quando o indivíduo apresenta um teste tuberculínico (TT) positivo associado à exclusão da doença ativa. A metodologia que utiliza a dosagem de interferon-gama (IFN- γ), denominado *Interferon-Gamma Release Assays – IGRAs*, tem sido considerada um grande avanço no diagnóstico da ILTB. O princípio da técnica é avaliar a produção de IFN- γ em resposta à estimulação por antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*. Foram analisados 106 pacientes. Dos pacientes incluídos na pesquisa, 64 (60,4%) foram do sexo masculino e 42 (39,6%) do sexo feminino, com idade variando de 14 a 78 anos com média de 38 anos. Todos os pacientes realizaram o TT através da inoculação intradérmica do derivado proteico purificado (PPD) do *Mtb* e coletaram sangue para realização do IGRA. Dentre as doenças imunossupressoras do estudo, a infecção pelo *Human Immunodeficiency Virus (HIV)* foi a mais prevalente. Considerando o resultado da TT como o teste padrão para o diagnóstico da ILTB, a sensibilidade e especificidade do teste QFT-GIT foi de 73,68% e 93,85%, respectivamente. A concordância global entre os testes diagnósticos QFT-GIT e TT foi considerada substancial com o valor de κ 0.6881 ($p < 0,001$). Nas pessoas vivendo com HIV/AIDS(PVHA) a sensibilidade e especificidade do teste QFT-GIT foi de 81,82% e 95,83% respectivamente. A concordância global entre os testes diagnósticos QFT-GIT e TT foi considerada substancial com o valor de κ 0.7765 ($p < 0,001$). O QFT-GIT apresentou um bom desempenho, sendo indicado como ferramenta complementar para detectar ILTB em pacientes imunodeprimidos, principalmente quando o TT for negativo.

Palavras-chave: Tuberculose; Tuberculose latente; Teste Tuberculínico.

SANTOS, Fabiana Cristina Fulco. **QUANTIFERON-TB GOLD® test performance assessment for the diagnosis of latent tuberculosis in immunosuppressed patients in state of Pernambuco.** 2018. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

ABSTRACT

Latent Tuberculosis Infection (ILTBI) is the period between the entry of bacillus into the body and the appearance of active tuberculosis, where the patient has no symptoms or clinical or radiological evidence of the disease. It may occur primarily in immunocompromised patients, who have immune mechanisms deficient by disease or conditions that alter immune defenses. ILTB is diagnosed when the individual has a positive tuberculin test (TT) associated with exclusion of active disease. The methodology using interferon-gamma (IFN- γ), called Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs), has been considered a major advance in the diagnosis of ILTB. The principle of the test is to evaluate IFN- γ production in response to stimulation by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) – specific antigens. A total of 106 patients were analyzed. Of the patients included in the study, 64 (60.4%) were males and 42 (39.6%) were females, ranging in age from 14 to 78 years with mean age of 38 years. All patients performed TT through the intradermal inoculation of purified protein derivative (PPD) from *Mtb* and collected blood for IGRA. Among the immunosuppressive diseases in the study, Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection was the most prevalent. Considering the TT result as the standard test for ILTB diagnosis, the sensitivity and specificity of the QFT-GIT test was 73.68% and 93.85%, respectively. The overall agreement between the QFT-GIT and TT diagnostic tests was considered substantial with the value of κ 0.6881 ($p < 0.001$). In the PLHA the sensitivity and specificity of the QFT-GIT test was 81.82% and 95.83%, respectively. The overall agreement between the QFT-GIT and TT diagnostic tests was considered substantial with the value of κ 0.7765 ($p < 0.001$). QFT-GIT showed good performance, being indicated as a complementary tool to detect ILTB in immunodepressed patients, especially when TT is negative.

Keywords: , Tuberculosis, Latent Tuberculosis; tuberculin test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa da prevalência de HIV em novos casos de tuberculose em 2016.....	21
Figura 2 - Microscopia eletrônica do bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
Figura 3 - Imunopatogenia da tuberculose	26
Figura 4 - Aplicação e leitura do teste tuberculínico.....	31
Figura 5 - Estágios do processamento do QFT-TB	43
Figura 6 - Preparação da curva padrão do QFT-TB	44
Figura 7 - Intepretação dos resultados do QFT-GIT	44
Figura 8 - Fluxograma dos pacientes imunodeprimidos	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indicações de tratamento ITBL de acordo com a idade, resultado do Teste Tuberculínico (TT) e risco de adoecimento.	33
Tabela 2 - Frequência das condições / doenças imunossupressoras.....	47
Tabela 3 - Frequência dos casos de ILTB de acordo com a condição/doença imunossupressora	48
Tabela 4 - Desempenho do teste QFT-GIT em 84 pacientes considerando o Teste tuberculínico como padrão referencial.	48
Tabela 5 - Desempenho do IGRA (QFT-GIT) no diagnóstico da ILTB na população geral estudada.	50
Tabela 6 - Desempenho do IGRA (QFT-GIT) no diagnóstico da ILTB em PVHA.	50
Tabela 7 - Resultados positivo e negativo e indeterminado para QuantiFeron-TB® GOLD e Teste Tuberculínico em pacientes HIV, estratificado pela contagem de células T CD4+.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
CFP-10	<i>Culture filtrate protein 10</i>
CGPNCT	Coordenação Geral do Programa de Controle da Tuberculose
DNC	Doenças de Notificação Compulsória
DNSP	Departamento Nacional de Saúde Pública
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immunospot</i>
ESAT-6	<i>Early secretory antigen target 6</i>
HAM	Hospital Agamenon Magalhães
HC	Hospital das Clínicas
HCP	Hospital Correia Picanço
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFN-γ	<i>Interferon-Gamma</i>
IGRA	<i>Interferon-Gamma Release Assay</i>
ILTb	Infecção latente da tuberculose
INH	Isoniazida
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMCD	Medicamentos modificadores do curso da doença
MNT	Micobactérias não tuberculosas
MS	Ministério da Saúde
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

NK	Células <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNCT	Plano Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	<i>Purified protein derivative</i>
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/AIDS
QFT-GIT	QUANTIFERON®-TB Gold in tube
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TB	Tuberculose
TBEP	Tuberculose extrapulmonar
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-Like</i>
TT	Teste tuberculínico
UT	Unidades de tuberculina
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO LITERÁRIA	18
2.1 Histórico	18
2.2 Epidemiologia	20
2.3 Agente etiológico	22
2.4 Transmissão	23
2.5 Imunopatogenia	24
2.6 Tuberculose Latente	26
2.7 Condições imunossupressoras	29
2.8 Diagnóstico	29
2.8.1 Teste Tuberculínico	30
2.8.2 QUANTIFERON®-TB Gold in tube (QFT-GIT)	33
2.9 Tratamento	35
3 JUSTIFICATIVA	36
4 PERGUNTA CONDUTORA	37
5 HIPÓTESE.....	38
6 OBJETIVO GERAL	39
6.1 Objetivos Específicos.....	39
7 METODOLOGIA.....	40
7.1 Tipo de estudo	40
7.2 Local de estudo e seleção das amostras	40
7.2.1 Definição dos pacientes	40
7.2.2 Critérios de inclusão	41
7.2.3 Critérios de exclusão	41
7.2.4 Critérios de Perda.....	41

7.2.5 Cálculo amostral	41
7.3 Coleta das amostras biológicas.....	41
7.4 Exames diagnósticos	42
7.4.1 Teste Tuberculínico	42
7.4.2 QUANTIFERON®-TB Gold <i>in tube</i> (QFT-GIT)	42
7.5 Armazenamento do material biológico.....	45
7.6 Armazenamento e análise de dados	45
7.7 Considerações éticas	45
8 RESULTADOS	47
8.1 Análise do perfil epidemiológico, demográfico e clínico dos participantes do estudo.....	47
8.2 Desempenho dos testes diagnósticos	47
8.3 Níveis de células T CD4+ em PVHA	50
9 DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE A – PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE	75
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)..	81
APÊNDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)	83
APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO	87
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	94

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), bacilo álcool ácido resistente (BAAR), que afeta principalmente os pulmões, podendo atingir outros órgãos do corpo, ocasionando a tuberculose extrapulmonar (TBEP). A fonte de infecção é o indivíduo com a forma pulmonar da doença chamado de bacilífero, que elimina bacilos para o exterior, (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Amplamente difundida no mundo, a TB permanece como uma das infecções mais devastadoras, sendo considerado um dos mais importantes problemas de Saúde Pública atual, sobretudo nos países em desenvolvimento (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2010). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde 2016, ocorreram 6,3 milhões de novos casos de TB no mundo, responsáveis pela morte de 1,4 milhões de indivíduos. A TB é a segunda causa mais comum de morte por doenças infecciosas, depois da síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome - AIDS*).

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus - HIV*) é hoje importante fator de risco para o aumento da incidência de TB, não apenas pela associação patológica, mas por uma combinação de fatores que favorecem a evolução da doença em ambas as condições. Estima-se que 10,4% dos indivíduos notificados com TB apresentam coinfeção TB-HIV no Brasil (BRASIL, 2015b; OLIVEIRA et al., 2010).

Entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo, o Brasil ocupa o 18º lugar (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2015). O Nordeste atualmente ocupa o terceiro lugar em número de casos novos entre as regiões do Brasil e o primeiro lugar em número de óbitos pela doença. Pernambuco é um dos estados com maiores taxas de incidência, ocupando o terceiro lugar em número de casos novos de TB entre os estados brasileiros, e a primeira posição na região Nordeste (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018).

A história natural da TB mostra que a grande maioria dos indivíduos é resistente à infecção, possivelmente devido à capacidade de gerar uma eficiente resposta imunológica ao *Mtb*, embora sejam incapazes de eliminar completamente o microorganismo. Estima-se que 50 milhões de brasileiros estejam infectados pelo bacilo da TB. Das pessoas expostas ao *Mtb*, cerca de 90% permanecem latentes, com bacilos retidos dentro do granuloma. Na população

com (ILTB), 5 a 10% progridem, transformando-se em TB ativa em adultos, sendo o risco maior em crianças (BONGIGLIOLI et al., 2014; NORTH, 2004; TEXEIRA et al, 2007).

A ILTB é o período entre a entrada do bacilo no organismo e o aparecimento da TB ativa, onde o paciente não apresenta sintomas nem evidência clínica ou radiológica da doença. Em algumas circunstâncias, quando ocorre um desequilíbrio na resposta imune do hospedeiro, há reativação da infecção latente e ativação da TB (BUSATTO et al., 2015; FERREIRA; CALDAS, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2009).

O paciente com infecção latente constitui um importante reservatório de reativação da infecção, embora não a transmita. Durante o período de latência, há a possibilidade de adoção de medidas medicamentosas denominadas atualmente de tratamento da ILTB, em substituição ao termo quimioprofilaxia (BUSATTO et al., 2015; CAVALCANTI, 2010; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011; FERREIRA; CALDAS, 2015). Indivíduos com ILTB podem permanecer saudáveis por décadas ou, em uma proporção desconhecida, podem combater a infecção espontaneamente, contudo, existe um risco significativamente elevado de desenvolver TB durante seu tempo de vida (HUR et al.,2013).

Este processo de reativação pode ocorrer principalmente em pacientes imunodeprimidos, que tem os mecanismos imunológicos deficientes por doenças ou condições que alteram as defesas imunitárias (HIV positivos, transplantados, indivíduos sob corticoterapia ou em tratamento com inibidores do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), diabéticos, pacientes com insuficiência renal crônica, portadores de certas neoplasias, como o linfoma, entre outras) (CARRAZEDO, 2009; LAWN et al.,2005; TEXEIRA et al, 2007).

Conforme as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, o diagnóstico da infecção latente da TB (ILTB) é realizado através do indivíduo que apresenta um teste tuberculínico (TT) positivo associado à exclusão da doença ativa. O TT consiste em uma reação intradérmica que avalia, *in vivo*, a resposta imune celular do hospedeiro contra um derivado proteico purificado (*Purified Protein Derivative – PPD*) do *Mtb*. Uma enduração ≥ 10 mm é considerada positiva. Todavia essas diretrizes incluem diferentes grupos de risco, dentre eles, os pacientes imunodeprimidos onde o TT é considerado positivo quando apresentar resultado ≥ 5 mm (LOPES, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2009).

Nos últimos anos, a metodologia que utiliza a dosagem de interferon-gama (*Interferon-Gamma - IFN- γ - Release Assays - IGRAs*) tem sido considerada um grande avanço no diagnóstico da ILTB (HARDY et al., 2010; MENZIES; PAI; COMSTOCK, 2007; RANGAKA et al., 2007; STOUT; MENZIES, 2008). O princípio da técnica é avaliar a

produção de IFN- γ em resposta à estimulação por antígenos específicos do *Mtb* (MACHADO et al., 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; SUCCI, 2014).

Há dois testes disponíveis para a dosagem da citocina: QUANTIFERON-TB GOLD IN TUBE®, (QFT-GIT, Cellestis, Australia) e o T-SPOT. TB (Oxford Immunotec, UK). O QFT-GIT é um ensaio enzimático de imunoabsorção que avalia os níveis de IFN- γ produzidos em resposta a três antígenos específicos do *Mtb*: *early secretory antigen target 6* (ESAT-6), *culture filtrate protein 10*(CFP-10) e TB7.7. O T-SPOT. TB mede a quantidade de células mononucleares periféricas que produzem IFN- γ frente a dois antígenos específicos: ESAT-6 e CFP-10, sendo o seu princípio baseado em *Enzyme-Linked Immunospot* (ELISPOT) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; SUCCI, 2014).

O alvo principal para erradicação da TB seria impedir a cadeia de transmissão e controlar a doença, pois embora tenha tratamento e cura, ainda é uma doença preocupante que mata milhões de pessoas em todo o mundo (BRASIL, 2013). O TT é atualmente o único teste preconizado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da ILTB. No entanto, existem algumas limitações para sua realização. Os indivíduos vacinados com BCG podem ter resultados falso-positivos devido à presença de alguns antígenos que compõem a vacina. Também pode ocorrer sensibilização cruzada aos antígenos de micobactérias não tuberculosas (MNT) (BROCK *et al.*, 2004; HERRERA et al, 2011; MENZIES; PAI; COMSTOCK, 2007; MENZIES, 1999; STOUT; MENZIES, 2008; ROSS; GOFF, 2005;).

O retorno do paciente para a leitura depois da aplicação do TT também leva a um grande percentual de perda, devido a não comparecerem para leitura (BROCK et al., 2004; LINAS et al., 2011). Resultados falso-negativos poderão ser obtidos, devido à imunossupressão, principalmente em pacientes portadores do HIV (BROCK et al., 2004; MENZIES; PAI; COMSTOCK, 2007).

Diante do exposto, há uma necessidade de testes mais sensíveis para pacientes com imunossupressão. O QFT-GIT pode ser uma alternativa para investigação da ILTB, visto que necessita apenas de uma única visita do paciente para a realização do teste, apresenta menor risco de efeitos adversos por serem realizados *in-vitro* e são potencialmente desprovidos do efeito *booster* (HORSBURGH; RUBIN, 2011; MENZIES; PAI; COMSTOCK, 2007; PAI; ZWERLING; MENZIES, 2008;).

Compreender os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da doença ativa pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de combate à doença. Devido às dificuldades diagnósticas, fica cada vez mais evidente a importância da busca de novas metodologias de

base imunológica, mais sensíveis, que auxiliem na investigação da ILTB, sobretudo em pacientes imunodeprimidos que apresentam um risco maior de adoecer gravemente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

No âmbito mundial, a TB ainda continua como doença negligenciada e apresenta-se como um grande problema de Saúde Pública. No Brasil, a TB destacou-se no século XIX, difundindo-se entre a população mais pobre assolada pela fome, e amontoadas em cortiços que propiciavam a disseminação da doença. Em 1898, a TB foi a principal causa de morte entre a população menos favorecida economicamente. Neste mesmo período, o principal objetivo do império era combater a febre amarela, adiando o combate à TB (PINHEIRO, 2016).

No início do século XX, a doença tornou-se um problema de caráter social, com ocorrência e propagação estreitamente relacionadas às condições de vida e de trabalho resultante da nova organização social oriunda do processo de industrialização. Esses fatos colaboraram para o medo coletivo diante da doença, que associa ao seu portador ao comportamento não condizente em relação às normas sociais. O receio diante da TB acabou acarretando na estigmatização do doente e seu consequente isolamento nas relações sociais (PORTO, 2007).

O controle da doença pelo Estado só se deu quando os doentes foram vistos como uma ameaça social. Foi quando o Estado iniciou uma fase de maior intervenção no combate à TB. Em 1920, com a criação do Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP) e da Inspeção de Profilaxia da Tuberculose, passou-se a adotar medidas profiláticas enérgicas para conter a proliferação da doença (ZANETTI, 2012).

Em uma tentativa de combate à TB, houve a criação da vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin), obtida experimentalmente em 1906 e inoculada em crianças e adolescentes a partir de 1920. É originária de cepas atenuadas, avirulentas do *Mycobacterium bovis*, após mutações genéticas e com propriedades imunogênicas protetoras contra a TB desenvolvida por Camille Calmett e Albert Guérin no Instituto Pasteur em Paris. O uso da vacina BCG foi adotado largamente a partir de 1920. Impulsionada pela OMS, a partir de 1921, a vacina passou a ser utilizada em humanos. Há concordância na literatura mundial de que o BCG intradérmico é eficaz contra as formas graves de TB, como meningoencefalite e TB miliar (PEREIRA et al., 2007).

Em 1940, surgem os primeiros antibióticos para o tratamento da TB, colaborando assim para a mudança da perspectiva ameaçadora da doença (HIJJAR et al, 2006). No ano de 1944, é noticiada a descoberta da estreptomicina, sendo utilizada pela primeira vez em humanos e evidenciado seu poder terapêutico. Dois anos depois, foi demonstrado o efeito do ácido paraaminossalicílico sobre o bacilo. A isoniazida foi usada para tratamento da TB, em 1952, logo depois surgiu, em 1954, a pirazinamida, em 1955, a ciclosserina, em 1962, o etambutol e a rifampicina em 1963 (HIJJAR; PROCÓPIO, 2006).

Quando o tratamento foi estabelecido com drogas isoladas, além dos efeitos colaterais e tempo prolongado da terapêutica, foram observadas as cepas resistentes do *M. tuberculosis*, recomendando a importância do tratamento com duas ou mais drogas associadas. De tal modo, em 1960, começaram os esquemas com antibióticos padronizados, primeiramente em 18 meses e posteriormente em 12 meses (RUFFINO-NETTO; SOUZA, 1999).

Com a emergência da AIDS na década de 1980, modificaram-se em parte as características da doença, agravando a situação epidemiológica, constituindo-se em um dos principais complicadores da doença em países com altas taxas das duas infecções, como o Brasil. Assim, a atenção sobre as doenças emergentes como a AIDS e sua relação com a TB levou alguns a supor ser a TB um problema emergente em nosso meio. Todavia representa um problema presente há longo tempo (CAMPOS; PIANTA, 2001; RUFFINO-NETTO, 2002).

A partir de 1998, a TB foi incluída na Portaria 4.052, do Ministério da Saúde, que determina as Doenças de Notificação Compulsória em todo o território nacional. O relançamento desta portaria, dentro do contexto da descentralização da saúde, favoreceu a extensão, em todos os municípios brasileiros, do novo Plano Nacional de Controle da TB, lançado em março de 1999 pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2002).

O Programa Nacional de Controle da TB (PNCT) surgiu no ano de 2004, padronizando ações desde o diagnóstico até os esquemas terapêuticos e critérios de alta. O programa é uma grande evolução histórica de organização política. Baseia-se na descentralização e horizontalização das ações de vigilância, prevenção e controle da TB (HIJJAR; PROCÓPIO, 2006). O PNCT permanece integrado na rede de serviços de saúde, desenvolvido por intermédio de um programa unificado, executado em conjunto pelas esferas federal, estadual e municipal. Está subordinado a uma política de programação das suas ações com padrões técnicos e assistenciais bem definidos, garantindo desde a distribuição gratuita de medicamentos e outros insumos necessários até ações preventivas e de controle do agravo. Isto permite o acesso universal da população às suas ações (HIJJAR; PROCÓPIO, 2006).

No Brasil, a TB está introduzida entre as Doenças de Notificação Compulsória (DNC) em todo território nacional, sendo estabelecido como mecanismo de notificação o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS). O controle da TB, em termos coletivos e individuais, envolve diversos graus de complexidade, tanto para o estabelecimento do diagnóstico como para a cura clínica e bacteriológica dos pacientes na comunidade (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008).

O tratamento da TB não depende apenas e exclusivamente da existência, gratuidade dos medicamentos e de sua eficácia farmacológica, devem-se considerar todos os demais elementos no processo de atenção, tais como a melhora do acesso aos serviços de saúde, a adesão e a coparticipação da pessoa com TB e da sua família (SILVA et al., 2014).

A parcela da população que está submetida às precárias condições de moradia, à falta de saneamento básico, à baixa distribuição de renda, ao baixo índice educacional, entre outros determinantes sociais, está mais vulnerável ao desenvolvimento dessa doença (BRUNELLO et al., 2009). Atualmente a OMS constituiu uma meta que prevê a eliminação da TB no mundo até o ano de 2035 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Dentre essas prioridades está o diagnóstico da TB infantil, que se torna difícil em relação ao adulto.

Embora a transmissão da TB tenha sido documentada mais de uma década antes da descoberta do seu agente etiológico, existem ainda lacunas importantes no conhecimento da TB. A principal está relacionada com o evento infecção/progressão para doença e ao fenômeno de latência do *MTB* (STARKE JR. COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES, 2014).

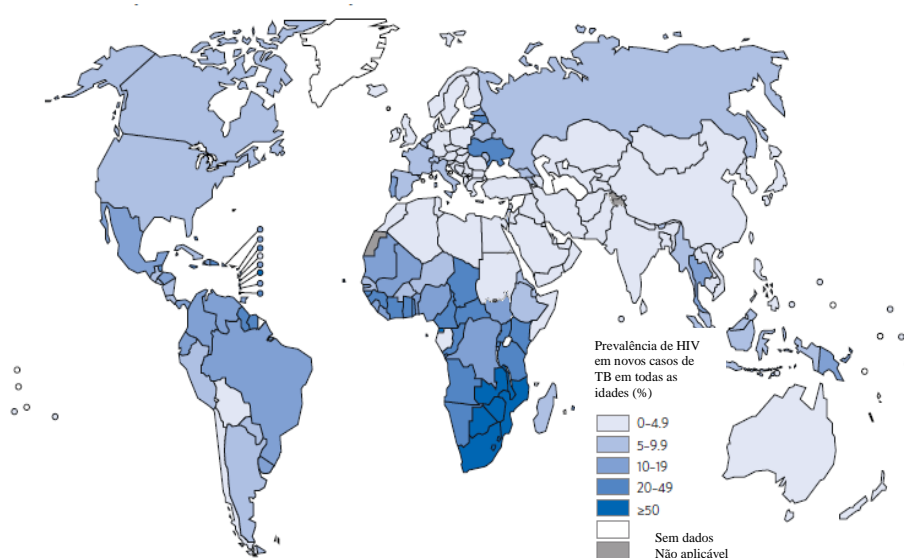
2.2 Epidemiologia

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da TB. As taxas estimadas pela OMS indicam que 10,4 milhões são de novos casos de TB e 1,3 milhões de mortes que ocorreram ao redor do mundo em 2016. No mesmo ano, foram estimados 1,03 milhões de novos casos de TB em pacientes HIV-positivos (12% do total de casos de TB), dos quais 75% encontram-se na África (Figura 1). Seis países foram responsáveis por 60% de todos os novos casos em 2015: Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Dentre a população mundial, estima-se que dois bilhões de pessoas estejam com ILTB, o que representa um grande potencial para desenvolvimento da doença no mundo (DYE et al., 1999; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). Na Ásia e África concentram-se 80% dos casos de ILTB onde estão os grupos etários mais velhos, uma vez que a prevalência da infecção aumenta com a idade. Entretanto estima-se que 100 mil crianças estejam infectadas pelo bacilo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

O número de pessoas vivendo com HIV que receberam tratamento para ILTB chegou a quase um milhão no ano de 2016. Como nos anos anteriores, a África do Sul apresentou a maior porcentagem dessa parcela de indivíduos (41%), seguido de Moçambique, Zimbábue e Malawi (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Figura 1 Estimativa da prevalência de HIV em novos casos de tuberculose em 2016.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2017)

No Brasil, no ano de 2017 foram notificados 69.569 casos novos de TB. Entre as capitais, foram registrados 25.926 casos novos de TB, o que corresponde a 38,1% do total de casos novos diagnosticados no país. Há uma estimativa de que 57 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Mtb* no Brasil. Entre os anos de 2008 a 2015, observou-se uma maior taxa de prevalência de TB entre o sexo masculino, com maior predomínio nos indivíduos economicamente ativos (15-54 anos) (BRASIL, 2015a). As capitais com maior coeficiente de

incidência da TB, em 2017, foram Manaus (104,7/100 mil hab.), Rio de Janeiro (88,5 /100 mil hab.) e Recife (85,5/100 mil hab.) (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2018).

A mortalidade por TB também diminuiu, tendo reduzido em 15,4% entre os anos de 2006 a 2015. Entretanto, foram registrados cerca de 4.500 óbitos pela doença no ano de 2015, um número considerado alto, visto que a TB é uma doença que tem cura. O Brasil está na 18ª posição em carga de TB, representando 0,9% dos casos estimados no mundo e 33% dos estimados para as Américas (BERTOLOZZI et al., 2014; BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2018; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Os maiores coeficientes de mortalidade, no ano de 2016, foram registrados em Recife (6,4/100 mil habitantes), Belém (5,3/100 mil habitantes) e Manaus (4,7/100 mil habitantes.) (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2018, BRASIL, 2015a).

2.3 Agente etiológico

Atualmente, são reconhecidas mais de 120 diferentes espécies de micobactérias, a minoria patogênica em humanos (GUTIERREZ et al., 2005; LEITE; SATO, 2006). As micobactérias pertencem à família Mycobacteriaceae, constituída de dois gêneros, *Amycolicoccus* e *Mycobacterium*, sendo este último de maior importância clínica (WANG et al, 2010). O complexo *Mtb* é constituído pelas espécies *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* e *M. tuberculosis*. Os dois principais agentes causadores de doença em humanos são: *M. leprae*, causador da lepra ou hanseníase e *M. tuberculosis*, causador da TB (ALVES, 2008; COLE et al., 1998; DUCATI et al., 2006).

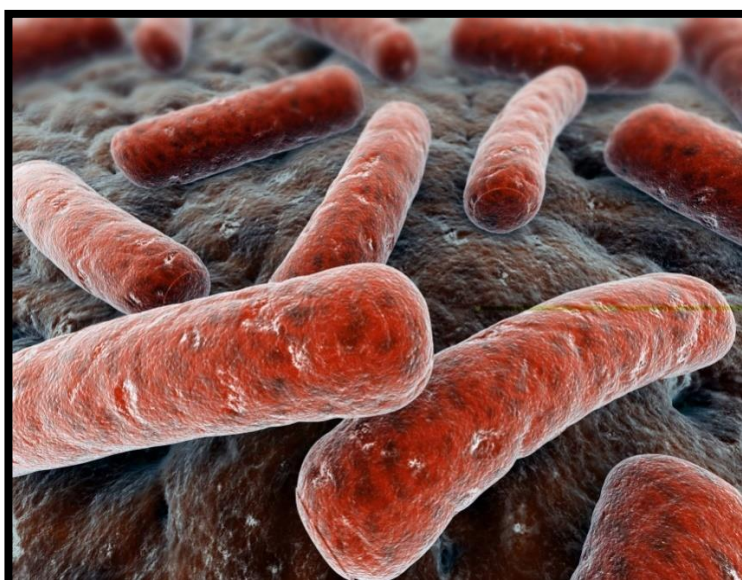
Em 1882, o alemão Robert Koch descreveu pela primeira vez o bacilo, o seu isolamento e cultivo, e o identificou como o causador da TB. Desde então, passou a ser conhecido como o bacilo de Koch (SCHUSTER, 1995). Os bacilos medem de 0,2 a 0,6 mm de diâmetro e 1 a 10 mm de comprimento (Figura 2). São imóveis, não esporulados, não capsulados, aeróbios estritos e sua faixa de temperatura ótima de crescimento é 35-37°C (COELHO; MARQUES, 2006).

O *Mtb* possui uma parede celular com um elevado teor de lipídeos, complexos de alto peso molecular, denominados ácidos micólicos, que abrangem cerca da metade do peso da parede celular bacteriana, tornando sua superfície hidrofóbica. Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa, contendo de 60 a 90 átomos de carbono na sua totalidade. Devido ao elevado conteúdo de ácidos micólicos, as micobactérias se beneficiam de uma parede celular espessa que lhes confere proteção, tornando-as relativamente resistentes a uma grande parte

dos antimicrobianos utilizados no tratamento das doenças por elas causadas. A característica hidrofóbica faz com que a estrutura da parede celular seja impermeável a diversos compostos (ALVES, 2008; HETT & RUBIN, 2008; HONG & HOPFINGER, 2004; MACIEIRA, 2000).

Os bacilos têm como características serem aeróbios estritos, pois necessitam de oxigênio para crescerem e se multiplicarem. Possuem crescimento lento, dividindo-se a cada 18 ou 24 horas, e possuem propriedade de álcool ácido resistência, ou seja, quando corados a quente com fucsina fenicada de Ziehl retêm o corante após lavagens com soluções de álcool (97%) e ácido (3%) (propriedade utilizada na coloração de Ziehl-Neelsen (HARRIES et al., 2004; LEITE ; SATO, 2006).

Figura 2- Microscopia eletrônica do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*



Fonte: Fonte: Saúde Dicas (Tuberculose, 2017)

2.4 Transmissão

A TB é transmitida após o contato com um paciente bacilífero através da tosse, espirro, fala, onde os indivíduos podem ou não se infectar com *Mtb*. Esta infecção vai depender da carga bacilar do doente, do ambiente de contato, do tempo de exposição e das condições do hospedeiro. Desenvolvendo a infecção, a resposta inicial é uma reação de hipersensibilidade tardia, com a formação do nódulo de Ghon, usualmente situado no pulmão, progredindo por disseminação linfática para linfonodos regionais (mediastinal ou de hilo

pulmonar), formando o complexo de Ghon ou complexo primário, com ou sem reação pleural (MARAIS et al., 2005.,BLOK et al., 2014).

Aproximadamente em 95% dos indivíduos, o sistema imunológico consegue bloquear o complexo primário contendo a infecção, com raros ou nenhum sintomas. Estes quando presentes são autolimitados, como uma infecção viral ou reações de hipersensibilidade, podendo surgir eritema nodoso ou conjuntivite flictenular (MARAIS, 2014). Contudo, em alguns indivíduos (5%), geralmente crianças, a infecção não é contida e a TB doença se desenvolve, chamada então de TB primária. Mais de 90% dos casos ocorre entre os primeiros 2 a 12 meses após a infecção (CRUZ; STARKE, 2007; HERTTING; SHINGADIA, 2014; KRUK et al., 2008; MARAIS et al., 2005).

Apenas 5-10% dos indivíduos infectados apresentam sintomas clínicos e desenvolvem a doença ativa. Outros 90% dos indivíduos apresentam a infecção latente (ILTb), onde as manifestações clínicas não são evidentes, entretanto poderão sofrer um processo de reativação e evoluírem para doença ativa (BARRY *et al.*, 2009; LIN; FLYNN, 2010; WAYNE, 1994). Essas características dificultam o diagnóstico preciso dos indivíduos acometidos, contribuindo para uma maior disseminação da doença (ANDERSEN, 2007).

O estabelecimento da doença ativa depende tanto de fatores associados ao bacilo, como a virulência da cepa infectante da micobactéria e a quantidade de bacilos viáveis que atingem o pulmão, como de fatores associados ao hospedeiro e da integridade do sistema imunológico (COLLINS; KAUFMANN, 2001).

Muitos são os fatores que contribuem diretamente na imunidade do hospedeiro, como idade avançada, desnutrição, etilismo, neoplasias, estresse, PVHA, diabetes, gastrectomias, insuficiência renal crônica, silicose, tumores e o uso de medicações imunodepressoras. Esses indivíduos terão mais chances de desenvolver a TB do que os não portadores dessas doenças (SOUZA; BERTOLOZZI, 2014).

2.5 Imunopatogenia

Embora os progressos relevantes ao longo dos últimos anos sobre a compreensão dos mecanismos que contribuem para a imunidade protetora em relação ao *Mtb*, ainda permanecem os desafios científicos sobre a descoberta da resposta imune através de pesquisas clínicas e experimentais em detrimento à dificuldade na erradicação do patógeno e da sua capacidade de permanecer na forma clínica de latência, a partir da qual pode aumentar o risco de desenvolvimento da TB doença (BOZANNO; MARRAS; DE MARIA, 2014).

A imunidade para a TB é mediada pelo sistema imunológico celular, timo-dependente, através da interação entre linfócitos do tipo CD4+ também denominados de T *helper* (Th) ativados e macrófagos, com a liberação de citocinas específicas, especialmente interferon-gama (IFN- γ), principal citocina inflamatória observada na TB, e que estão relacionadas com a ativação do mecanismo de imunidade celular do tipo Th1 (GUEDES, 2013).

A imunidade mediada por células realiza um importante papel no aumento dos sintomas da doença. Entre os mecanismos de patogenicidade ressalta-se o impedimento da maturação do fagossomo e de sua fusão com os lisossomos (VERGNE et al., 2004) e consequentemente prevenção da apresentação de antígenos, presença de componentes em sua parede celular que mascaram seus peptídeos antigênicos (STENGER; NIAZI; MODLIN, 1998) e pela modulação das vias de morte das células em que se instala (SRINIVASAN; AHLBRAND; BRIKEN, 2014).

A fagocitose do *Mtb* mediada pelo macrófago alveolar e pelas células dendríticas é um fator de grande importância de todo processo de infecção-doença. Iniciando com a fusão do fagossoma contendo o bacilo e como também o lisossoma onde se encontram substâncias nocivas que tem como objetivo a destruição do bacilo. O bacilo sofre ação do pH ácido e de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio de enzimas lisossômicas, de peptídeos tóxicos e do IFN- γ dentro do fagolisossoma. Todavia, o bacilo pode resistir aos mecanismos imunes e multiplicar-se dentro dos macrófagos (CAMPOS, 2006).

Os macrófagos e as células dendríticas do tecido invadido tem uma variedade de receptores, os Toll-Like (TLRs), que reconhecem moléculas presentes nos patógenos, os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Os TLRs humanos envolvem várias proteínas da superfície celular que estimulam a transcrição de genes de citocinas inflamatórias em resposta a vários ligantes microbianos. Assim, os receptores colaboram para o sistema imune inato através do reconhecimento dos patógenos induzem também o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Os receptores quando ativados, realizam uma cascata de sinalização que envolve várias proteínas intracelulares (YIM et al., 2010). Os TLRs quando reconhecem o *Mtb* inicia a sinalização resultando na produção das citocinas do fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 1 (IL), a IL-12 e os reativos intermediários do nitrogênio, contribuindo assim para uma rápida ativação dos mecanismos da resposta imune (ARANCIBIA et al., 2007).

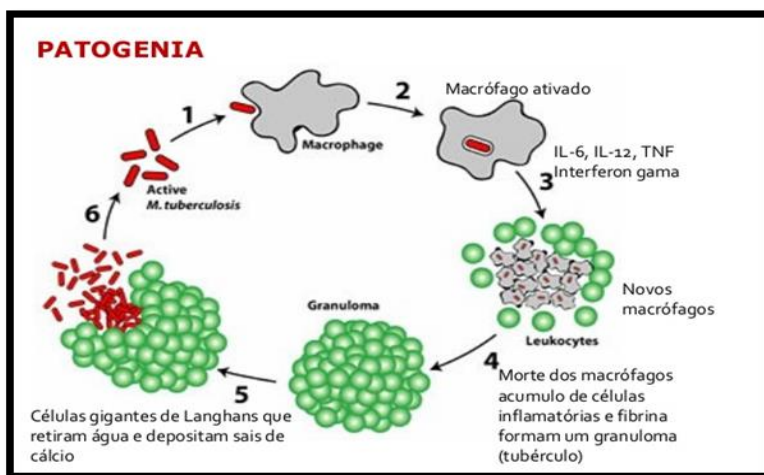
Os macrófagos são células efectoras e apresentadoras de antígenos (APCs) estimulando a resposta imune adaptativa de células T em Th1 ou Th2, fundamentada no reconhecimento específico entre diferentes células e a secreção de fatores solúveis como as citocinas e

quimiocinas. A apresentação é realizada por meio do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), de classe II, células dendríticas e linfócitos B (MOUTINHO, 2011).

As células Th1 exercem uma função efetora na resposta imune do *Mtb*. As células *Natural Killer* (NK), células citotóxicas da imunidade inata, são ativadas diretamente por bactérias ou, indiretamente, em resposta à citocina IL-12, proveniente de macrófagos ativados. As células NK ativadas induzem a produção de IFN- γ por linfócitos Th1, que resulta na morte do bacilo. Além disso, o IFN- γ estimula o monócito a produzir TNF, que por sua vez estimula a atividade bactericida intracelular. Através dessa ativação resultará a produção de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, óxido nítrico e enzimas lisossomais que sinergizam para destruir o patógeno (MOUTINHO, 2011).

O controle da infecção é realizado através de células T CD4 +, bem como as citocinas IL-12, IFN- γ , e TNF, porém os fatores que determinam o porquê de alguns indivíduos controlarem a infecção, enquanto outros não conseguem ainda não são claros. Os fatores genéticos do hospedeiro e do próprio patógeno podem ser associados com o risco aumentado de desenvolvimento da TB ativa (FIGURA 3) (O'GARRA et al., 2013).

Figura 3- Imunopatogenia da tuberculose



Fonte: Tuberculose (2017)

2.6 Tuberculose Latente

A ILTB é o período entre a entrada do bacilo no organismo e o aparecimento da TB ativa, onde o paciente não apresenta sintomas nem evidência clínica ou radiológica da doença. Entretanto, este paciente constitui um importante reservatório de reativação da doença,

embora não a transmita (BUSATTO et al., 2015; FERREIRA; CALDAS, 2015 ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 30 milhões de indivíduos tenham a ILTB (DYE et al., 1999; POORHASAN; HAGHDOOST; MASHRABI, 2010). Entretanto, nos casos em que ocorre a coinfeção por HIV pode acontecer o processo de reativação da doença, com um risco de 23% para esses indivíduos, chegando a 10% ao ano ou mais, enquanto que em indivíduos imunocompetentes o risco de adoecer está por volta de 2% (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003; HERRERA et al., 2011). Nesses indivíduos co-infectados o risco de morte por TB aumenta para valores acima de 10% ao ano (LAWN; WOOD; WILKINSON, 2011).

Além do grupo de indivíduos co-infectados, pacientes que utilizam fármacos imunossupressores, como medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD), sintéticos, corticoides e terapias imunobiológicas possuem 25 vezes mais risco de desenvolverem a TB ativa, apresentando geralmente as formas mais graves e disseminadas da TB extrapulmonar (BONFIGLIOLI et al., 2014).

Indivíduos com ILTB podem continuar saudáveis por décadas, ou, em uma proporção desconhecida, resolverem a infecção espontaneamente. Contudo, existe um risco significativamente elevado de desenvolver TB durante seu tempo de vida (HUR et al., 2013).

Na ILTB, o hospedeiro apresenta uma forte resposta imune que frequentemente detém o bacilo, porém, não elimina a infecção decorrente de alterações nos mecanismos de resistência que levam à reativação da doença (NORTH, 2004). Nesse estado, o bacilo de Koch pode manter-se vivo dentro de calcificações e mais frequentemente em focos granulomatosos com pouco ou nenhum oxigênio, impedindo sua multiplicação. A reativação da TB pode ser evitada por tratamento preventivo (SHALER et al, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

2.7 Condições imunossupressoras

O grande desafio para a detecção da ILTB é o risco de desenvolvimento da TB ativa, que é considerado maior em pessoas com o sistema imunológico comprometido, através de doenças ou tratamento imunossupressor (GOH et al., 2013). Pacientes com comprometimento da imunidade celular, PVHA, pacientes transplantados, diabetes Mellitus tipo I, mieloma e ainda imunossuprimidos por outras razões tais como: utilização da prednisona $\geq 15\text{mg/dia}$, fármacos imunossupressores e fármacos inibidores do anti TNF denominados agentes

biológicos aumentam consideravelmente o risco de progressão para TB ativa (GETAHUN et al., 2015).

O HIV é um retrovírus com duas cópias de RNA de cadeia simples em seu núcleo, da família *Retroviridae* e pertencente ao gênero *Lentivirinae*, capaz de causar a AIDS ou síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (BRASIL, 2013b). Após a infecção, em um período médio de 2 a 4 semanas após a infecção pelo HIV, ocorre a soroconversão. A fase aguda é considerada, na qual se observa uma grande produção de partículas virais diariamente e o indivíduo torna-se altamente infectante. Durante o pico da viremia e da atividade imunológica podem aparecer os sintomas da síndrome retroviral aguda, que vão desde um simples quadro viral inespecífico até manifestações que se assemelham à mononucleose infecciosa (STREECK; ALTFELD, 2011; BRASIL, 2013c).

Os sintomas mais comuns são febre, linfonodomegalia, faringite, exantema, mialgia e cefaleia, duram aproximadamente 14 dias e são normalmente autolimitados (STREECK; ALTFELD, 2011; BRASIL, 2013c). Nesta fase há uma rápida diminuição dos linfócitos T CD4+, aumento do número absoluto de linfócitos T CD8+ circulantes e inversão da relação CD4+/CD8+ (BRASIL, 2014a).

Na fase aguda, vai ocorrer a estabilização da viremia, que são utilizados como fator de prognóstico da evolução da doença. Havendo assim uma queda dos linfócitos T CD4+ está relacionada à atividade da replicação viral e progressão para a AIDS. Com o desenvolvimento da doença, presença de infecções bacterianas, sendo respiratórias e tuberculose na forma pulmonar cavitária, são mais frequente, inclusive com a contagem de linfócitos T CD4+ acima de 350 células/mm³ (BRASIL, 2013c). A fase de latência clínica é considerada assintomática com apenas algumas alterações clínicas (BRASIL, 2014a). A persistência de linfonodomegalia é comum, podendo também ser encontrada plaquetopenia, anemia e leucopenia leve (BRASIL, 2014c; STREECK; ALTFELD, 2011; BRASIL, 2013c).

Um grande marcador da função imunológica de PHVA é a contagem de linfócitos T CD4+ é e um determinante fundamental para início da terapia antirretroviral ou para início de profilaxia para infecções oportunistas (DYBUL et al., 2002; BRASIL, 2013d). Diversas doenças oportunistas estão associadas à AIDS, como a TB em todas suas formas e nessa fase as contagens dos linfócitos T CD4+ apresenta abaixo de 200 células/mm³ (BRASIL, 2013 d).

Na TB em pessoas portadoras do HIV as manifestações clínicas estão diretamente relacionadas ao aumento da imunossupressão. O aumento da imunossupressão há um risco maior do desenvolvimento da TB extrapulmonar e também disseminada, podendo alcançar linfonodos, pleura e outros sítios. PVHA tem um grande risco de adoecimento por TB, a única

forma de prevenção é por meio do diagnóstico e tratamento da ILTB (De PINHO et al., 2001; GOLUB et al., 2007; PAI; MENZIES,2007).

Os pacientes com imunossupressão crônica são de grande risco para o desenvolvimento da TB ativa, pois utilizam o tratamento medicamentoso sistemático, incluindo medicamentos modificadores de doenças (metrotexato), inibidores de TNF- α (adalimumabe e infliximabe) e os moduladores da ativação de linfócitos T (alefapte e efalizumabe) associados com corticoides.

A TB necessita de maior atenção devido ao papel do TNF- α ser relevante na formação e na manutenção da integridade do granuloma. A grande parte dos casos de TBEP ocorre nos primeiros meses de tratamento com anti TNF- α . A reativação da TB parece correr em um risco menor com o uso de outros agentes biológicos, não havendo ainda nada definido (MOTA et al.,2015).

Os glicocorticoides possuem também ação anti-inflamatória e exerce efeito na imunidade celular, a sua utilização é o alívio sintomático nos pacientes portadores de doenças inflamatórias imunomediadas. Devido a o seu potencial imunossupressor recomenda o rastreamento desses pacientes em todos tratados com doses de prednisona com doses superior ou equivalente a 15mg/dia, durante um período superior ou igual a um mês (SMOLEN et al.,2014).

Portanto, é recomendada a exclusão da TB no diagnóstico da ILTB nas quais essas terapias são indicadas. Pacientes com TT positivo devem iniciar tratamento para ILTB, podendo iniciar a terapêutica imunobiológica de 1 a 2 meses de tratamento para ILTB desde que apresente boa tolerância ao mesmo (DUARTE et al., 2012).

2.8 Diagnóstico

Diagnosticar a ILTB ainda é um grande desafio, devido à ausência de manifestações clínicas, a impossibilidade do isolamento do bacilo e a frequente ausência de alterações radiológicas, não havendo método ideal para seu diagnóstico (CASCANTE et al., 2007; GETAHUN et al., 2015; GUSMÁN et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2007).

No Brasil, o Manual de Recomendações para Controle da Tuberculose do MS, recomenda que todas as pessoas que tiveram contatos com pacientes bacilíferos devem ser avaliadas visando o diagnóstico de uma possível doença ativa ou uma infecção latente. Assim, pode-se iniciar o tratamento precoce da doença/infecção, com consequente diminuição da

morbimortalidade e da disseminação do bacilo, como também do desenvolvimento da doença ativa em indivíduos com infecção latente (BRASIL, 2011).

A infecção pelo HIV é o principal fator de risco para o desenvolvimento da ILTB por *Mtb*, podendo aumentar em mais de 20 vezes o risco de reativação da TB (GOLETTI, 1998; CORBETT, 2003). A dificuldade diagnóstica nestes pacientes está associada, dentre outros fatores, ao fato de que a imunodeficiência pode modificar o quadro clínico e radiológico da doença (JONES, 1993; KRAMER, 1990; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005).

A imunossupressão crônica é um reconhecido fator de risco para TB, a reinfecção da TB durante a terapia com corticoterapia ou em tratamento com inibidores TNF é uma das principais preocupações (CARRAZEDO, 2009).

O diagnóstico da ILTB é obtido a partir da reação positiva ao teste cutâneo tuberculínico (TT); avaliação positiva do teste sanguíneo (ensaios de produção de *interferon gama* – IGRA); baciloscopia negativa e nenhuma evidência clínica ou radiológica da TB ativa (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011). O TT, entretanto, possui baixa especificidade, podendo apresentar resultados falso-positivos, pois pode haver reação cruzada com a vacina BCG de *M.bovis* e com MNT. Possui também baixa sensibilidade em indivíduos imunodeprimidos, pois há uma diminuição da resposta das células mononucleares periféricas, que diminui a chance de desenvolver a hipersensibilidade cutânea tardia e o reconhecimento de antígenos (FERRI et al., 2014; GUEDES, 2013).

O IGRA tem como princípio a estimulação das células T por antígenos específicos do *Mtb*, com liberação de IFN- γ . Possui maior especificidade em relação ao TT porque estes antígenos não estão presentes na vacina BCG e na maioria das outras micobactérias, e apresenta também maior sensibilidade (MACHADO et al., 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; SUCCI, 2014). No entanto, não existe um padrão-ouro para o diagnóstico de ITBL, desta forma as indicações para a terapia profilática são baseadas em uma associação de fatores epidemiológicos, clínicos e laboratoriais do paciente (KUSSEN, 2016).

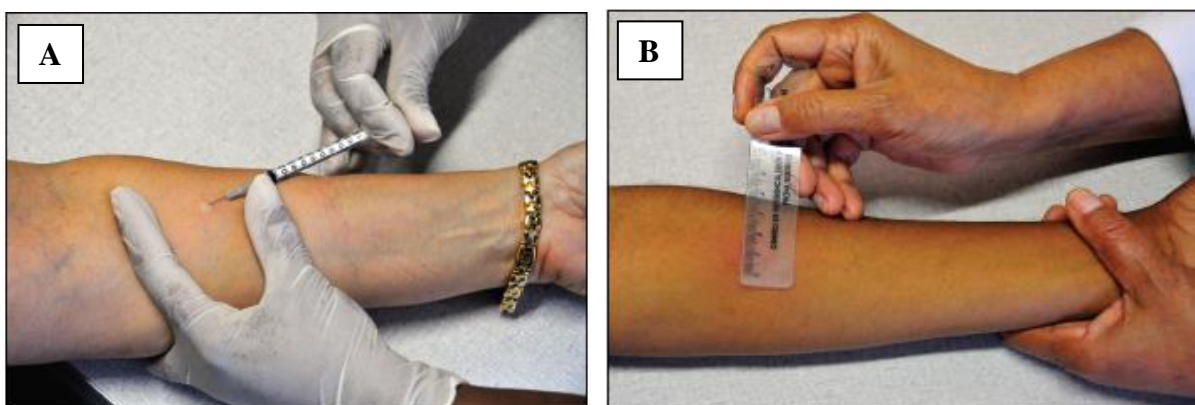
2.8.1. Teste Tuberculínico

O TT é um teste padrão no diagnóstico da infecção por *Mtb*, formado por uma mistura de proteínas provenientes de bacilos mortos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013). O TT consiste na reação celular desenvolvida após a inoculação intradérmica do derivado proteico purificado (PPD) do *Mtb* (PPD Rt23), ou seja, a responsividade ao TT é

desencadeada por uma resposta mediada por células, do tipo tardio, aos antígenos presentes na tuberculina (MENZIES; PAI; COMSTOCK, 2007). A endureção no local da aplicação é consequência do processo inflamatório secundário à migração de células mononucleares previamente sensibilizadas aos antígenos do *Mtb* presentes no PPD (STARKE; COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES, 2014).

O PPD é aplicado por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo (Figura 4), na dose de 0,1 ml, equivalente a 2 UT (Unidades de Tuberculina). A leitura é realizada após 48-72 horas da aplicação, podendo esse prazo ser estendido até 96 horas. É analisada através do maior diâmetro transverso da área do endurecido palpável e mensurada com régua milimétrica transparente (BRASIL, 2014 a).

Figura 4 - Aplicação e leitura do teste tuberculínico



Fonte: Brasil (2014a)

Legenda A: Aplicação por via intradérmica na dose de 0,1 ml, equivalente a 2 UT (Unidades de Tuberculina).

Legenda B: Leitura realizada através do maior diâmetro transverso da área do endurecido palpável e mensurada com régua milimétrica transparente

No Brasil, a interpretação do TT e os valores do ponto de corte tiveram mudanças em 2010 e variam de acordo com a população e o risco de adoecimento. A classificação anteriormente utilizada de não reator, reator fraco e reator forte, não estão mais recomendados (BRASIL, 2014 a).

Nos pacientes imunocompetentes, o TT é altamente sensível, sobretudo naqueles que vivem em regiões sem TB ou onde a doença não é endêmica, porém, em pessoas com imunidade comprometida, há redução de sensibilidade do teste relacionada com a deficiência

da imunidade celular (PASSALENT et al., 2006). Os indivíduos previamente vacinados com BCG permanecem com uma dificuldade na interpretação da prova tuberculínica, em distinguir se a reação do teste é devido à vacina, TB infecção ou doença (BRASIL, 2014a). Podem ocorrer resultados falso-positivos, apresentando uma baixa especificidade do método. Alguns desses antígenos que estão presentes, também estão em micobactérias não tuberculosas (MNT) e na vacina BCG (MENZIES, 1999; BROCK et al., 2004; MENZIES; PAI; COMSTOCK, 2007; STOUT; MENZIES, 2008; HERRERA et al., 2011).

Nos pacientes com imunossupressão por condições diversas (portadores de HIV/AIDS ou em terapia imunossupressoras), uma enduração ≥ 5 mm deve ser considerada como resultado positivo para ITBL, refletindo a infecção latente, e a quimioprofilaxia deverá ser iniciada após ser afastada TB doença (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2014). Em pacientes com DM tipo 1 também considerados imunodeprimidos, uma enduração ≥ 10 mm é considerada positiva (Tabela1) (BRASIL, 2014a).

A anergia causada por um estado imunocomprometido (especialmente com a infecção pelo HIV e imunossupressão induzida por medicação) pode levar a resultados falso-negativos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999; BENTO et al., 2011; MUNOZ et al., 2005),

O TT positivo pode sugerir TB ativa, infecção passada, vacinação com BCG ou sensibilização por micobactérias ambientais. Por outro lado, um resultado negativo pode não excluir necessariamente a tuberculose (TIWARI et al., 2007). Desta forma, TT não é um teste de *screening* (triagem) ideal em pacientes imunodeprimidos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999).

No Brasil, o processo de aquisição do PPD é realizado de forma centralizada pelo MS na apresentação de frasco ampola contendo 1,5 ml do PPD - RT23 2 UT/0,1 ml para toda a rede pública de saúde do país. O ano de 2014 foi marcado pelo desabastecimento do PPD culminando com a publicação da Nota Informativa N° 08, de 2014 da Coordenação Geral do Programa de Controle da Tuberculose (CGPNCT) que ampliou as indicações de tratamento para a ILTB para toda PVHA independente do TT (BRASIL, 2014c).

Tabela 1- Indicações de tratamento ILTB de acordo com a idade, resultado do Teste Tuberculínico (TT) e risco de adoecimento.

Valores da TT	Indicações
Sem TT realizado	<ul style="list-style-type: none"> - Recém-nascidos coabitante de casos índices bacífero; - Pessoas vivendo com HIV/AIDS com cicatriz radiológica sem tratamento prévio de tuberculose; - Pessoas vivendo com HIV/ AIDS contato de tuberculose pulmonar.
TT \geq 5 mm	<ul style="list-style-type: none"> - HIV/ AIDS; - Raio x com imagem sugestiva de sequela de TB; - Indivíduos em uso de inibidores de TNF-α; - Transplantados em terapia imunossupressora; - Indivíduos menores de 65 anos em uso de corticoide;
TT \geq 10 mm	<ul style="list-style-type: none"> - Neoplasia; - Insuficiência renal em diálise; - Diabetes mellitus; - Tabagistas;

Fonte: Adaptação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

2.8.2 QuantiFERON®-TB Gold in tube (QFT-GIT)

O diagnóstico imunológico da ILTB em pacientes imunodeprimidos é um grande desafio. Ensaio baseado na detecção da produção de IFN- γ produzidos em resposta aos três antígenos específicos do *Mtb*. Já o T-SPOT.TB mede a quantidade de células mononucleares periféricas que produzem IFN- γ frente a dois antígenos específicos: ESAT-6 e CFP-10, sendo o seu princípio baseado em *Enzyme-linked immunospot* (ELISPOT) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; SUCCI, 2014).

O *IGRA* tem uma maior especificidade em relação ao TT porque estes antígenos não estão presentes na vacina BCG e na maioria das outras micobactérias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; SUCCI, 2014).

Esses antígenos são codificados na região RD-1 (regiões que codificam antígenos específicos), do gene de espécies do complexo *Mtb* e não são encontrados na cepa vacinal do *Mycobacterium bovis* (BCG) ou em outras espécies de micobactérias do meio ambiente exceto *Mycobacterium (M) kansasii*, *M. marinum* e *M.szulgai* (SINGH et al., 2006; WANG et al., 2009).

O CFP-10 do *Mtb* possui uma grande capacidade de induzir resposta imune mediada por células T. Esse complexo protéico pode se ligar à superfície dos macrófagos e estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF. Ao contrário de outras proteínas secretadas pelo *Mtb*, o CFP-10 tende a estabelecer uma sinergia com o IFN- γ com produção de agentes microbicidas do fagócito mononuclear, como o óxido nítrico (GUO et al., 2010). O ESAT-6 estimula células T ao induzir um aumento na produção do IFN- γ , ausente no gene do *Mycobacterium bovis* (BCG) (GANGULY et al., 2008; MATULIS et al., 2007).

Atualmente, estão disponíveis no mercado dois kits comerciais do *IGRA*: o QUANTIFERON-TB Gold in Tube (QFT-GIT, Cellestis, Austrália) e o T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK). O primeiro é um ensaio enzimático de imunoabsorção que avalia os níveis de IFN- γ produzidos em resposta a três antígenos específicos do *M. tuberculosis*: ESAT-6, CFP-10 e TB7. 7. Já o T-SPOT. TB mede a quantidade de células mononucleares periféricas que produzem IFN- γ frente a dois antígenos específicos: ESAT-6 e CFP-10, sendo o seu princípio baseado em *Enzyme-linked immunospot* (ELISPOT)(ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; SUCCI, 2014).

As vantagens do *IGRA* é que exige apenas uma visita do paciente, não é realizado *in vivo*, como o PPD, o que reduz o risco de efeitos adversos e possui boa especificidade, uma vez que não é afetado pela vacina BCG (MENZIES et al., 2007). Diferente do TT, o teste *IGRA* mostra resultados positivos em pacientes recém-infectados pelo bacilo da TB, grupo este com maior risco de progressão da doença (DIEL et al., 2011; HORSBURGH; RUBIN, 2011).

2.9 Tratamento

Diversos estudos têm demonstrado que a isoniazida (INH) continua sendo efetiva na prevenção da TB. A OMS recomenda que adultos e adolescentes que vivem com HIV e apresentam TT positivo ou desconhecido, para quem foi afastada a TB ativa, devem receber pelo menos seis meses de tratamento para ILTB com INH (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

O uso de INH por seis meses proporciona uma redução de 69% no risco de progressão de ILTB para TB ativa se tomada regularmente, isto é significativamente menor que a redução no risco com o regime de nove meses, que se aproxima dos 80%, porém, pode ser considerado aceitável se a conclusão do tratamento é maior (HIRANSUTHIKUL et al., 2005; LANDRY; MENZIES, 2008; ROWE et al., 2005). O grupo de diretrizes da OMS considerou que não há estudos comparando diretamente o tratamento da ILTB com seis e nove meses de INH e isso levou o grupo a recomendar fortemente a duração de seis meses (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

Segundo o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), o tratamento da ILTB deve ser direcionado aos grupos de alto risco de desenvolver TB doença, entre estes, especialmente, os co-infectados pelo HIV e pelo *Mtb* (BRASIL, 2005; 2011). No Brasil, a INH é a droga de escolha para o tratamento da ILTB na dose de 5-10mg/kg (até a dose máxima de 300mg/dia), diariamente, durante seis meses (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2009; BRASIL, 2011).

Apesar do tratamento preventivo para a TB ser preconizado pela Organização Mundial Da Saúde (2011) e pelo Ministério da Saúde do Brasil (2011) e a distribuição da INH ser feita de forma gratuita no país, a decisão para tratamento da ILTB deve ser tomada pelo médico assistente. Há ainda que se considerar a baixa adesão dos médicos em prescrever o tratamento para a ILTB (BRASIL, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma doença grave que possui prevenção, tratamento específico e cura. Apesar disso, ainda preocupa as organizações de saúde devido ao seu difícil controle e à sua velocidade de disseminação. O presente estudo avaliou novas metodologias de base imunológica que auxiliem no direcionamento clínico e terapêutico, sobretudo de pacientes com ILTB portadores de imunossupressão.

Apesar da existência de vários métodos laboratoriais para o diagnóstico, a erradicação de TB é uma meta muito difícil devido ao fato do *Mtb* ser capaz de permanecer no hospedeiro por longos períodos na forma de latência. O controle da epidemia global de tuberculose está atrelado principalmente à identificação e tratamento profilático de indivíduos com TB latente.

O rastreio da ILTB deve passar pela exclusão de TB ativa (inquérito de sintomas e radiografia pulmonar) e avaliação da resposta imunológica ao *Mtb* através dos testes atualmente disponíveis, como o TT e o teste IGRA, ambos identificam uma resposta imune adaptativa contra os antígenos micobacterianos. O TT, exame utilizado para detecção de ILTB apresenta uma série de limitações, conforme dito anteriormente .

Contudo o IGRA tem demonstrado ser significativamente mais específico do que o TT para o diagnóstico de ILTB, especialmente em países endêmicos tais como o Brasil. Porém seu desempenho no diagnóstico de pacientes imunodeprimidos ainda não foi extensivamente investigado, existindo uma lacuna de conhecimento nesta área.

Portanto, diante das dificuldades diagnósticas expostas, este estudo tem como foco principal a avaliação de nova metodologia de base imunológica que auxilie na decisão clínica de casos complexos na identificação da infecção latente. O método imunológico tem grande probabilidade de auxiliar na detecção da infecção latente, já que o tratamento das formas latentes reduz a incidência da doença ativa em 75%.

Neste contexto, certamente haverá uma maior detecção de casos de ILTB, auxiliando na identificação de focos primários, levando provavelmente a redução das taxas de morbimortalidade, além de contribuir no planejamento de ações específicas, conjuntas, intersetoriais e articuladas, conduzindo a melhoria da eficácia do programa de controle da doença no estado de Pernambuco.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o desempenho do teste imunológico IGRA no diagnóstico da tuberculose latente em indivíduos imunodeprimidos do estado de Pernambuco?

5 HIPÓTESE

O IGRA apresenta melhor desempenho que o TT na detecção da ILTB em pacientes imunodeprimidos no estado de Pernambuco.

6 OBJETIVOS GERAL

Avaliar o desempenho do teste imunológico QUANTIFERON®-TB Gold no diagnóstico da ILTB em pacientes imunodeprimidos do estado de Pernambuco.

6.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o perfil epidemiológico, demográfico e clínico dos participantes do estudo;
- b) Determinar acurácia do QUANTIFERON®-TB para o diagnóstico de infecção pelo *M. tuberculosis* em pacientes imunodeprimidos do estado de Pernambuco;
- c) Comparar o desempenho do teste IGRA com o Teste Tuberculínico na identificação da forma latente da tuberculose em pacientes imunodeprimidos;
- d) Determinar o método imunológico mais promissor para a detecção de ILTB em pacientes imunodeprimidos em área endêmica de tuberculose.

7 METODOLOGIA

7.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo e descritivo para avaliação da concordância entre dois testes imunológicos no diagnóstico da ILTB.

7.2 Local de estudo e seleção dos pacientes

Este estudo foi realizado no Laboratório de Imunoepidemiologia (LIE) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM)/FIOCRUZ.) no período de agosto de 2015 até novembro de 2017. Foram selecionados para o grupo de imunodeprimidos, pacientes que possuíam condições que levaram à imunossupressão: uso de medicações imunossupressoras, pacientes pós-transplantados, portadores de doenças auto-imunes, diabetes *melittus* tipo 1, PVHA e sem suspeita TB.

Os pacientes foram de ambos os sexos, com faixa etária variando de 14 a 78 anos, atendidos em ambulatório e/ou enfermaria do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC), do Hospital Correia Picanço (HCP) e do Hospital Agamenon Magalhães (HAM), todos integrantes da rede SUS.

O diagnóstico da ILTB e o tratamento específico dos pacientes foram realizados pelo médico acompanhante de cada serviço público de saúde.

7.2.1 Definição dos grupos de pacientes

- a) **Pacientes imunodeprimidos com ILTB:** Pacientes que apresentaram PPD reator ≥ 5 mm sem sinais e sintomas clínicos de TB e com exames bacteriológicos negativos e radiografia de tórax sem alterações, exceto os pacientes diabéticos para os quais o PPD reator é considerado ≥ 10 mm (BRASIL, 2011).
- b) **Pacientes imunodeprimidos sem ILTB:** Pacientes que apresentaram PPD < 5 mm sem sinais e sintomas clínicos de TB, exames bacteriológicos negativos e radiografia de tórax sem alterações (BRASIL, 2011).

7.2.2 Critérios de inclusão

Pacientes imunodeprimidos sem suspeita de TB ativa que concordaram em participar da pesquisa.

7.2.3 Critérios de exclusão

- a) Pacientes com diagnóstico de TB ativa;
- b) Pacientes em tratamento para tuberculose.

7.2.4 Critérios de Perda

- a) Pacientes cujas amostras biológicas coletadas forem insuficientes para o processamento no laboratório;
- b) Pacientes que não retornaram para leitura do teste tuberculínico

7.2.5 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi baseado na prevalência de 14% da ILTB em pacientes imunodeprimidos. Considerado um poder de estudo de 80% com intervalo de confiança de 95% e erro alfa de 7%, sendo necessária uma amostra de 95 pacientes imunodeprimidos.

7.3 Coleta das amostras biológicas

Foram coletados 3 ml de sangue venoso para o teste imunológico (QuantiFERON®-TB GOLD), distribuídos igualmente (1 mL) em cada tubo denominados de Nil, Mitógeno e TB antígeno. O NIL é o controle negativo contendo apenas heparina, Mitógeno contém fitohemaglutinina-PHA como controle positivo e o Antígeno TB contendo peptídeos representando as sequências do ESAT-6, CFP-10 e TB7.7.

7.4 Exames diagnósticos

7.4.1 Teste Tuberculínico

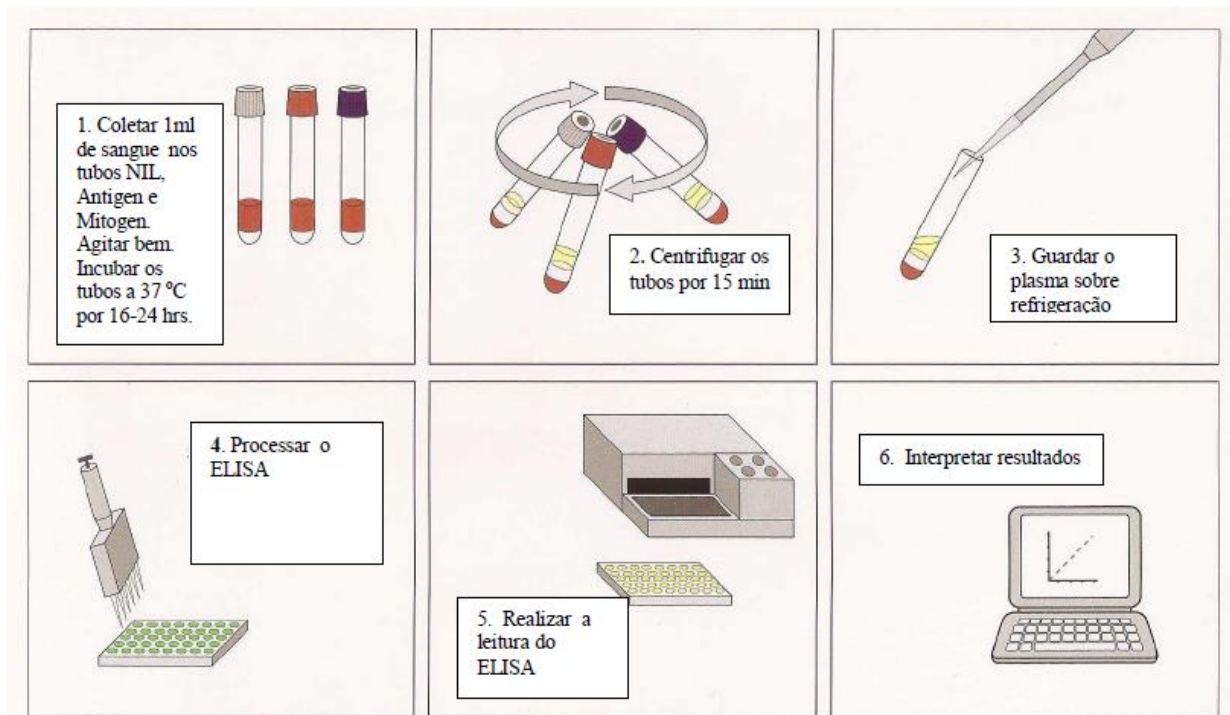
Em todos os participantes da pesquisa foi realizado o TT logo após a coleta do sangue, que utiliza o Derivado Protéico Purificado (PPD Rt 23), aplicado por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1 ml, equivalente a 2 UT (Unidade de Tuberculina), respeitando um ângulo de 15° entre a seringa e a pele do indivíduo. A leitura foi realizada após 72 horas (3 dias) seguindo as normas do MS (BRASIL, 2011). A aplicação e leitura do teste foram realizadas por profissional treinado segundo normas do Ministério da Saúde.

7.4.2 QuantiFERON®-TB Gold *in tube* (QFT-GIT)

As amostras de sangue para o QFT-GIT foram obtidas antes da aplicação do TT. Após a coleta, os 3 tubos foram agitados de 8 a 10 vezes durante 5 segundos para misturar o sangue com os componentes aderidos na parede dos tubos. O referido teste comercial foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit QuantiFERON®-TB Gold (Cellestis).

Os três tubos foram incubados por 16-24 horas a 37°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos, entre 2000 a 3000X g, para obtenção do plasma. O plasma removido de cada tubo foi colocado em um criotubo. Esses criotubos foram congelados a -70 °C para posterior utilização na segunda fase da técnica Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (figura 5). A quantificação do IFN- γ foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

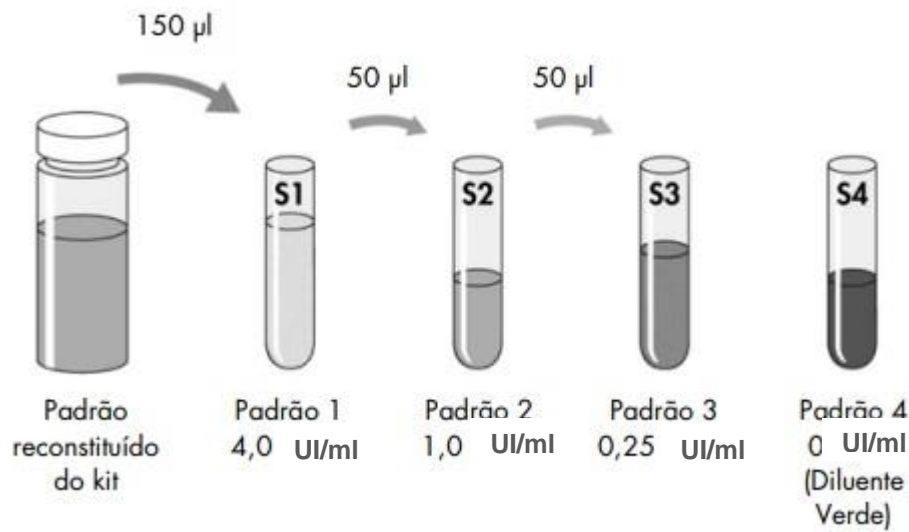
Figura 5 Estágios do processamento do QFT-TB



Fonte: GUEDES (2013)

Para a realização do ELISA, todos os reagentes, exceto o conjugado 100X concentrado, foram colocados à temperatura ambiente por 60 minutos. A solução padrão do IFN- γ liofilizada na concentração 8,0 UI/mL e o conjugado 100X concentrado foram reconstituídos em água destilada. Depois de reconstituído, a solução padrão de IFN- γ foi diluída em diluente verde (GD) em uma série de diluição variando de 1 a 4. O padrão 1 (P1) contendo 4 UI/ml, o padrão 2 (P2) contendo 1 UI/ml, o padrão 3 (P3) contendo 0,25 UI/ml e o padrão 4 (P4) contendo 0 UI/ml (apenas o diluente verde).

No primeiro tubo do padrão (P1) foram adicionados 150 μ L do diluente padrão do IFN- γ . Após correta homogeneização, foram transferidos 50 μ L do tubo P1 para o P2, e depois mais 50 μ L do P2 para o P3. O tubo P4 continha apenas o diluente verde (figura 6). Essa mistura foi agitada durante 1 minuto em um agitador de microplacas. Ao fim desse processo a placa contendo as amostras foi coberta para evitar exposição à luz, e incubada durante 120 minutos à temperatura ambiente. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas.

Figura 6 Preparação da curva padrão do QFT-GIT

Fonte: Qiagen (2013)

Legenda: 150 µl do padrão IFN- γ na concentração de 8,0 UI/mL foram adicionados a P1. 50 µl foram transferidos de P1 para P2 e de P2 para P3. O P4 serviu como padrão zero contendo apenas o diluente verde.

Na etapa seguinte, os poços foram lavados com 400 µL do tampão de lavagem diluído, disponível no *kit* e esse procedimento foi repetido 6 vezes. Depois, adicionou-se 100 µL de substrato em cada poço e agitou por 1 min no agitador de placas. Novamente a placa foi coberta e incubada por 30 min à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, acrescentou-se 50 µL de solução de parada (“stop”) em todos os poços e homogeneizou com o agitador. Em seguida, ocorreu a leitura dos resultados a 450nm com o filtro de referência de 620nm. Os resultados gerados no ELISA foram analisados no *software* QuantiFERON-TB® Gold Analysis e interpretados de acordo com a Figura 7.

Figura 7 Intepretação dos resultados do QFT-GIT.

Nil (UI/mL)	TB Antigen – Nil (UI/mL)	Mitogen – Nil (UI/mL)	QuantiFERON-TB (UI/mL)
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5	Negativo
	≥ 0.35 e < 25% do valor de Nil	≥ 0.5	
	≥ 0.35 e ≥ 25% do valor de Nil	-	Positivo
	< 0.35	< 0.5	Indeterminado
≥ 0.35 e < 25% do valor de Nil	< 0.5		
> 8.0	-	-	

Fonte: GUEDES (2013)

Após a verificação das densidades ópticas obtidas para cada antígeno e controles, os valores foram convertidos em unidades internacionais por milímetro (UI/ml) tomando-se como base a curva padrão gerada no ensaio. O resultado do teste foi considerado positivo quando os níveis de IFN- γ produzidos após estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 foram $\geq 0,35$ UI/ml e $\geq 25\%$ do valor do Nil (após a subtração do Nil e TB antígeno), e o valor do Nil ≤ 8 UI/ml.

O resultado foi considerado negativo quando os níveis de IFN- γ produzidos após estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 foram $< 0,35$ UI/ml ou $\geq 0,35$ UI/ml e $\geq 25\%$ do valor do Nil (após a subtração do Nil e TB antígeno), o valor do Nil ≤ 8 UI/ml e o valor da subtração do mitógeno e Nil $\geq 0,5$ UI/ml.

Considerou-se o resultado indeterminado quando o valor do Nil foi ≤ 8 UI/ml, quando os níveis de IFN- γ produzidos após estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 foram $< 0,35$ UI/ml e o valor da subtração do mitógeno e Nil $< 0,5$ UI/ml. Foi ainda considerado indeterminado quando os níveis de IFN- γ produzidos após estímulo com os antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 foram $\geq 0,35$ UI/ml e $< 25\%$ do valor do Nil (após a subtração do Nil e TB antígeno) e o valor da subtração do mitógeno e Nil $< 0,5$ UI/ml, e quando apenas o valor do Nil foi > 8 UI/ml.

7.5 Armazenamento do material biológico

Após a realização dos procedimentos e protocolos técnicos para o estudo, as amostras biológicas foram armazenadas em biorrepositório, no LIE, do Instituto Aggeu Magalhães. Foram devidamente etiquetadas com o número de registro do paciente no LIE e o nome da amostra biológica. Havendo necessidade de utilização das amostras em um estudo posterior, um novo consentimento será solicitado ao sujeito da pesquisa. Todos os dados referentes à identidade dos indivíduos da pesquisa serão mantidos em sigilo (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 2011).

7.6 Armazenamento e análise dos dados

Cada paciente respondeu a um questionário clínico-epidemiológico desenvolvido e padronizado pela equipe de pesquisadores do LIE (Apêndice A). Os dados foram armazenados no IBM SPSS Statistics v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os programas utilizados para análise estatística dos dados (índice Kappa) foram o OpenEpi (versão 3.01 -

http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) e o IBM SPSS Statistics (v. 20.0). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

7.7 Considerações éticas

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre a pesquisa e convidados a participar como membro voluntário, assinando um termo de livre consentimento referente à sua participação na pesquisa (Apêndice B e C). Caso o paciente estivesse incapacitado de emitir sua opinião, o responsável pelo mesmo assinou o termo. Os pacientes menores de idade assinaram um termo de assentimento livre e esclarecido, com o consentimento dos pais ou responsáveis.

Este estudo é parte integrante de um projeto maior intitulado “Desenvolvimento, avaliação e validação de um kit molecular baseado em PCR em tempo real com tecnologia nacional para o diagnóstico da tuberculose”, aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Aggeu Magalhães, cujo registro no CAAE é 45739715700005190 (Anexo A).

8 RESULTADOS

8.1 Análise do perfil epidemiológico, demográfico e clínico dos participantes do estudo

Foram selecionados para o estudo 108 indivíduos. Do total, 2 foram excluídos por não retornarem à leitura do TT, sendo incluídos na pesquisa 106 pacientes. Da região metropolitana do Recife foram 89 (82%) pacientes e 17 (18%) das mesorregiões de Pernambuco. Dos pacientes incluídos na pesquisa, 64 (60,4%) foram do sexo masculino e 42 (39,6%) do sexo feminino, com idade variando de 14 a 78 anos com média de 38 anos. Quanto à procedência hospitalar, 67 (63,2%) foram provenientes de ambulatório e 39 (36,8%) de enfermaria. A cicatriz vacinal por BCG foi observada em 98 (92,5 %) indivíduos envolvidos na pesquisa. Quanto ao raio X do tórax, 92 (86,7%) realizaram o exame, sendo que todos apresentaram padrão não sugestivo de TB. Os pacientes imunodeprimidos deste estudo, as condições de imunossupressão/doença encontradas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2- Frequência das condições / doenças imunossupressoras

Condições / Doenças imunossupressoras	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Diabetes	10	9,4
PVHA	74	69,8
Lúpus Eritematoso Sistêmico	6	5,7
Psoríase	3	2,8
Pós-Transplantado	3	2,8
Espondiite Aquilosa	3	2,8
Polimiosite	1	0,9
Mieloma	1	0,9
Arterite de Takayasu	2	1,9
Púrpura trombocitopênica Trombótica	3	2,8
Total	106	100

Fonte: Elaborada pela autora

8.2 Desempenho dos testes diagnósticos

Os 106 pacientes incluídos na pesquisa foram testados com QFT-GIT e TT. Todos relataram não ter feito o TT em menos de 3 meses. Do total dos pacientes investigados, 19 pacientes apresentaram reatividade ao TT, com enduração variando entre 6-23 mm, sendo

assim classificados como portadores de ILTB (tabela 3) e 18 apresentaram positividade ao QFT-GIT. Para o cálculo de sensibilidade e especificidade dos testes, foram analisados apenas os pacientes que apresentaram resultados em ambos os testes (positivo ou negativo). Vinte e dois pacientes foram excluídos em virtude dos resultados terem sido indeterminados, restando 84 pacientes.

Tabela 3- Frequência dos casos de ILTB através do TT de acordo com a condição/doença imunossupressora

Condições / Doenças imunossupressoras com ILTB/	Frequência (n)
Diabetes	2
HIV/AIDS	12
Psoríase	1
Espondilite Aquilosa	2
Arterite de Takayasu	1
Púrpura trombocitopênica Trombótica	1
Total	19

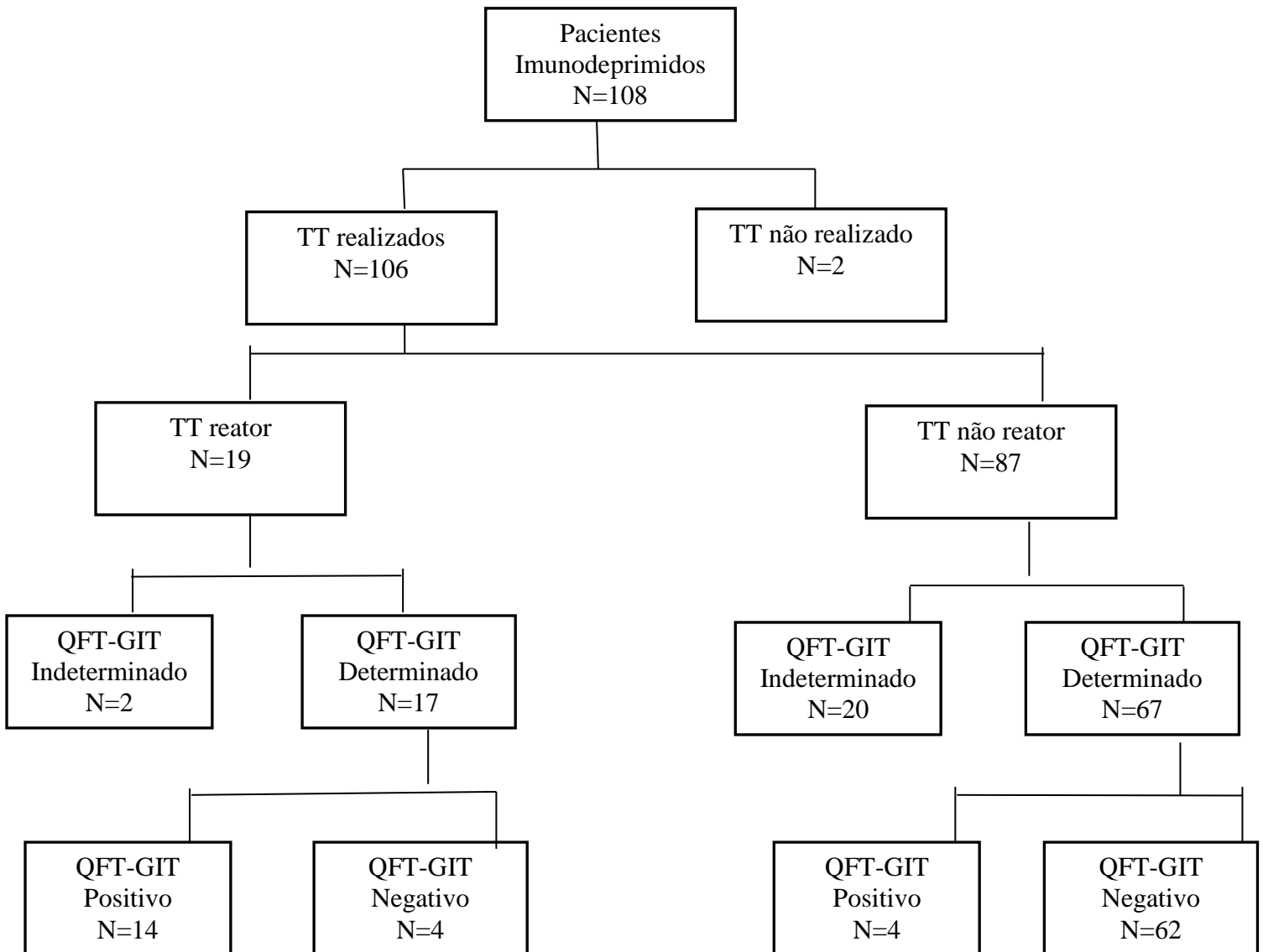
Fonte: Elaborada pela autora

Entre os resultados de TT e QFT-GIT concordantes, observa-se que 62 (59 %) pacientes tiveram os dois testes negativos, 13 (13,3%) pacientes tiveram os testes positivos em ambos; já entre as provas discordantes, 4 (3,9%) pacientes apresentaram o QFT-GIT negativo com TT positivo e apenas 5 (4,9%) pacientes mostraram QFT-GIT positivo com TT negativo. Apesar de 2 pacientes terem apresentado o TT positivo, o QFT-GIT foi indeterminado. Por outro lado em 20(18,9%) pacientes cuja TT foi negativo, o QFT-GIT foi indeterminado (Tabela 4)(figura 8).

Tabela 4- Desempenho do teste QFT-GIT em 84 pacientes considerando o TT como padrão.

QFT-GIT	PADRAO (TT)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	13	5	18
Negativo	4	62	66
Total	17	67	84

Fonte: Elaborada pela Autora

Figura 8- Fluxograma dos pacientes imunodeprimidos

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Foram recrutados 108 pacientes para o estudo. Destes, 106 realizaram o TT e 2 não realizaram, sendo que 19 foram considerados “reator” e 87 “não-reator”. Entre os 19 “reator, 2 foram indeterminados no QFT-GIT e 17 foram considerados determinados, e entre esses, 13 foram positivos e 4 negativos. Entre os 87 TT “não reator”, 20 foram indeterminados no QFT-GIT e 67 determinados. Entre os determinados, 5 foram positivos e 62 negativos.

Considerando o resultado da TT como o padrão-ouro para o diagnóstico da ILTB, a sensibilidade e especificidade do teste QFT-GIT calculados foram 73,68% (IC 95% 42 a 87) e 93,85% (IC 95% 85 a 97) respectivamente. A concordância global entre os testes diagnósticos QFT-GIT e TT foi considerada substancial com o valor de κ 0.6881 ($p < 0,001$) (Tabela 5). No

grupo de 74 PVHA, que foi o maior grupo do estudo, seguindo o TT como padrão para o diagnóstico da ILTB, a sensibilidade e especificidade do teste QFT-GIT calculados foram de 81,82% (IC 95% 52,3 a 94,86) e 95,83% (IC 95% 86,02 a 98,85) respectivamente (tabela 6). Para análise da sensibilidade e especificidade foram retirados todos os resultados indeterminados (15 casos) do teste QFT-GIT. A concordância global entre os testes diagnósticos QFT-GIT e TT foi considerada substancial com o valor de κ 0.7765 ($p < 0,001$).

Tabela 5- Desempenho do QFT-GIT no diagnóstico da ILTB na população geral estudada.

QFT-GIT	
Sensibilidade	73,68 % (IC 95% 42 a 87)
Especificidade	93,85 % (IC 95% 85 a 97)
VPP	77,78 % (IC 54,78 a 91)
VPN	92,42 % (IC= 83,46 a 96,72)
Acurácia	89,29%

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: VPP = Valor preditivo positivo; VPN = Valor preditivo negativo.

Tabela 6- Desempenho do QFT-GIT no diagnóstico da ILTB em PVHA.

QFT-GIT	
Sensibilidade	81,82% (IC 95% 52,3 a 94, 86)
Especificidade	95,83% (IC 95% 86,02 a 98,85)
VPP	81,82% (IC 95% 52,3 a 94, 86)
VPN	95,83% (IC 95% 86,02 a 98,85)
Acurácia	93,22% (IC 95% 83,82 a 97,33)

8.3 Níveis de células T CD4+ em PVHA

Para melhor caracterizar a imunodepressão dos indivíduos infectados pelo HIV, estes pacientes foram estratificados de acordo com a contagem de linfócitos T CD4+ em <200, 200-350 e >350 céls/ μ L (Tabela 07). Das 74 PVHA, foram obtidos os níveis de T CD4+ de 42 pacientes. A mediana de linfócitos T CD4+ foi de 250 células/ μ L (21-988).

Tabela 7- Resultados positivo e negativo e indeterminado para QFT-GIT e TT em pacientes HIV, estratificado pela contagem de células T CD4+.

Contagem de CD4	Nº de pacientes	QFT-GIT			TT		
		Positivo	Negativo	Indeterminado	0mm	>5mm	>10mm
< 200	14	0	7	7	13	1	0
200-350	17	5	9	3	11	1	5
> 350	11	1	10	0	10	0	1

Fonte: Elaborada pela autora

Diante dos resultados obtidos, de acordo com a acurácia dos testes, a concordância foi considerada boa, e os testes mostraram desempenho semelhante entre os pacientes imunodeprimidos avaliados neste estudo.

9 DISCUSSÃO

A TB é uma das infecções mais relevantes em pacientes imunodeprimidos, devido à sua elevada frequência e alta mortalidade. Estima-se que na população de PVHA o risco de adoecimento e óbito pela TB é 26 a 31 vezes maior do que em pessoas não infectadas pelo HIV (SANTOS et al, 2017). Por isso, o diagnóstico e tratamento precoce da ILTB são fundamentais para evitar a progressão da doença, sendo parte de uma estratégia de eliminação da TB ativa para prevenção de casos futuros (AGRAWAL et al., 2016; DUARTE; VILLAR; CARVALHO, 2010). No Brasil, a detecção de casos da ILTB é uma das prioridades preconizadas pelo Ministério da Saúde no controle da doença, visto que estes indivíduos apresentam um maior risco para o desenvolvimento da doença ativa (BRASIL, 2011).

Em 106 pacientes avaliados em condições imunossupressoras, residentes em Pernambuco, terceiro estado com maior prevalência de TB do Brasil, houve uma maior frequência do gênero masculino (60,4%). Em 2014, Ting e colaboradores avaliaram pacientes imunodeprimidos com ILTB. Em relação a variável gênero, também encontraram uma maior prevalência do sexo masculino (60%). Os autores abordam que as diferenças entre os gêneros na ILTB não são frequentemente analisadas e geralmente apresentam resultados controversos. Embora a proporção de ILTB seja maior em homens, não há diferença significativa em termos de sexo na ILTB, entre indivíduos com alto risco após ajuste para idade e outros fatores clínicos (TING et al., 2014).

Quanto a variável idade analisada, a média encontrada foi de 38 anos. No caso da TB ativa, a idade produtiva (20 - 59 anos) é mais atingida, provavelmente pela maior exposição aos fatores de risco, apresentando dessa forma os maiores percentuais de notificações da TB no país, o que justifica o grande ônus social e econômico trazido pela doença (COUTINHO et al., 2012).

No nosso estudo, a cobertura da vacina BGC foi encontrada em 92,5% dos pacientes, todas confirmadas através da cicatriz vacinal. É importante salientar que os indivíduos foram vacinados no período neonatal (BRASIL, 2013). Dessa forma, a reatividade do TT encontrada não teve relação com a vacina BCG. A resposta imune desencadeada pelo TT foi influenciada, sobretudo pelas condições imunológicas dos pacientes, limitando o uso desta informação para o diagnóstico da ILTB (LIMA et al., 2011).

Além do grupo de PVHA, pacientes portadores de doenças ou condições que levam a imunossupressão (terapias prolongadas com corticoides ou imunossupressores), apresentam também um maior risco de desenvolver a TB. O tratamento com imunossupressores para as doenças inflamatórias imunomediadas é efetivo, entretanto, essas terapias aumentam o risco de desenvolver infecções oportunistas como a TB (MANTZARIS et al, 2015; RAMOS et al., 2013).

Diante da importância da ILTB para o controle e desenvolvimento da TB ativa, a sua detecção precoce torna-se fundamental (SANTOS et al, 2017). Atualmente, o TT é o exame recomendado pelo Ministério da Saúde para diagnosticar a ILTB e sua correta interpretação é importante para a tomada de decisões a respeito das indicações do tratamento, levando em consideração os critérios clínico-epidemiológicos e o risco de adoecimento de cada paciente por TB (BONI, 2015; SANTOS et al., 2017).

Em indivíduos imunocompetentes, o sistema imunológico consegue controlar a infecção impedindo o desenvolvimento da doença. O TT, para que seja considerado positivo neste grupo, necessita de uma enduração ≥ 10 mm. Nas populações consideradas de risco, como indivíduos imunodeprimidos, o referido teste é considerado reator quando o tamanho da enduração é ≥ 5 mm. Nesse caso, o paciente é considerado portador da ILTB e deve iniciar o tratamento. O paciente que apresenta apenas reatividade ao TT, em um país com alta carga da doença como o Brasil, deve ser investigado podendo ser portador da ILTB e necessitar de tratamento específico (BRASIL, 2011).

Estudos que avaliam novas técnicas laboratoriais para o diagnóstico da ILTB têm enfrentado um grande desafio, sobretudo pela deficiência de um “padrão-ouro” satisfatório necessário para avaliar o desempenho do teste, principalmente em pacientes infectados pelo HIV e em imunodeprimidos em geral.

Neste estudo, pela inexistência de outros testes para o diagnóstico da ILTB, o TT foi utilizado como padrão de referência, mesmo sabendo da alta frequência de resultados falso-negativos obtidos nesta população (DIEL et al., 2011). Desta forma, na população total estudada, 80,07% dos pacientes tiveram resultados negativos no TT, considerando o resultado positivo o teste ≥ 5 mm. Ramos e colaboradores (2012) avaliaram 302 PVHA, também considerando o TT positivo ≥ 5 mm e obtiveram resultados semelhantes, encontrando 85,1% de TT negativos. A reatividade negativa do TT pode ser atribuída ao estado imunológico desses pacientes, uma vez que a baixa carga de linfócitos T CD4+ (<350) é um dos fatores que influenciam na resposta imune celular de PVHA (KUSSEN et al., 2014). Guedes e colaboradores (2013), considerou também positivo o TT ≥ 5 mm em um grupo de pacientes

imunodeprimidos, onde a maior população do seu estudo eram PVHA, obtiveram 83,7% de TT negativos, atribuindo este resultado sobretudo à imunidade celular em pacientes que sabidamente possuem condições que levam a um déficit dos linfócitos T.

No nosso estudo, a maioria dos indivíduos (69,8%) eram PVHA, com comprometimento da imunidade celular que leva ao aumento da susceptibilidade à infecção pelo *Mtb* e o risco de infecção para a forma TB ativa. A infecção pelo HIV altera a função dos macrófagos e provoca a diminuição do número de linfócitos, em especial dos linfócitos T CD4⁺ (MAARTENS, 2014). A contagem de linfócitos T CD4⁺ é a medida que avalia a imunocompetência celular em PVHA.

Neste grupo de pacientes, há uma diminuição destas células, tornando-os mais susceptíveis à infecção pelo *Mtb* (SILVA; ROSA; LEMOS, 2006). No nosso estudo, obtivemos a contagem dos linfócitos T CD4⁺ em 56,7 % das PVHA, cuja resposta imunológica encontra-se sabidamente alterada por apresentarem diminuição de linfócitos T CD4⁺, os quais são fundamentais na resposta celular tardia desencadeada pelo antígeno da tuberculina injetada (STARKE COMMITTEE ON INFECTIONS DISEASES, 2014).

O TT no nosso estudo foi negativo em 80,95% das PVHA e foi observada nesses pacientes (21,4%) uma baixa contagem dos linfócitos T CD4⁺ (< 350 células/ μ L). Em 11,9% dos pacientes deste grupo, o TT foi positivo, onde observamos também uma baixa contagem dos linfócitos (16,6%) T CD4⁺ (< 350 células/ μ L).

Monteiro et al. (2015) realizaram o TT em 188 PVHA, e destas 4,8% obtiveram TT positivos e 95,2% TT negativo. Entre os TT negativos, 17,6% das PVHA apresentaram contagem dos linfócitos TCD4⁺ abaixo de 200 cél/mm³ e o restante apresentou média de linfócitos TCD4⁺ de 466,76 células/mm³, concordando com nosso trabalho, onde observamos que a maioria das PVHA que obtiveram TT negativo apresentou uma contagem baixa de linfócitos TCD4⁺, demonstrando que é uma técnica que reflete a condição da imunidade celular do indivíduo. Guedes e colaboradores (2013) também obtiveram 82,5% de TT negativos na sua população estudada, e destes, 67,7% apresentaram contagem de linfócitos TCD4⁺ abaixo de 350 cél/mm³. A frequência de TT positivos nos indivíduos com contagem de T CD4⁺ >350 céls/ mm³ foi de 17,5%, corroborando com nosso estudo. A maioria de resultados negativos justifica a redução da sensibilidade do teste, que está relacionada com a deficiência da imunidade celular.

Diante das limitações do teste TT utilizado na detecção de indivíduos ILTB, novos testes de base imunológica têm sido desenvolvidos e propostos para o diagnóstico da ILTB. Estes testes são baseados na detecção da produção de IFN- γ *in vitro* em resposta à liberação de

antígenos específicos presentes no complexo *Mtb*, que vem demonstrando serem sensíveis e específicos em relação ao TT (PAI; RILEY; COLFORD, 2004, DUARTE, 2012). Desta forma, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar o desempenho de um novo teste imunológico, o QFT-GIT, para o diagnóstico da ILTB em pacientes imunodeprimidos do estado de Pernambuco.

A detecção da ILTB em pacientes imunodeprimidos é extremamente relevante, uma vez que permite a intervenção precoce para o desenvolvimento da TB ativa (GETAHUN, H. et al., 2015). Neste estudo, a seleção dos pacientes foi dificultada por alguns fatores: por se tratar de uma região com alta prevalência da doença; a ILTB não ser de notificação compulsória; dificuldade em diagnosticar a ILTB pela ausência de sintomas e sinais clínicos, teste tuberculínico com resultados falsos negativos e dificuldade na identificação do contágio com a TB ativa.

O desempenho de um teste diagnóstico, ou seja, sua sensibilidade e especificidade dependem da eficiência do padrão. Nesta pesquisa, considerou-se o TT o padrão de referência utilizado para a análise do QFT-GIT. Do número total de pacientes do nosso estudo, 84 dos 106 pacientes foram avaliados. Foram excluídos da análise 22 pacientes por apresentarem resultados indeterminados no QFT- GIT. Assim, o desempenho do QFT- GIT demonstrou uma sensibilidade de 73,68% e especificidade de 93,85%.

Quanto à comparação de resultados entre os testes diagnósticos ou a avaliação da reprodutibilidade entre as técnicas pelo índice kappa, a concordância global entre os testes diagnósticos QFT-GIT e TT foi considerada substancial com o valor de κ 0.6881 ($p < 0,001$). No grupo de PVHA, o teste demonstrou sensibilidade e especificidade de 81,82% e 95,83% respectivamente. A concordância entre os dois teste nesse grupo foi considerada substancial com o valor de κ 0.7765 ($p < 0,001$).

Kussen et al.(2015), avaliando o desempenho do QFT- GIT em um grupo de 154 PVHA, considerando o TT como padrão-ouro, observaram uma sensibilidade de 69% e especificidade de 90%. No nosso estudo, obtivemos uma sensibilidade e especificidade maior no grupo de PVHA. Na concordância entre os testes, Kussen e colaboradores (2015) obtiveram uma concordância de κ 0,214, mostrando uma concordância baixa entre as duas técnicas. No seu estudo, o QFT- GIT não se mostrou superior ao TT na detecção da ILTB, principalmente em PVHA. Ao contrário do estudo de Kussen et al. (2015), o nosso estudo apresentou uma concordância substancial entre os testes TT e QFT- GIT no grupo de PVHA. Nossos resultados demonstraram que ambos os testes apresentaram adequado desempenho e podem ser utilizados na investigação da ILTB.

Ramos et al. (2013) avaliaram o desempenho do TT e QFT- GIT para o diagnóstico da ILTB, em 153 pacientes com imunossupressão por doenças inflamatórias, fazendo uso de imunossupressores. A concordância global entre os testes TT e QFT- GIT foi pobre, com valor de kappa κ 0,085. O desempenho do QFT- GIT foi menor que do TT, tendo justificado esse resultado pelo uso da medicação baseada em imunossupressores, os quais tem um efeito na responsividade das células T, podendo levar a resultados negativos, o que compromete a análise do desempenho dos testes imunológicos. No nosso estudo, nos pacientes imunodeprimidos, 19,8% utilizaram imunossupressores devido a sua doença de base, e destes 26,5% (5/19) foram diagnosticados com ILTB através do TT. Entretanto, não foi possível realizar uma análise estatística apenas para esse grupo, devido a limitação do tamanho da amostra. A concordância substancial encontrada no nosso trabalho discorda dos resultados encontrados por Ramos et al. (2013), mesmo havendo uma associação de regimes de tratamento semelhantes com imunossupressores, que influenciaram na resposta imunológica dos pacientes e por sua vez nos resultados dos testes (RAMOS et al, 2012).

Jung et al. (2012) em estudo realizado na Coreia do Sul, com incidência moderada de TB, avaliaram o TT e o QFT-GIT no diagnóstico da TB em 119 pacientes imunodeprimidos. Entretanto, esses pacientes tinham suspeita de TB, porém com baciloscopia negativa. O tipo de imunossupressão encontrada nos pacientes do estudo foi a diabetes *mellitus*, uso de medicamentos imunossupressores, renais crônicos e portadores de doenças malignas, semelhantes às doenças encontradas no nosso estudo. Foi demonstrada uma sensibilidade de 59% e uma especificidade de 61,3% do QFT-GIT nos pacientes imunodeprimidos investigados, com desempenho abaixo do encontrado no nosso estudo.

Diante disso, concluíram que nem o QFT-GIT, nem o TT podem ser utilizados como única ferramenta diagnóstica de TB, em pacientes imunodeprimidos, residentes em países com moderada incidência da doença. Diferentemente do presente estudo, os nossos pacientes não apresentaram nenhuma suspeita clínica de TB. Ressalta-se que o QFT-GIT é um teste imunológico proposto para rastreio da ILTB (HORSBURGH; RUBIN, 2011), necessitando de mais estudos para a sua utilização para o diagnóstico da forma de doença ativa.

A literatura científica tem demonstrado que o teste QFT-GIT pode gerar resultados indeterminados, apontando assim uma grande limitação no processo de avaliação do desempenho do teste QFT-GIT, onde pode comprometer o resultado final. Algumas condições podem estar relacionadas com os resultados os indeterminados, como a imunossupressão avançada, a vacinação prévia com BCG, terapia imunossupressora e infecção pelo HIV. No entanto, resultados indeterminados podem também ser encontrados eventualmente em

indivíduos imunocompetentes (OLIVEIRA et al, 2017). No presente estudo, 20,75% dos pacientes obtiveram resultados indeterminados no QFT-GIT. Destes, 68,18% foram PVHA, e 73% apresentavam imunossupressão avançada, com contagem de células T CD4 <350 células/mm³, que aumenta as chances de obtenção de resultados indeterminados (ONI et al.; 2012).

Oliveira et al. (2017) avaliaram a frequência de resultados indeterminados no QFT-GIT em 81 PVHA utilizando como padrão-ouro o TT. Os resultados do TT foram positivos em 18 pacientes (22,2%) e do QFT-GIT foram positivos em 10 (12,3%). O resultado do QFT-GIT foi indeterminado em 22 pacientes (27,1%), principalmente naqueles com imunossupressão avançada (contagem de linfócitos T CD4+ < 200 células/mm³), assim como no nosso estudo, que mostrou resultados indeterminados em PVHA (10/15) com a contagem de linfócitos T CD4+ < 350 células/mm³, concluindo assim que a alta frequência dos resultados indeterminados, pode ser um grande obstáculo ao uso na rotina do QFT-GIT, principalmente nas PVHA. No nosso estudo, todos os resultados indeterminados foram repetidos e não houve mudança em relação aos resultados anteriores. A repetição do experimento gerou um aumento do custo do QFT-GIT, sugerindo que hajam futuros estudos para avaliar a relação entre custos e eficácia do teste.

Cho et al. (2016) avaliaram em 133 pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, com resultados indeterminados do QFT-GIT para o diagnóstico da ILTB. Destes, 23 (16,9%) obtiveram resultados indeterminados, podendo ser relacionados ao uso de imunossupressores, incluindo metotrexato e azatioprina associado aos corticoides, que afetam diretamente os linfócitos. Além disso, a disfunção de células T em pacientes com LES resulta em uma resposta autoimune característica da doença, como também acontecem em outras doenças reumáticas, havendo a diminuição da resposta ao antígeno e disfunção das células T, particularmente devido à alta atividade da doença. No nosso estudo, o tamanho da amostra de pacientes portadores de LES foi consideravelmente pequeno (5,7%), entretanto observamos que 50% desses resultados foram indeterminados nesses pacientes, onde todos utilizaram as mesmas medicações do estudo de Cho et al. (2016), que são conhecidos por causar também anergia ao TT (KIM et al;2013, ARENAS et al;2014).

Segundo Oliveira et al. (2017), a frequência de resultados indeterminados do QFT-GIT varia de 0% a 19,8% em PVHA. Os autores comentam que a execução do teste também pode influenciar nos resultados. O QFT-GIT deve ser realizado com muito rigor, desde fase inicial da coleta e do transporte até a realização do ensaio imunoenzimático, uma vez que todas as etapas influenciam no resultado. Na coleta do sangue periférico é de grande necessidade a

correta homogeneização do tubo. Volumes incorretos coletados resultam na diminuição de resposta diminuindo a proporção de resultados positivos. Em pacientes com alto risco de ILTB, pode ocorrer uma reversão dos resultados positivos para negativos, devido à demora da incubação após a coleta do material, cujo atraso leva uma reversão de 19% das amostras (PAI et al., 2014).

O tratamento da ILTB é uma importante estratégia de prevenção, utilizado para evitar a reativação da doença. A eficácia dos tratamentos disponíveis varia de 60% a 90% (HORSBURGH et al., 2010). Dos 19 pacientes com ILTB, 12 realizaram tratamento a partir do resultado do TT e apenas 1 paciente realizou o tratamento com o resultado do QFT-GIT positivo. A realização do tratamento desses pacientes poderá ter um impacto no controle da TB ativa, prevenindo o desenvolvimento da doença (TANG, JOHNSTON, 2017).

Nosso estudo apresentou algumas limitações, primeiramente com um desabastecimento do TT no ano de 2014, com a interrupção da sua fabricação, adiando assim a busca de pacientes, pois sem o TT o estudo não poderia ser realizado. Apenas no final do ano de 2015, com um novo abastecimento de PPD no Brasil, pudemos voltar à busca ativa dos pacientes. Outra limitação foi o grupo de pacientes selecionado para este estudo. Devido às suas condições imunossupressoras, estes pacientes apresentaram maior risco de desenvolver a TB ativa, que foi um critério de exclusão utilizado na pesquisa. Além disso, muitos pacientes não concordaram em voltar para a leitura do TT.

Conforme demonstrado ao longo deste trabalho, observou-se que a concordância entre os testes imunológicos foi boa, diferente de alguns trabalhos encontrados na literatura, onde a maioria da concordância é baixa ou moderada, principalmente no grupo de pacientes imunodeprimidos no qual foi avaliado (Gao et al. 2015, Kurti et al., 2015, CATTAMANCHI et al., 2011; DHEDA et al., 2009). Portanto, na literatura, há uma discordância da melhor indicação diagnóstica através de metodologias baseadas na resposta imunológica para a detecção da forma de infecção latente. Deve ser levado em consideração também, o alto custo do QFT-GIT para ser utilizado na rotina diagnóstica dos serviços públicos, em geral. Dessa maneira, parece haver uma complementaridade entre o TT e o QFT-GIT, quando realizados simultaneamente, aumentando a possibilidade de estabelecer o diagnóstico da ILTB e consequentemente a chance de se iniciar o tratamento, sobretudo nos pacientes imunodeprimidos.

Recentemente, uma nova versão do teste QUANTIFERON-TB Gold foi lançada. O teste apresenta um tubo adicional (TB2) para estimular os linfócitos T CD4+ e T CD8+ quando expostos a antígenos de TB (QFT-Plus). A modificação no teste visa melhorar os resultados em

pacientes imunodeprimidos que tem a resposta às células T CD4 + prejudicada. A vantagem do QFT-Plus é poder analisar e comparar os resultados obtidos nos dois tubos (TB1 e TB2) para se obter uma estimativa da resposta das células T CD 8+. Entretanto, estudos ainda precisam ser realizados em populações apropriadas, principalmente em pacientes imunodeprimidos (LETH; SESTER, 2018).

Sendo assim, o diagnóstico da ILTB, principalmente em pacientes imunocomprometidos, continua sendo um grande desafio. A baixa reatividade do TT e a grande mortalidade associada à coinfeção de PVHA destacam a necessidade de novas metodologias diagnósticas. A busca de um diagnóstico imunológico mais sensível, específico e de menor custo principalmente para pacientes imunodeprimidos, permitirá a intervenção precoce para o início tratamento específico da infecção latente, contribuindo assim para uma menor morbidade e conseqüentemente menor mortalidade desse grupo de pacientes.

Diante dos resultados encontrados, o presente trabalho demonstrou que o QIT-GIT pode ser utilizado na detecção da ILTB nos pacientes imunodeprimidos como teste complementar no diagnóstico eficiente da forma latente, especificamente quando o resultado do TT for não reator.

10 CONCLUSÕES

- a) A condição imunocomprometida dos pacientes estudados, gerada pela própria doença de base ou pelo uso das medicações imunossupressoras, influenciou no resultado dos testes imunológicos avaliados (TT e QFT-GIT);
- b) O QFT-GIT é um teste comercial automatizado que apresenta resultados objetivos, diminuindo os erros de uma interpretação subjetiva como acontece no TT;
- c) O QFT-GIT apresentou um bom desempenho, demonstrado pela sensibilidade e especificidade obtidas, podendo ser utilizado como ferramenta complementar no rastreio para detectar ILTB em pacientes imunodeprimidos, principalmente quando o TT for negativo;

11 PERSPECTIVAS

Trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos avaliando os testes imunológicos (QFT-GIT, QFT-Plus e TT), sobretudo em indivíduos imunodeprimidos e em populações vulneráveis (crianças, pessoas privadas de liberdade, população indígena, moradores de rua, usuários de drogas).

De fundamental importância para a Saúde Pública será realizar estudos de custo e efetividade destes testes para possível implantação nos serviços de referência do SUS.

REFERÊNCIAS

- AICHELBURG, M. C. et al. Prognostic value of indeterminate interferon- γ release assay results in HIV-1-infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, p. 2767–2769, 2012.
- ALMEIDA, Cidade e Identidade: São José dos Campos, do peito e dos ares. 2012. Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ALVES, A. J. R. **Estudo molecular de casos de tuberculose recorrente**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v. 161, p. 1376–1395, 1999.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v. 161, p 221- 247, 2000.
- ANDERSEN, P. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 15, n. 1, p. 7-13, 2007.
- ARANCIBIA, S. A. et al. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. **Biological Research**, Santiago, v. 40, p. 97-112, 2007.
- ARENAS MIRAS, M.D.M. et al. Diagnosis of latent tuberculosis in patients with systemic lupus erythematosus: T.SPOT.TB versus tuberculin skin test. **Biomeded Research International**, Granada, Spain v. 2014, 2014. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri2014/291031/abs>. Acesso em 15 de jan.2018.
- ASSIS, M. M. A.; JESUS, W. L. A. Acesso aos serviços de saúde: abordagens, conceitos, políticas e modelo de análise. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n.11, p. 2865-75, 2012.
- BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the goals of prophylaxis. **Nature reviews microbiology**, London, v.7, n.12, p.845–855, 2009.
- BENTO, J. et al. Métodos de diagnóstico em Tuberculose. **Acta medica portuguesa**. Lisboa, v. 24, n. 1, p. 145–154, 2011.
- BERTOLOZZI, M. R. et al. O controle da tuberculose um desafio para a saúde pública. **Revista de Medicina (São Paulo)**, São Paulo, v. 93, n. 2, p. 83–89, 2014. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/97330>>. Acesso em: 20 set. 2016.
- BLOK, N. et al. Lipoarabinomannan enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis of childhood tuberculous meningitis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 18, n. 2, p. 205-210, 2014.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO Brasília: Secretaria em Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v. 45, n. 10, 2014.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO Brasília: Secretaria em Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v.49, n.11, 2018.

BONI, P. M. R. **Avaliação da concordância entre os testes tuberculínico e Quantiferon®-TB gold in tube no diagnóstico da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* em crianças e adolescentes**, 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.

BONIGLIOLI. K.R. Imunobiológicos e Tuberculose: Seguimento de pacientes em uso de anti-TNF. **Revista Paulista de Reumatologia**, São Paulo, v.13.n.14.p. 33-38, 2014.

BOZANNO, F.; MARRAS, F.; DE MARIA, A. Immunology of Tuberculosis. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, [S.l.], v.6, n.1, 2014. Disponível em: <https://www.mjhid.org/index.php/mjid/article/view/1364/2206>. Acesso em : 10 mar 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Brasília, 2002(cadernos de atenção básica, n.g).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim da Tuberculose no Brasil**; Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica**. Brasília, 2014 a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**, Brasília, 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota informativa nº 08, de 2014 CGPNCT/DEVEP/SVS/MS**, Brasília, 2014c.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Série histórica da Taxa de Incidência de Tuberculose: Brasil, Regiões e Unidades Federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2014)**. Brasília, 2015b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/setembro/24/taxa-incid-ncia-tuberculose-1999-2014-base-JUN-2015.pdf>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

BROCK, I. et al. Comparison of Tuberculin Skin Test and New Specific Blood Test in Tuberculosis Contacts. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Nova York, v. 170, n. 1, 2004. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.2000402-2320c>. Acesso: 19 de dez. 2017.

BRUNELLO, M. E. F. et al. Vínculo doente-profissional de saúde na atenção a pacientes com tuberculose. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 176-182, 2009.

BUSATTO et al. Tuberculose ativa versus Tuberculose Latente: uma revisão de literatura. **American Journal of infection control**, St. Louis, v. 4, n. 3, p. 60-64, 2015.

CAMPOS, R.; PIANTA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul - Brasil. **Boletim da Saúde**, Porto Alegre, v. 15, p. 61-71, 2001.

CAMPOS, H. Diagnóstico da tuberculose. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 92–99, 2006. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=612388&indexSearch=ID>>. Acesso em: 15 out. 2016.

CASCANTE, J.A. et al. Diagnóstico de la infección tuberculosa. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, Pamplona, v. 30, n. 2, p. 49-59, 2007.

CAVALCANTI, E.F.A. Destaques da III Diretrizes para Tuberculose. **MedicinaNet**, 11 Jan. 2010. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/artigos/2695/destaques_da_iii_diretrizes_para_tuberculose.htm>. Acesso em 14 jul. 2015.

CARRAZEDO, A. M. V. **Different aspects of Tuberculosis in immunocompetent and immunocompromised patients: epidemiology, clinical manifestations, diagnostic and treatment**. Porto, Universidade do Porto, 2009. Disponível em:<<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/20894/2/Aspectos%20distintos%20da%20Tuberculose%20em%20imunocompetentes%20e%20imunocomprometido%20epidemiologia%20manifest.pdf>>. Acesso em: 20 Jul. 2017.

CATTAMANCHI A. et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, Hargestown**, v. 56, n. 3, p. 230-238, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, Estados Unidos **TB Elimination - The Difference between Latent TB Infection and TB Disease**, 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/general/LTBIandActiveTB.pdf>>. Acesso em: 15 Mar. de 2016.

CHIU, H. Y.; HSUEH, P. R.; TSAI, T. F. Clinical experience of QuantiFERON() -TB Gold testing in patients with psoriasis treated with tumour necrosis factor blockers in Taiwan. **British Journal of dermatology**, London, v. 164, p. 553–559, 2011.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. A. Etiologia. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, 2006. Disponível em :<<http://revista.hupe.uerj.br/>. Acesso em: 31 abr.2017.

COLE, S. T. et. al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, London. v.393, p.537-544. 1998.

COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology**, London, v. 103, n. 1, p. 1-9, 2001.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Resolução nº 441 de 12 de maio de 2011**, Brasília, 2011. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2016.

CORBETT, E. L. et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 163, p. 1009-1021, 2003.

COUTINHO, L. A. S. A. et al. Perfil epidemiológico da tuberculose no município de João Pessoa – PB, entre 2007 - 2010. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 35–42, 2012.

CRUZ, A. T.; STARKE, J. R. Clinical manifestations of tuberculosis in children. In: (Ed.). **Paediatric Respiratory Review**, London, v. 8, p. 107-117, 2007.

CREED, T.J. et al. The effects of cytokines on suppression of lymphocyte proliferation by dexamethasone. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 183, p. 164–171, 2009.

DALCOLMO, M. P. et al. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de Controle. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 1, p.40-42, 2007.

DHEDA, K. et al. Performance of a t-cell based diagnostic test for tuberculosis infection in HIV-infected individuals is dependent of CD4 cell count. **AIDS**, Londres, v. 19, p. 2038-2041 2005.

DIEL, R. et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 37, n. 1, p. 88-99, 2011.

DUARTE, R.; VILLAR, M.; CARVALHO, A. Tratamento da tuberculose de infecção latente. As recomendações actuais. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, Lisboa, v. 16, n. 5, p. 100-105, 2010.

DUARTE, R. et al. Position paper on tuberculosis screening in patients with immune mediated inflammatory diseases who are candidates for biological therapy. **Jornal Português de Gastrenterologia**, Lisboa, v. 19, n. 6, p. 290-299, 2012.

DUCATI, R. et al. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 697-714, 2006.

DYE, C. et al. Global Burden of Tuberculosis: Estimated Incidence, Prevalence and Mortality by Country. **Journal of the American Medical Association**. Chicago, v. 282, p. 677–86, 1999.

FERREIRA, T. F; CALDAS, A. J. M. Tratar tuberculose latente com 5 ou 10 milímetros de prova tuberculínica? **Revista de Pesquisa em Saúde**, São Luís, v. 16, n. 1, p. 20-23, 2015.

FERRI, A. O. et al. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 15, n. 24, p. 105–212, 2014.

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA. Educação a Distância. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 2008.

GANGULY, N. et al. Mycobacterium tuberculosis 6-kDa early secreted antigenic target (ESAT-6) protein downregulates lipopolysaccharide induced c-myc expression by modulating the extracellular signal regulated kinases $\frac{1}{2}$. **BMC Immunology**. London, v. 8, n. 24, 2007. Disponível em : <<https://bmcimmunol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2172-8-24>> Acesso em: 26 nov. 2018

GAO, L, et al. Latent tuberculosis infection in rural China: baseline results of a population-based, multicentre, prospective cohort study. **Lancet Infectious Disease**, Nova York, v. 14, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25681063>>. Acesso em: 07 maio 2016.

GETAHUN, H. et al. Latent Mycobacterium tuberculosis infection. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 372, n. 22, p. 2127-2135, 2015.

GOLETTI, D. et al. The in vitro induction of human immunodeficiency virus (HIV) replication in purified protein derivative-positive HIV-infected persons by recall antigen response to Mycobacterium tuberculosis is the result of a balance of the effects of endogenous interleukin-2 and proinflammatory and antiinflammatory cytokines. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 177, p. 1332–1338, 1998.

GOH, L. et al. Análise sistemática da influência do antifator de necrose tumoral [anti-TNF] sobre as taxas de infecção em pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Campinas v. 53, p. 501–515, 2013.

GOGUS, F. et al. Comparison of tuberculin skin test and QuantiFERON-TB gold in tube test in patients with chronic inflammatory diseases living in a tuberculosis endemic population. **Clinical and Experimental Medicine**, Milão, v. 10, p. 173–177, 2010.

GONZÁLEZ-MARTIN J. et al. Consensus documento in the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis. **Archivos de Bronconeumologia**, Barcelona, v. 6, n. 5, p. 255-274, 2010.

GUEDES, G.M.R. **Avaliação dos testes QuantiFERON-TB GOLD e Nested PCR em único tubo no diagnóstico de tuberculose em pacientes imunodeprimidos**. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

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

GUTIERREZ, M. C, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS pathogens**, São Francisco, p.1-5, 2005. Disponível:

<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.0010005&type=printable>

Acesso em: 26 nov. 2018

GUZMÁN, A. G.; HERNANDEZ, A. J.; CUEVAS, R. Z. Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas. **MedUNAB**, Bucaramanga, v. 6, n. 16, p. 46-51, 2003.

HARDY, A. B. et al. Cost-effectiveness of the NICE guidelines for screening for latent tuberculosis infection: the QuantiFERON-TB Gold IGRA alone is more cost-effective for immigrants from high burden countries. **Thorax**, London, v. 65, p. 178–180, 2010.

HARRIES, A. et al. TB/HIV: a clinical manual. Geneva: WHO, 2004.

HERRERA, V. et al. Clinical Application and Limitations of Interferon- γ Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 52, n. 8, p. 1031–1037, 2011.

HETT, E. C.; RUBIN, E. J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. **Microbiology and Molecular Biology Review**. Washington, v.72, p. 126-156, 2008.

HERTTING, O.; SHINGADIA, D. Childhood TB: when to think of it and what to do when you do. **Journal of Infection**, Londres, v. 68, n. 1, p. S151-154, 2014.

HIJJAR, M. A.; PROCÓPIO, M. J. Tuberculose – Epidemiologia e Controle no Brasil. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, ano 5, 2006. Disponível : http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=228 Acesso em : 26 nov. 2018

HINO, P. et al. Coinfecção de Tb/HIV em um distrito administrativo do Município de São Paulo. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 755-761, 2012.

HONG, X.; HOPFINGER, A. J. Construction, molecular modeling, and simulation of Mycobacterium tuberculosis cell walls. **Biomacromolecules**, Washington, v. 5, p. 1052-1065, 2004.

HORSBURGH, C. R. JR.; RUBIN, E. J. Clinical practice. Latent tuberculosis infection in the United States. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 364, n. 15, p. 1441-1448, 2011.

HUR, Y.G. et al. Combination of Cytokine Responses Indicative of Latent TB and Active TB in Malawian Adults. **PLoS ONE**. San Francisco, v. 8, 2013. Disponível : <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0079742&type=printable> Acesso em 26 nov. 2018.

JONES, B.S. et al. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cells counts in patients with human immunodeficiency virus infection. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 148, p. 1292-1297, 1993.

KIM, J. H. et al. Factors influencing discrepancies between the QuantiFERON-TB gold in tube test and the tuberculin skin test in Korean patients with rheumatic diseases. *Semin. Arthritis and Rheumatism*, Atlanta, v. 42, p. 424–432, 2013.

KRAMER, F. et al. Delayed diagnosis of tuberculosis in patients with immunodeficiency virus infection. *American Journal of Medicine*, Nova York, v. 89, p. 451-456, 1990.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M. B.; SOUZA, G. R. M. **Tuberculose**: do ambulatório à enfermaria. São Paulo: Atheneu, 2005.

KRUK, A. et al. Symptom-based screening of child tuberculosis contacts: improved feasibility in resource-limited settings. In: (Ed.). *Pediatrics*, Evanston, v. 121, p. 1646-52, 2008.

KURTI, Z. et al. Tuberculin Skin Test and Quantiferon in BCG Vaccinated, Immunosuppressed Patients with Moderate-to-Severe Inflammatory Bowel Disease. *Journal of gastrointestinal and liver diseases*, Cluj-Napoca, v. 24, n. 4, p. 467-472, 2015. Disponível em: <<http://www.jgld.ro/wp/archive/y2015/n4/a11/>>. Acesso em: 07 maio 2016.

KUSSEN, J. M. B. et al. Interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for latent tuberculosis infection among HIV patients in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v. 20, n. 1, p. 69-75, 2016.

LAWN, S. D; BADRI, M.; WOOD, R. Tuberculosis among HIV-infected patients receiving HAART : long term incidence and risk factors in a South African cohort. *AIDS*. Londres, v. 19, n. 18, p. 2109-2116, 2005.

LAWN, S. D.; WOOD, R.; WILKINSON, R, J. Changing Concepts of “Latent Tuberculosis Infection” in Patients Living with HIV Infection. *Clinical and Developmental Immunology*, Abgindon, 2011.

LEITE, C.Q. F.; SATO, D.N. Mycobacterium In: Silva CHPM & Neufeld PM. Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico. *Revinte*, Rio de Janeiro, p.317-333, 2006.

LETH, F.; SESTER. M. Testing for LTBI: more of the same or a step forward? *International Journal of tuberculosis and lung disease*, Paris, v. 22, n. 6, p. 591.

LIMA, E.V.A. et al. Investigação de infecção tuberculosa latente em pacientes com psíorise candidatos ao uso de drogas imunobiológicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p. 716-724, 2011.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 185, n. 1, p. 15-22, 2010.

LINAS, B. P. et al. Priorities for Screening and Treatment of Latent Tuberculosis Infection in the United States. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Nova York, v. 184, n. 5, 2011.

LOPES, D. M. A. et al. Diagnóstico e tratamento da tuberculose latente em pacientes com doenças infamatórias crônicas e uso de imunobiológicos inibidores do TNF- α . *Jornal brasileiro de pneumologia*, Brasília, v. 37, n. 3, p. 308-316, 2011.

MAARTENS, G. **Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of tuberculosis in HIV-infected patients**. 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/cERuAS> > Acesso em: 26 agos. 2014.

MACHADO, P. C. et al. Comparação do teste tuberculínico e do ensaio de liberação de interferon-gama para diagnóstico de tuberculose latente em agentes comunitários de saúde do Sul do Brasil, Rio Grande do Sul, 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 675–681, 2014. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742014000400009&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 25 nov. 2016.

MACIEIRA, S. Aspectos microbiológicos do Mycobacterium lepra. In: **Opromolla DVA, editor. Noções de Hansenologia**, Bauru, p. 66-69, 2000.

MANTZARIS, G. J. et al. The impact of immunosuppressive therapy on QuantiFERON and tuberculin skin test for screening of latent tuberculosis in patients with inflammatory bowel disease scheduled for anti-TNF therapy. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, p. 1–5, 2015.

MARQUES, Claudia Diniz Lopes. **Avaliação do teste T-SPOT-Tb no diagnóstico da infecção tuberculosa latente em pacientes com artrite reumatoide**. 2008. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MARAIS, B. J. et al. Diversity of disease in childhood pulmonary tuberculosis. **Annals of Tropical Paediatrics**, Londres, v. 25, n. 2, 2005.

MARAIS, B. J. Tuberculosis in children. **Journal of Paediatrics and Child Health**, Melbourne, v. 50, n. 10, p. 759-767, 2014.

MATULIS, G. et al. Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases: performance of a Mycobacterium tuberculosis antigen-specific interferon gamma assay. **Annals of Rheumatic Disease**, Switzerland, v. 67, n. 1, p. 84-90, 2007.

MENZIES, D. Interpretation of Repeated Tuberculin Tests Boosting, Conversion, and Reversion. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Nova York, v. 159, n. 1, 1999.

MENZIES, D.; PAI, M.; COMSTOCK, G. Meta-analysis: new testes for the diagnostic of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 146, p. 340-354, 2007.

MOTA, L.M.H. et al. Segurança do uso de terapias biológicas para o tratamento de artrite reumatoide e espondiloartrites. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Campinas, v. 55, n. 3, p. 281-309, 2015.

MOON, H. W.; HUR, M. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an updated review. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, Philadelphia, v.43, n.2, p. 221-229, 2013

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 21, n.1, p. 42-48, 2011.

MUNOZ, P. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection in recipients of solid organ transplants. **Clinical Infectious Disease**. Chicago, v.40, p. 581-587, 2005.

NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to tuberculosis. **Annual Review of immunology**, Palo Alto, v. 22, p. 599-623, 2004.

O’GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annual Review of Immunology**. Palo Alto, v. 31, p. 475–527, 2013.

OLIVEIRA, G. M. et al. Systematic review of diagnostic tests accuracy: a narrative review. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 153–156, 2010.

OLIVEIRA, S. M. V. L. et al. Frequency of indeterminate results from an interferon-gamma release assay among HIV-infected individuals. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 215-218, 2017.

ONI, T. et al. Risk factors associated with indeterminate gamma interferon responses in the assessment of latent tuberculosis infection in a high-incidence environment. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v. 19, n. 8, p. 1243-1247, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global Tuberculosis Control: Epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009**, Genebra, 2009, p. 314. Disponível em: <<https://reliefweb.int/report/world/global-tuberculosis-control-2009-epidemiology-strategy-financing>>. Acesso em: 12 abr 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Use of tuberculosis release assays (IGRAs) in low- and middle- income countries**, Genebra, 2011, p. 62. Disponível em: <http://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement_igra_oct2011.pdf>. Acesso em: 12 abr 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for Intensified Tuberculosis Casfinding and Isoniazid Preventive Therapy for People living with HIV in resourceConstrained Settings**, Genebra, 2013, p. 52. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44472/9789241500708_eng.pdf;jsessionid=D74FBCD2546C27D69944E1E3F54B3C23?sequence=1>. Acesso em: 20 abr 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Tuberculosis Report 2014**, Genebra, 2014, p. 171. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21634en/s21634en.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global tuberculosis report 2015**, Genebra, 2015, p. 204. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/191102/9789241565059_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 05 maio 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global tuberculosis report 2016**, Genebra, 2016, p. 214. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global tuberculosis report 2017**, Genebra, 2017, p. 262. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259366/9789241565516-ng.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 11 mar 2018.

PAI, M. et al. Gamma Interferon Release Assays for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Clinical Microbiology**, Washington, v.27, n. 1, p. 3-201, 2014.

PAI, M.; ZWERLING, A.; MENZIES, D. Systematic Review: T-Cell-based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 149, p. 149-177, 2008.

PAI, M.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M., JR. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infectious Disease**, Nova York, v. 4, n. 12, p. 761-76, 2004.

PASSALENT, L. et al. Detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: a head-to-head comparison of the T-SPOT TB test, tuberculin skin test, and an expert physician panel. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**. Washington, v. 2. n. 1, p. 68-73, 2006

PEREIRA, S. M. et al. Vacina BCG e políticas de vacinação. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 1, p.59-60, 2007.

PICCINI, P. et al. Clinical peculiarities of tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2014. Disponível: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-S1-S4> Acesso: 26 nov.2018.

PINHEIRO, Stefan Arthur Gerzoschkowitz. **Tuberculose, representação e preconceito: breve estudo da história da tuberculose em São José dos Campos/SP (1900-1940)**. Monografia (Programa de Graduação em História- Faculdade de Educação e Artes), 2016.

PONCE DE LEON, D. et al. Comparison of an interferongamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 35, p. 776–781, 2008.

POORHASAN, A.; HAGHDOOST, M.; MASHRABI, O. Comparison of tuberculin skin test and interferon gamma assay for the diagnosis latent tuberculosis. **American Journal of Infectious Disease**, Hamilton, v. 6, n. 2, p.50-53, 2010.

PORTO, A. Representações sociais da tuberculose: estigma e preconceito. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.41, n. 1, p.43-49. 2007.

QIAGEN. **Bula do QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) ELISA**, 2013. Disponível em: < tb.gnowee.net/information/view/283>. Acesso em: 20 abr 2018.

QIAGEN. When accuracy matters. QuantiFERON®-TB Gold by QIAGEN The most accurate test for TB infection. **QuantiFERON-TB Gold Brochure**, 2016. Disponível em: < http://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/04/PROM-7540-003_1099497_BRO_QFT_0914_WW.pdf>. Acesso em: 20 abr 2018.

RAMOS, J.M. et al. Contribution of Interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: A comparison of QuantiFERON-TB Gold In Tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test. **BMC Infectious Diseases**, Londres, v. 12, n. 1, p. 169, 2012.

RANGAKA, M. X. et al. Effect of HIV-1 infection on T-cell-based and skin test detection of tuberculosis infection. **American journal of respiratory and critical care medicine**, Nova York, v.175, p.514-520, 2007.

REDELMAN-SIDI, G.; SEPKOWITZ, K. A. IFN- γ release assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection among immunocompromised adults. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.188, p. 422-431, 2013.

ROSS, L.; S GOFF, M. Latent Tuberculosis Infection and BCG Vaccination. **Journal of Midwifery and Women's Health**, Nova York, v. 50, n. 4, p. 344-346, 2005.

RUFFINO-NETTO, A.; SOUZA, A. M. A. F. Reforma do setor saúde e controle da tuberculose no Brasil. **Informe Epidemiológico SUS**, Brasília, v. 8, n. 4, p. 35-51, 1999.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 51-58, 2002.

SALAME, F. Tuberculose. Disciplina de pneumologia e fisiologia da Universidade do Estado do Amazonas. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/flaviasmatos/tuberculose-25788561>. Acesso em: < 28 ago. 2017>.

SANTIN, M. et al. Detection of latent tuberculosis by the tuberculin skin test and a whole-blood interferon- γ release assay, and the development of active tuberculosis in HIV-seropositive persons. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 69, n. 1, p. 59–65, 2011.

SANTOS, D. T. et al. Infecção latente por tuberculose entre pessoas com HIV/AIDS, fatores associados e progressão para doença ativa em município no Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 8, 2017.

SCHUSTER, M. Mycobacterial disease: a historical and epidemiologic perspective. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 13, n.3, 1995.

SHALER, C.R. et al. Understanding Delayed T-Cell Priming, Lung Recruitment, and Airway Luminal T-Cell Responses in Host Defense against Pulmonary Tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, Abingdon, p. 1-13, 2012.

SILVA, D. M. et al. Avaliação de desempenho de Serviços da Atenção Básica para o tratamento da tuberculose. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 1044-53, 2014.

SILVA, Rosemeri Maurici da; ROSA, Lígia da; LEMOS, Renata Nunes. Alterações radiográficas em pacientes com a co-infecção vírus da imunodeficiência humana/tuberculose: relação com a contagem de células TCD4+. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 3, n. 32, p. 228-233, 2006.

SINGH, N.; PATERSON, D. L. Mycobacterium tuberculosis infection in solid-organ transplant recipients: Impact and implications for management. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v.27, p.1266- 1277, 1998.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN). **Banco de dados agregados do DATASUS**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/tubercpe.def>. Acesso em 14 jul. 2015.

SMOLEN, J.S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antireumathic drugs: 2013 update. **Annals of Rheumatic Diseases**, Londres, v.64, p 24-28, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 1018–1048, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v35n10/v35n10a11.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2016.

SOUZA, J. N.; BERTOLOZZI, M. R. A vulnerabilidade à tuberculose em trabalhadores de enfermagem em um hospital universitário. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v.15, n. 2, p.1-8, 2007.

SRINIVASAN, L.; AHLBRAND, S.; BRIKEN, V. Interaction of Mycobacterium tuberculosis with host cell death pathways. **Cold Spring Harbor Perspective in Medicine**, v. 4, n. 8, 2014.

Disponível:

<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/early/2014/06/25/cshperspect.a022459.short> Acesso em: 26 nov. 2018

STARKE, JR. et al., Interferon- γ release assays for diagnosis of tuberculosis infection and disease in children. **Pediatrics**, Evasnton, v. 134, n. 6, p. 1763-1773, 2014.

STENGER, S.; NIAZI, K. R.; MODLIN, R. L. Down-Regulation of CD1 on Antigen-resenting Cells by Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 161, n. 7, p. 3582-3588, 1998.

STOUT, J. E.; MENZIES, D. Predicting tuberculosis: does the IGRA tell the tale? **American Journal of Respiratoru and Critical Care Medicine**, Nova York, v. 177, n. 10, p. 1055-1057, 2008.

SUCCI, R. C. M. O desafio de diagnosticar a infecção tuberculosa na criança. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 2–3, 2014.

TANG, P.; JOHNSTON, J. Treatment of Latent Tuberculosis Infection. **Current Treatment Options in Infectious Disease**, Philadelphia, n. 9, p. 371–379, 2017.

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

TIWARI R. P. et al. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: Promises and challenges ahead. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 87, p. 193-201, 2007.

TORNEE, S. et al. Factors associated with the household contact screening adherence of tuberculosis patients. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 22, n. 36, p. 331-402, 2005.

TUBERCULOSE. Universidade do Estado do Amazonas. Departamento de clínica médica. Disciplina de pneumologia e fisiologia. Prfª Flávia Salame. [S.l.]. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/flaviasmatos/tuberculose-25788561>. Acesso em: < 28 ago. 2017>.

TUFARIELLO, J. M.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **Lancet Infectious Disease**, Nova York, n. 3, p. 578–90, 2003.

VAN-LUME, D. S. M. et al. Immunological Diagnosis of Tuberculosis Based on Recombinant Antigens ESAT-6 and CFP-10 in Children from an Endemic Area in Northeast Brazil. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 72, p. 460–468, 2010.

VERGNE, I. et al. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 20, p. 367-394, 2004.

WANG, Y. N. et al. *Amycolicoccus subflavus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 60, p. 638-643, 2009.

WAYNE, L. G. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, Berlim, v. 13, n. 11, p. 908-914, 1994.

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

IDENTIFICAÇÃO			
1. NÚMERO DA FICHA NA PESQUISA <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div>		2. DATA DA ENTREVISTA _____/_____/_____	
3. PROCEDÊNCIA: 1. Ambulatório <input type="checkbox"/> 2. Enfermaria 3. UTI		4. NÚMERO DO PRONTUÁRIO DO HOSPITAL <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div>	
5. HOSPITAL DE ORIGEM/UNIDADE DE SAÚDE 1. Hospital das Clínicas 2. Hospital Otávio de Freitas <input type="checkbox"/> 3. IMIP 4. Hospital Barão de Lucena 5. Oswaldo Cruz 6. Joaquim Cavalcanti 10. Outro: _____		6. NÚMERO DO SAME <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div>	
		7. DATA DO DIAGNÓSTICO _____/_____/_____	
DADOS DO PACIENTE			
8. NOME COMPLETO DO PACIENTE CONFORME RG _____ _____			
9. NOME DA MÃE OU RESPONSÁVEL _____ _____			
10. DATA DE NASCIMENTO _____/_____/_____	11. IDADE DO PACIENTE <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px; display: inline-block;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px; display: inline-block;"></div> anos	12. SEXO 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino 3. Ignorado	
13. ENDEREÇO / LOGRADOURO _____ _____ _____			
PONTO DE REFERÊNCIA _____ _____			
14. BAIRRO _____ _____	15. CIDADE _____ _____	16. UF <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px; display: inline-block;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px; display: inline-block;"></div>	17. ZONA / ÁREA 1. Urbana 3. Periurbana <input type="checkbox"/> 2. Rural 4. Ignorado
18. TEL. RES. E CELULAR (____) _____ - _____ (____) _____ - _____	19. CEP <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 15px; margin-top: 5px;"></div>		20. RAÇA / COR 1. Branca 4. Parda <input type="checkbox"/> 2. Preta 5. Indígena 3. Amarela 6. Ignorado
DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS			

21. GRAU DE INSTRUÇÃO DO PACIENTE 1. Analfabeto 4. 2º grau <input type="checkbox"/> 2. Iniciou alfabetização 5. 3º grau <input type="checkbox"/> 3. 1º grau 6. Outro: _____	22. RENDA FAMILIAR MENSAL 1. Menor ou igual a 1 salário mínimo 4. Outro: _____ <input type="checkbox"/> 2. De 2 a 4 salários mínimos 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 3. Mais que 5 salários mínimos	
23. QUANTAS PESSOAS MORAM NA CASA DO PACIENTE? 1. Até 3 <input type="checkbox"/> 2. De 4 a 6 3. Mais de 6 8. Não sabe informar	24. QUANTOS ADULTOS? 1. Até 2 2. De 3 a 5 <input type="checkbox"/> 3. Mais que 5	25. QUANTAS CRIANÇAS? 1. Até 2 2. De 3 a 5 <input type="checkbox"/> 3. Mais que 5
26. QUANTOS CÔMODOS (LOCAIS DE DORMIR) TÊM NA CASA? 1. Um 2. De 2 a 4 <input type="checkbox"/> 3. Mais de 4 8. Não sabe informar		
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS		
27. EXISTE ALGUM CASO DE TUBERCULOSE NA FAMÍLIA OU EM PESSOA DE CONVÍVIO? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 37. Caso sim, há quanto tempo? _____ <i>Caso a resposta seja NÃO, seguir para 34</i>	28. O CASO FOI CONFIRMADO? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável <i>Caso a resposta seja NÃO, pular para 33.</i>	
29. O CASO FOI CONFIRMADO POR BACILOSCOPIA E/OU CULTURA? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	30. QUAL O GRAU DE PARENTESCO? 1. Mãe 6. Primo (a) 2. Pai 7. Outro: _____ 3. Irmã (o) 8. Não sabe informar 4. Avô (ó) 9. Inaplicável 5. Tio (a) 10. Filho (a)	
31. QUAL O TIPO DE CONTATO? 1. Intradomiciliar contínuo (5 a 7 dias/semana, > 6h/dia) 2. Intradomiciliar intermitente (5 a 7 dias/semana, < 6h/dia) 3. Esporádico (entre 2 a 4 dias/semana) <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	32. EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO PARA TB O CONTATO: 1. Foi tratado totalmente <input type="checkbox"/> 2. Está em tratamento 3. Não tratado 4. Interrompeu o tratamento 8. Não sabe informar 9. Inaplicável <i>Caso não tenha havido interrupção, seguir para 39.</i>	
33. QUAL O MOTIVO DA INTERRUPÇÃO: 1. Intolerância ao medicamento 2. Falta de medicamento <input type="checkbox"/> 3. Abandono do tratamento 4. Outro motivo 8. Não sabe informar 9. Inaplicável		
ANTECEDENTES DO PACIENTE		
34. TEM DOENÇA DE BASE E AGRAVOS ASSOCIADOS? <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <i>Caso a resposta seja NÃO, seguir para 36.</i>	35. QUAL DOENÇA? 1. Asma 6. Fibrose Cística 11. Doença mental 2. Pneumonia 7. HIV/AIDS 12. Câncer <input type="checkbox"/> 3. Bronquite 8. Não sabe 4. Tuberculose 9. Inaplicável 5. Diabetes 10. Outro: _____	

36. TEM CICATRIZ DE BCG? (VISTA PELO ENTREVISTADOR NO BRAÇO DIREITO OU ATRAVÉS DE CARTÃO) <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não 8. Não verificado	37. FEZ PPD? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe Data de realização: ____/____/____ (Vê no cartão) Caso NÃO tenha feito, seguir para 39 .	
38. RESULTADO DO PPD: <input type="checkbox"/> 1. Não reator (0-4mm) 4. Reator muito forte (>15mm) 2. Reator fraco (5-9mm) 8. Não sabe informar 3. Reator forte (10-14mm) 9. Inaplicável	39. TOMA ALGUM MEDICAMENTO ATUALMENTE? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não Qual: _____	
40. JÁ FEZ TTO PARA TUBERCULOSE? 1. Sim <input type="checkbox"/> Qual: _____ <hr/> 2. Não Caso sim, há quanto tempo parou o TTO? _____ <hr/> Caso sim, número de TTO anteriores: _____		
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (referidos pelo Informante)		
41. HÁ QUANTO TEMPO O PACIENTE ESTÁ DOENTE? <input type="text"/> <input type="text"/> meses <input type="text"/> <input type="text"/> dias	42. TEM FEBRE? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Caso sim, há quanto tempo: _____	43. PERDA DE PESO? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <input type="checkbox"/>
44. TEM TOSSE? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe Caso sim, há quanto tempo: _____	45. TIPO DE TOSSE: 1. Seca <input type="checkbox"/> 2. Produtiva 3. Hemoptise 9. Inaplicável	46. TEM FALTA DE APETITE? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe
47. TEM FRAQUEZA MUSCULAR? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <input type="checkbox"/>	48. APRESENTA FALTA DE AR DESDE QUE FICOU DOENTE? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe	49. APRESENTA SUOR NOTURNO? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <input type="checkbox"/>
50. NOTOU LINFONODO (LÂNDRIA OU ÍNGUA) AUMENTADO? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe	51. LOCAL DO LINFONODO: 1. Pescoço <input type="checkbox"/> 2. Axila 3. Região inguinal (virilha) Outros _____	

50. OBSERVAÇÕES CLÍNICAS:

INVESTIGAÇÃO CLÍNICA (preenchida pelo médico acompanhante)
MÉDICO RESPONSÁVEL: _____ **FONE:** (____) _____

52. PESO
 _____ Kg

53. ESTATURA
 _____ m
EXAMES LABORATORIAIS (preenchido pelo médico pesquisador)

54. REALIZOU RAIOS X DE TÓRAX NA ADMISSÃO? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar Data: ____/____/____ <i>Caso a resposta seja NÃO, seguir para 54</i>	55. RESULTADO DO RAIOS X DE ADMISSÃO: 1. Normal 2. Alterado <input type="checkbox"/>	- SE ALTERADO: 1. Padrão não sugestivo de TB 2. Forma Pneumônica <input type="checkbox"/> 3. Forma Pneumoganglionar 4. Forma Pleuropulmonar 5. Forma Miliar 6. Forma Ganglionar 7. Inaplicável 8. Não sabe informar
56. REALIZOU RAIOS X DE TÓRAX DE CONTROLE? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar Data: ____/____/____ <i>Caso a resposta seja Não, seguir para 56</i>	57. RESULTADO DO RAIOS X DE CONTROLE: 1. Normalizou <input type="checkbox"/> 2. Houve melhora 3. Houve piora 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	58. REALIZOU TOMOGRAFIA DE TÓRAX? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar Data: ____/____/____ <i>Caso a resposta seja Não, seguir para 68.</i>
59. RESULTADO DA TOMOGRAFIA DE TÓRAX: 1. Normal 2. Alterado sugestivo <input type="checkbox"/> 3. Alterado inespecífico 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	60. REALIZOU BACILOSCOPIA? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ <i>Caso a resposta seja NÃO, seguir para 63.</i>	61. RESULTADO DA BACILOSCOPIA: 1. Positiva <input type="checkbox"/> 2. Negativa 9. Inaplicável _____ Cruzes

62. REALIZOU CULTURA? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____		63. RESULTADO POR AMOSTRA BIOLÓGICA (NESTED-PCR ÚNICO TUBO): 1. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/> 6. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/> 2. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> 7. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/> 3. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> 8. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/> 4. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural <input type="checkbox"/> 9. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não	
64. DIAGNÓSTICO INICIAL 1. TB infecção <input type="checkbox"/> 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita <input type="checkbox"/> 4. Não é TB <input type="checkbox"/>		65. DATA DA NOTIFICAÇÃO: Data: ____/____/____ Profissional que notificou: _____	66. DIAGNÓSTICO FINAL 1. TB infecção <input type="checkbox"/> 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita <input type="checkbox"/> 4. Não é TB <input type="checkbox"/>
67. TEMPO ENTRE O INÍCIO DOS SINTOMAS E O DIAGNÓSTICO DE TB NO SERVIÇO DE SAÚDE: <input type="checkbox"/> 1. ≤ 1 mês 3. ≥ 3 meses 2. 1 – 3 meses 4. Não investigado		68. FORMA DE TB 1. Pulmonar 2. Extra pulmonar <input type="checkbox"/>	
69. TRATAMENTO REALIZADO: 1. Quimioprofilaxia (INH por 6 meses) 4. Esquemas Especiais (EE) C/ ou s/ doença hepática prévia 2. Esquema Básico (EB - 2RHZE/4RH) 5. Esquemas de Resistência (Mono, Multi e Extremamente Resistente) 3. Esquema para Meningoencefalite (EM - 2RHZE/7RH) 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>			
EVOLUÇÃO			
70. RESPOSTA AO TRATAMENTO ESPECÍFICO (FEITA PELO MÉDICO ACOMPANHANTE) 1. Melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Resposta ao tratamento) 2. Não houve melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Não houve resposta ao tratamento) <input type="checkbox"/> 8. Inaplicável <input type="checkbox"/>		- FORMA: 1. Pulmonar <input type="checkbox"/> 2. Extrapulmonar 3. Pulmonar + Extrapulmonar 4. Infecção Latente (ILTB)	
• Entrevistador: • _____ _____		• Assinatura: • _____ _____	

DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
71. REALIZOU NESTED-PCR ÚNICO TUBO PRÉ-TRATAMENTO? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____		72. RESULTADO POR AMOSTRA BIOLÓGICA (NESTED-PCR ÚNICO TUBO): 1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/> 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural <input type="checkbox"/> 2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/> 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/> 3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/> 8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/> 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> 9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/> 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> 10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> 1. Sim 2. Não	

<p>73. REALIZOU PCR COLORIMÉTRICA PRÉ-TRATAMENTO?</p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Data: ____/____/____</p>	<p>74. RESULTADO POR AMOSTRA BIOLÓGICA (PCR COLORIMÉTRICA):</p> <table> <tr> <td>1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/></td> <td>6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural <input type="checkbox"/></td> <td rowspan="10" style="vertical-align: middle; text-align: center;"> 1. Sim 2. Não </td> </tr> <tr> <td>2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/></td> <td>7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/></td> <td>8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/></td> <td>9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/></td> <td>10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/>	6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural <input type="checkbox"/>	1. Sim 2. Não	2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/>	7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/>	3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/>	8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/>	4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/>	9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/>	5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/>	10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/>		
1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/>	6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural <input type="checkbox"/>	1. Sim 2. Não												
2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/>	7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/>													
3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/>	8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/>													
4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/>	9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/>													
5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/>	10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/>													
<p>75. REALIZOU qPCR PRÉ-TRATAMENTO?</p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Data: ____/____/____</p>	<p>76. RESULTADO POR AMOSTRA BIOLÓGICA (qPCR):</p> <table> <tr> <td>1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/></td> <td>6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural <input type="checkbox"/></td> <td rowspan="10" style="vertical-align: middle; text-align: center;"> 1. Sim 2. Não </td> </tr> <tr> <td>2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/></td> <td>7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/></td> <td>8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/></td> <td>9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/></td> <td>10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/>		6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural <input type="checkbox"/>	1. Sim 2. Não	2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/>	7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/>	3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/>	8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/>	4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/>	9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/>	5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/>	10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/>
1. <input type="checkbox"/> Leucócitos <input type="checkbox"/>	6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural <input type="checkbox"/>		1. Sim 2. Não											
2. <input type="checkbox"/> Plasma <input type="checkbox"/>	7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio <input type="checkbox"/>													
3. <input type="checkbox"/> Urina <input type="checkbox"/>	8. <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/>													
4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/>	9. <input type="checkbox"/> Outros: _____ <input type="checkbox"/>													
5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/>	10. <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/>													

RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO DA FICHA: _____

TELEFONE PARA CONTATO: () _____ - _____ / () _____ - _____

RESPONSÁVEL PELOS EXAMES

MOLECULARES: _____

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Senhor (a) _____, para participar do projeto de pesquisa intitulado: “Desenvolvimento, avaliação e validação de um kit molecular baseado em PCR em tempo real com tecnologia nacional para o diagnóstico da tuberculose” que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é melhorar os exames de detecção da tuberculose doença/infecção (latente) para identificar e tratar mais rapidamente a doença.

1. Caso aceite participar neste estudo, pediremos a você:
 - a) Que forneça informações relacionadas à sua pessoa, à sua atividade profissional, ao contato com pacientes com tuberculose, e ao acompanhamento de seu estado de saúde, que poderemos conseguir perguntando diretamente a você, nas suas visitas ou por telefone, medindo seu peso e altura, e por acesso às anotações médicas e exames realizados durante o seu acompanhamento;
 - b) Que forneça 3 ml de sangue (menos de uma colher de sopa), neste mesmo dia, para fazer o exame de sangue para a infecção tuberculosa, e para as avaliações da pesquisa.
 - c) Gostaríamos também de lhe pedir para autorizar que nós possamos usar o material que sobrar das suas amostras de sangue na continuação deste trabalho, em futuros projetos de pesquisa. Essa autorização é importante caso você não ache necessário que nós o procuremos novamente para obter sua autorização no futuro explicando em que novo projeto estes restos de amostra serão utilizados. Nós asseguramos que seus dados permanecerão confidenciais, e que o comitê de ética em pesquisas avaliará o estudo a ser proposto antes que utilizemos estes restos de amostras. O fato de você não concordar neste momento com a utilização futura destes restos de amostra também não atrapalha sua participação neste estudo nem o cuidado médico que você esteja recebendo ou que possa necessitar por causa dos procedimentos realizados para a pesquisa.

Consente que utilizemos restos de suas amostras em projetos futuros?

() Sim () Não

2. Caso você tenha qualquer dúvida ou queira mais informações sobre os seus resultados, nós lhe forneceremos todas as informações e explicações.
3. Os exames que não estão descritos aqui, e que lhe serão pedidos pelo seu médico, não serão realizados para a pesquisa, e são para seu cuidado médico e tratamento. Qualquer procedimento médico será autorizado e realizado apenas pela equipe médica que está lhe acompanhando. A equipe do estudo não terá nenhuma participação na decisão de realizar qualquer tipo de exame ou tratamento.

4. Você poderá, em qualquer tempo, desistir de participar do estudo, devendo avisar a equipe de estudo.
5. Caso você falte a alguma das coletas, mas ainda queira participar das coletas que faltam você poderá também avisar à equipe de estudo.
6. Todas as informações que permitam identificar seus resultados e seus dados serão mantidas confidenciais, com acesso apenas pela equipe de estudo. As amostras e dados registrados receberão um número específico para assegurar esse segredo. Os resultados serão divulgados na forma de publicações científicas, não permitindo a identificação individual dos participantes.
7. Qualquer teste que seja feito com suas amostras que dê resultados que possam ser úteis para seu acompanhamento e tratamento serão fornecidos a você e ao seu médico caso seja de seu interesse.
8. Estamos entregando a você uma cópia deste formulário para que possa lê-lo cuidadosamente. Estamos também lendo com você todas essas informações para que você tenha a oportunidade de tirar todas as dúvidas com a equipe do projeto, mas a qualquer momento você pode contatar a equipe e questionar e tirar dúvidas sobre o estudo.
9. A participação do(a) Senhor(a) na pesquisa poderá causar riscos, como constrangimento nas abordagens, incômodo ou dor no braço para a coleta de sangue e/ou aplicação intradérmica do PPD. Para minimizar esses riscos, os dados obtidos durante a pesquisa serão mantidos em sigilo pelos pesquisadores, assegurando ao participante a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, de acordo com o regimento da resolução 466/12.
10. Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) possa utilizar as informações obtidas em reuniões, congressos e publicações científicas (preservando a identidade do voluntário). E, para que possamos estocar as suas amostras biológicas, a fim de utilizá-las em estudo posterior. Neste caso, o (a) Senhor (a) será solicitado um novo consentimento, caso tenhamos que utilizar sua amostra em outra pesquisa.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____ **data:** _____

Endereço do paciente: _____

Assinatura de testemunha: _____ data: _____

Assinatura do Pesquisador responsável

data:

Em caso de dúvidas, o (a) Senhor (a) poderá procurar :Fabiana Fulco. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE. AV. Profº Moraes Rego, S/N. Campus da UFPE. Recife/PE.

E-mail:fculco@hotmail.com

Telefone: 81 2101-2569

APÊNDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convidamos o (a) menor _____, após autorização dos responsáveis legais, para participar do projeto de pesquisa intitulado: “Desenvolvimento, avaliação e validação de um kit molecular baseado em PCR em tempo real com tecnologia nacional para o diagnóstico da tuberculose” que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é melhorar os exames de detecção da tuberculose doença/infecção (latente) para identificar e tratar mais rapidamente a doença.

- 1) Solicitamos a _____, responsável pelo menor convidado a participar do estudo, que autorize a sua participação uma vez que ele expresse por livre vontade que deseja participar do estudo.
- 2) O menor é livre para se recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que esteja recebendo ou que possa necessitar por causa dos procedimentos realizados para a pesquisa.
- 3) Caso o (a) menor tenha qualquer dúvida ou queira mais informações sobre os seus resultados, nós lhe forneceremos todas as informações e explicações.
- 4) Os exames que não estão descritos aqui, e que lhe serão pedidos pelo seu médico, não serão realizados para a pesquisa, e são para seu cuidado médico e tratamento. Qualquer procedimento médico será autorizado e realizado apenas pela equipe médica que está lhe acompanhando. A equipe do estudo não terá nenhuma participação na decisão de realizar qualquer tipo de exame ou tratamento.
- 5) O (A) menor poderá, em qualquer tempo, desistir de participar do estudo, devendo avisar a equipe de estudo.
- 6) Caso o (a) menor falte a alguma das coletas, mas ainda queira participar das coletas que faltam você poderá também avisar à equipe de estudo.
- 7) Todas as informações que permitam identificar seus resultados e seus dados serão mantidas confidenciais, com acesso apenas pela equipe de estudo. As amostras e dados registrados receberão um número específico para assegurar esse segredo. Os resultados serão divulgados na forma de publicações científicas, não permitindo a identificação individual dos participantes.
- 8) Qualquer teste que seja feito com suas amostras que dê resultados que possam ser úteis para seu acompanhamento e tratamento serão fornecidos a você e ao seu médico caso seja de seu interesse.

9) Estamos entregando ao menor e responsável uma cópia deste formulário para que possa lê-lo cuidadosamente. Estamos também lendo com você todas essas informações para que você tenha a oportunidade de tirar todas as dúvidas com a equipe do projeto, mas a qualquer momento você pode contatar a equipe e questionar e tirar dúvidas sobre o estudo.

10) A participação do(a) menor na pesquisa poderá causar riscos, como constrangimento nas abordagens, incômodo ou dor no braço para a coleta de sangue e/ou aplicação intradérmica do PPD. Para minimizar esses riscos, os dados obtidos durante a pesquisa serão mantidos em sigilo pelos pesquisadores, assegurando ao participante a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, de acordo com o regimento da resolução 466/12.

11) Solicitamos sua autorização e dos responsáveis para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) possa utilizar as informações obtidas em reuniões, congressos e publicações científicas (preservando a identidade do voluntário). E, para que possamos estocar as suas amostras biológicas, a fim de utilizá-las em estudo posterior. Neste caso, o (a) Senhor (a) será solicitado um novo consentimento, caso tenhamos que utilizar sua amostra em outra pesquisa.

Nome do menor

Nome do responsável _____

Assinatura do responsável _____

Data ___ / ___ / ___

Assinatura do paciente

Endereço do paciente

Assinatura de testemunha

data

Assinatura do pesquisador responsável

data

Assinatura do Pesquisador responsável

data:

Em caso de dúvidas, o (a) menor poderá procurar :Fabiana Fulco. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE. AV. Profº Moraes Rego, S/N. Campus da UFPE. Recife/PE.

E-mail:fcfulco@hotmail.com

Telefone: 81 2101-2569

APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO



Rev Soc Bras Med Trop 51(3): 331-337, May-June, 2018
doi: 10.1590/0037-8682-0372-2017

Major Article

Performance of the IS6110-TaqMan® assay in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis from different biological samples

Fabiana Cristina Fulco Santos^[1], Laís Ariane de Siqueira Lira^[1],
Rosana de Albuquerque Montenegro^[1], Juliana Figueirêdo da Costa Lima^[1],
Andrea Santos Lima^[1], Haiana Charifker Schindler^[1]
and Lillian Maria Lapa Montenegro^[1]

[1]. Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil.

Abstract

Introduction: This study evaluated the performance of the IS6110-TaqMan® assay in different types of biological samples and tissues for laboratory diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **Methods:** 143 biological samples and tissues from patients with suspected extrapulmonary tuberculosis from the health services of Recife/Pernambuco/Brazil were evaluated with the IS6110-TaqMan® assay. **Results:** The sensitivities of the IS6110-TaqMan® assay calculated for blood, urine, both blood and urine samples, tissue biopsies, extrapulmonary body fluid samples, and all samples from patients calculated together were 55.9%, 33.3%, 68.8%, 43.8%, 29.6%, and 73.7%, respectively, and the specificities were 80%, 100%, 78.6%, 100%, 100%, and 84.2%, respectively. **Conclusions:** The accuracy of qPCR was high in various clinical sample types. The analysis of more than one type of clinical sample collected from the same patient with extrapulmonary tuberculosis enhances the diagnostic power of the IS6110-TaqMan® assay when compared with the use of only one clinical sample.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex. IS6110-TaqMan® assay. Molecular diagnosis. Extrapulmonary tuberculosis.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a major public health problem of global importance, and it is the second leading cause of death worldwide, with 1.5 million people in 2014¹. The World Health Organization (WHO) states that 80% of TB cases worldwide are concentrated in 22 countries, among which Brazil is in the 16th position². In Brazil, 9,479 new cases of extrapulmonary TB occurred in 2014, with 562 cases in the State of Pernambuco alone³.

Although pulmonary TB is the most common manifestation of the disease, approximately one million people (~15% of the total) develop extrapulmonary TB. In Brazil, the most frequent clinical forms are pleural, ganglionic (lymph node), osteoarticular, and urogenital tuberculosis⁴.

Even though the detection of *Mycobacterium tuberculosis* at the initial phase of the disease is vital for effective treatment initiation, the effective diagnosis of extrapulmonary TB is

challenging. This condition occurs mainly in cases where the disease is associated with other disorders. The extrapulmonary infections caused by the *M. tuberculosis* complex are frequently paucibacillary (with a lower number of bacteria in biological specimens) compared to the pulmonary form^{5,6}. Besides, obtaining the patient's extrapulmonary sample often requires invasive procedures and hospitalization, making it difficult to collect additional samples^{6,7}.

Although classical signs and symptoms of TB facilitate diagnosis, extrapulmonary TB often manifests with symptoms that are nonspecific or related to the site of infection, rendering a confirmation of the disease diagnosis difficult. Therefore, complementary tools are of critical importance in diagnosing this form of the disease⁸. Conventional laboratory exams include the direct microscopic detection of acid-fast bacilli (AFB) by Ziehl-Nielsen staining and culture of clinical samples collected directly from the infection site, in the form of liquid and/or pleural biopsy, ganglion puncture, bone, urine, gastric wash, and others, in specific medium. The histopathological exam is also used for the detection of granulomatous lesions^{4,9}. The examination of *M. tuberculosis* by culture tests remains the gold standard test for diagnostic confirmation^{4,10}. However, the diagnostic sensitivity of conventional exams is compromised in paucibacillary patients, frequently resulting in a false negative outcome^{11,12}.

Corresponding author: Dr^a Lillian Maria Lapa Montenegro

e-mail: lilian@cpqam.fiocruz.br

Received 11 October 2017

Accepted 25 May 2018



Nowadays, the most promising technique for the rapid diagnosis of TB is based on the polymerase chain reaction (PCR) method¹³⁻¹⁶. Real-time PCR (qPCR) has an advantage over conventional PCR due to the ability to amplify and detect deoxyribonucleic acid (DNA) simultaneously through a fluorescence system. In addition, the quantification of nucleic acids is more precise and a highly reproducible using qPCR, as this method determines the values throughout the exponential phase of the reaction¹⁷. Studies have demonstrated the efficacy of qPCR in detecting mycobacterial DNA in biological specimens, including pulmonary and extrapulmonary tissues¹⁸⁻²⁰.

This study evaluated the performance of the IS6110-TaqMan[®] assay, sensitive and specific, in detecting DNA of the *M. tuberculosis* complex in different types of samples and biological tissues for laboratory diagnosis of extrapulmonary tuberculosis.

METHODS

Study population and setting

A prospective double-blind study was conducted with 57 patients of both sexes with suspected extrapulmonary TB in different clinical forms (pleural, cutaneous, bone, lymph node, miliary, meningoencephalitis, renal, intestinal, hepatic). These patients were sourced from public health services specialized in TB in the metropolitan region of Recife, State of Pernambuco, northeastern Brazil, between December 2010 and January 2012.

A combination of clinical, epidemiological, and laboratory criteria was used to define the diagnosis of extrapulmonary TB according to recommendations from the American Thoracic Society¹⁰.

Specimens analyzed

Blood and urine samples were collected from each patient, as well as a third sample (a biopsy of tissues or another extrapulmonary body fluid), depending on the suspected clinical form of extrapulmonary TB. A total of 143 clinical samples were collected from 57 patients with initial suspected extrapulmonary TB: 49 blood samples, 46 urine samples, 27 biopsies of tissues, and 21 other extrapulmonary body fluids such as pleural, ascites, cerebrospinal and synovial fluid.

All clinical samples were collected before the initiation of specific anti-tuberculosis treatment. Culturing was performed on all samples, except for blood, followed by DNA extraction and IS6110-TaqMan[®] assay.

Collection and laboratory processing of biological samples

Blood: 4.5ml of blood was collected by venipuncture using tubes (Vacutainer[®], Becton and Dickson, England) containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). After collection, blood was processed for the separation of its components [plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)] with Ficoll – Paque[™] PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) to minimize inhibitory effects on the IS6110-TaqMan[®] assay.

Urine: 10ml of morning samples were collected in a sterile tube on three consecutive days. Urine samples were initially decontaminated as per the Petroff protocol (NaOH 4%)²¹.

Biopsy (bone, lymph node, skin): fragments were collected from the infection site and stored in a 0.9% saline solution.

Extrapulmonary body fluids (cerebrospinal fluid, pleural, ascitic, and synovial fluids): 2-10ml were collected in a dry and sterile tube.

Culture: cultures were established on Löwenstein-Jensen solid medium and incubated at 37°C for 6-8 weeks in a level 3 biosafety laboratory. This protocol was followed for all biological samples except for blood. *Mycobacterium* species were identified based on the growth rate and colony morphology. Tests of selective inhibition with para-nitrobenzoic acid (PNB) and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH), niacin accumulation, and heat-stable catalase at 68°C were also performed²¹.

DNA extraction

DNA from clinical samples was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany), as per the manufacturer's instructions. The reference strain of *M. tuberculosis* (H37Rv)²² was grown on Löwenstein-Jensen (LJ) solid medium, and the genomic DNA was extracted and purified using a Genomic Prep[™] - Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), as per the manufacturer's instructions.

qPCR conditions

The PCR reactions were performed in real time using an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, California, USA) with TaqMan[®]-specific probes (and ROX as a passive reference), TAQM3 (5'-AGGCGAACCCCTGCCAG-3') and TAQM4 (5'-GATCGCTGATCCGGCCA-3') oligonucleotides, which amplify a target fragment of 122bp from IS6110²³. The cycling conditions followed the protocol described by Broccolo et al.²³. Milli-Q water negative controls were included in all amplification reactions. All assays were performed in duplicate. The reactions included 1µl of DNA primers (300nm each), 1µl of probe (200 nM), 12.5µl of a TaqMan[®] Universal PCR Master Mix kit, 9µl of the DNA template, and dd-water, for a final volume of 25µl.

Additionally, a qPCR assay targeting the housekeeping gene β-actin was performed. PCR reactions included 12.5µl TaqMan[®], 2.5µl of TaqMan[®] Endogenous Controls (Applied Biosystems, California, USA) (500nM probe and 300nM each primer) and 9µl of the DNA template plus Milli-Q water, for a final volume of 25µl. PCR conditions were: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s, and annealing and amplification at 60°C for 1 min²⁰.

Dilution curve with a reference strain of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) in urine and blood samples

Urine and blood samples were collected from one individual who was considered clinically *healthy*, in other words, without clinical manifestations, without a history of contact with a bacilliferous person, and negative on laboratory exams (urine culture and tuberculin test). To one aliquot of these samples, the reference strain of *M. tuberculosis* (H37Rv) was added to a final

concentration of 1 on the McFarland standard scale, then serial 10-fold dilutions were performed to achieve concentrations ranging from 3×10^7 to 3×10^{10} bacilli/ml. The minimum detection sensitivity of the assay was 15fg of DNA for both samples, corresponding to 3 bacilli/ml. This limit was defined by the amplification of the lowest dilution of the target DNA over the formation of primer dimers (the negative control of the reaction). To evaluate the positivity of biological samples, the threshold value of amplification (C_t) was established for positive and negative cases. The resulting C_t was 25 (25-33) and 34 (34-38) for the positive and negative tests, respectively (data not shown).

Statistical analysis

Culture and/or clinical responses to specific treatments were primarily considered the *gold standard* for performance calculations. The IS6110-TaqMan® assay was also evaluated considering the results of the cultured samples as a gold standard (except for blood, for which no culturing was done). For the IS6110-TaqMan® assay, the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were calculated, with a 95% confidence interval (CI) identified for each parameter. The database was constructed using Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS) statistical software for Windows (Version 18, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) which was also used to conduct statistical analyses, including cross tables and frequency calculations. For accuracy tests, the authors used the free software OpenEpi (Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 3.01. Update 2013, available online at: www.OpenEpi.com).

For the blood samples, the IS6110-TaqMan® assay was positive when at least one blood phase, PBMC and/or plasma, was positive; negative results were obtained when both were negative²⁴. The performance of the IS6110-TaqMan® assay was calculated in parallel for both blood phases.

In blood and urine samples, the performance of the IS6110-TaqMan® assay was calculated alone and in parallel (blood and/or urine positive or both negative).

The performance of the IS6110-TaqMan® assay was calculated for the combination of all biological sample types (blood and/or urine and/or biopsy or extrapulmonary liquid) from the same patient. In this case, a positive IS6110-TaqMan® assay was observed when at least one clinical sample had a positive result. Results were negative when all the patient's biological samples were negative.

Ethical considerations

This research was approved by the Ethics Committee of the *Aggeu Magalhães* Institute/FIOCRUZ (IAM/FIOCRUZ).

RESULTS

Clinical, epidemiological and laboratory findings

Out of the 57 participating patients with suspected extrapulmonary TB, 38 (66.7%) had their final diagnosis defined as extrapulmonary TB (G1), and 19 (33.3%) patients were classified as non-TB (G2) with another kind of disease (different from TB) and

were considered a control group. Clinical forms of TB registered in the study are described in Table 1. Additionally, in the control group, the following diagnoses were observed: lymphoma, bone cancer, sarcoidosis, and bacterial meningitis.

From the total number of patients included in the study, 32 (56.1%) were male. The age ranged from 1 to 89 years old, with an average of 34 years old. The majority (75%) of tested samples were negative for *M. tuberculosis* in culture.

Performance of the IS6110-TaqMan® assay in various clinical samples in patients with and without extrapulmonary TB

The sensitivity, specificity, and positive/negative predictive values of the IS6110-TaqMan® assay on blood, urine, biopsy samples, and other body fluids, analyzed alone or in parallel, are described in Table 2.

Considering the results of the cultured samples as a gold standard, the performance of TaqMan® ranged between 18-34% (sensitivity) and 75-100% (specificity). For urine samples, the sensitivity was 18.2% (CI = 4.6-41.0), and the specificity was 75% (CI = 60.9-81.9). For biopsy tissues, these values were 34% (CI = 9.5-57.2) and 88.2% (CI = 65.7-96.7), respectively, and for extrapulmonary body fluids, 33.3% (CI = 9.7-70) and 100% (CI = 78.5-100.0), respectively.

Considering all clinical samples from the same patients calculated in parallel, the sensitivity of the TaqMan® assay compared with culturing was 64.3% (CI = 39.2-89.4), and the specificity was 51% (CI = 36.2-66.1). These results are detailed in Table 3.

TABLE 1: Clinical forms of extrapulmonary tuberculosis.

Clinical Form	Frequency	Percentage (%)
Pleural	14	36.8
Peripheral lymph node	5	13.2
Meningoencephalitis	2	5.3
Bone	8	21.1
Cutaneous	3	7.9
Renal	1	2.6
Intestinal	2	5.3
Hepatic	1	2.6
Miliary	2	5.3
Total	38	100.0

DISCUSSION

The development of sensitive and specific tools for the diagnosis of tuberculosis, mainly for paucibacillary forms such as extrapulmonary TB, remains a great challenge²⁵. The reasons include the difficulty in accessing most lesions and the

TABLE 2: Performance of the IS6110-TaqMan® assay in clinical sample between patients with extrapulmonary TB (G1) and No TB group (G2), using culture and/or clinical diagnosis with the therapeutic response as gold-standard.

Clinical samples	Patients (n)		IS6110-TaqMan® assay			
	G1	G2	Sensitivity	Specificity	Predictive value	
					positive	negative
Blood	34	15	55.9% (19/34) CI = 39.4–71.1	80% (12/15) CI = 54.8–93.0	86.4% (19/22) CI = 66.7–95.3	44.4% (12/27) CI = 27.6–62.7
Urine	33	13	33.3% (11/33) CI = 19.8–50.4	100% (13/13) CI = 77.2–100.0	100% (11/11) CI = 74.1–100.0	37.1% (13/35) CI = 23.2–53.7
Blood + urine	32	14	68.8% (22/32) CI = 51.4–82.1	78.6% (11/14) CI = 52.4–92.4	88% (22/25) CI = 70–95.8	52.4% (11/21) CI = 59.8–85.8
Biopsy	16	11	43.8% (7/16) CI = 23.1–66.8	100% (11/11) CI = 74.1–100.0	100% (7/7) CI = 64.6–100.0	55% (11/20) CI = 34.2–74.2
Other extrapulmonary body fluids	15	7	29.6% (6/15) CI = 13.8–50.0	100% (7/7) CI = 64.6–100.0	100% (6/6) CI = 61–100.0	31.8% (7/16) CI = 16.4–52.7

TB: tuberculosis; G1 (Group 1): patients with extrapulmonary TB; G2 (Group 2): patients without TB (with a diagnosis other than TB); CI: confidence interval.

TABLE 3: Accuracy of the IS6110 TaqMan® assay in all biological sample types, analyzed together, per patient.

IS6110 TaqMan® assay	Patient group		Accuracy
	Extrapulmonary TB	Non TB	
	Positive	28	3
Negative	10	16	Specificity = 84.2% (CI = 62.4–94.5)
Total	38	19	Positive predictive value = 90.3% (CI = 75.1–96.7)
			Negative predictive value = 61.5% (CI = 42.5–77.6)

TB: tuberculosis; CI: confidence interval.

fact that these are commonly patients with a low circulating bacterial load. In these cases, conventional exams of AFB and culture – the latter being considered a gold standard, usually yield negative results. In extrapulmonary TB, only one quarter of the cases can be diagnosed by bacteriological confirmation²⁶.

From the 34 blood samples of patients with extrapulmonary TB, 15 were negative in the IS6110-TaqMan® assay. These false negative results might be related to the small quantities of targeted DNA present on the clinical samples or even the presence of PCR inhibitors^{27,28}. On the other hand, three blood samples were positive in the IS6110-TaqMan® assay, but these patients were finally diagnosed as *non-TB*, so the molecular results were false positives. Therefore, it is possible that qPCR may detect the

presence of native genetic material from dead or latent organisms, generating discordant results with the gold standard used in the study. A study performed by Lima et al.²⁹ analyzed blood samples from patients under 15 years of age with extrapulmonary TB with nested PCR and showed similar results to the present study.

Among the 33 urine samples from patients with extrapulmonary TB, 22 were negative in the IS6110-TaqMan® assay. These false negative results were probably due to the presence of components such as salts, enzymes, and other bacteria, which can compromise the purification process of DNA and therefore inhibit the amplification reaction in urine¹⁵. In this study, there were no false positive urine results from the IS6110-TaqMan® assay.

When the IS6110-TaqMan® assay for urine samples was compared with two different gold-standard criteria (1: culture and/or response to antitubercular therapy; 2: culture alone), the sensitivity increased by 15.1% when compared to the gold standard 1. These findings reinforce the limitation of culturing in cases of patients with paucibacillary forms^{30,31}. Studies show variability in positive results of the culture test (1.2% to 80%) in a range of clinical samples and biological tissues^{12,15,24}.

Most biological samples analyzed in this study were blood and urine (66.4%), which are considered samples from ambulatory collection and represent a less invasive procedure for the patient. When blood and urine samples were evaluated in combination, the sensitivity of the molecular test (68.8%) increased by approximately 20% when compared with the results of the tests performed alone (55.9% and 33.3%, respectively).

Studies have shown that, despite the low sensitivity of molecular methods on urine samples, when these samples were analyzed in combination with blood samples, the sensitivity was increased by around 8-10%^{16,32}. Lima et al.¹⁶ evaluated a molecular diagnostic test for extrapulmonary TB in blood and urine samples. The sensitivity of the assay using combined samples (calculated in parallel) was 71.9%, but when using only urine samples, the sensitivity was 40.6%.

Rebollo et al.³² evaluated blood and urine samples from patients diagnosed with TB using a simple PCR system, with the positive culture for each sample as the gold standard, and found a lower (42%) sensitivity. Despite their use of a conventional PCR system less sensitive than the IS6110-TaqMan® assay, the authors highlight the importance of using more than one type of sample from each patient with suspected TB, as this approach can increase the sensitivity. Cruz et al.¹¹, when evaluating the usefulness of a nested-PCR method on samples of blood and urine of patients suspected to have extrapulmonary tuberculosis, also using IS6110 as target, found a sensitivity of 47.8% and 52% for blood and urine, respectively.

In this study, the sensitivity and specificity of the IS6110-TaqMan® assay in extrapulmonary body fluid samples were 28.6% and 100%, respectively. Since the number of bacilli is lower in various extrapulmonary body fluids, it is known that false negative results arise mainly from the paucibacillary nature or even from the irregular distribution of bacilli in body fluids³³, likely explaining the low sensitivity found in this study. Rosso et al.³⁴ evaluated pleural fluid samples with the IS6110-TaqMan® assay and obtained a better sensitivity (40%), probably because of the greater number of patients included in their study. Other research has also demonstrated a better performance of molecular tests in body fluids as compared with this study^{13,35-37}.

We also evaluated the performance of the IS6110-TaqMan® assay in tissue samples. The sensitivity and specificity in this context were 43.8% and 100%, respectively. Out of the 16 tissue samples in group G1, the IS6110-TaqMan® assay was not able to detect *Mycobacterium tuberculosis* in 9 samples; these results were considered false negatives. Possible causes were the quality and/or quantity of collected material, the presence of few bacilli on biopsied tissue, and collection outside the site

of infection, as well as the inhibitors present in the sample. No false positive results were found, showing that this test may aid in the confirmation of the disease.

Sun et al.³⁵ evaluated the performance of qPCR on 90 kidney biopsies and found a higher sensitivity than this study (83.3%), probably due to the inclusion of 30 patients with renal TB. Another work, which evaluated pleural fragments by qPCR using the same molecular target and extraction method, yielded similar results to this research (a sensitivity of 52.8% and specificity of 93.3%)³⁴. In agreement with our study, Meghdadi et al.³⁸, using PCR targeting IS6110, demonstrated a sensitivity and specificity of 48.6% and 100%, respectively.

In the different sample types evaluated, culture results demonstrated inferior performance in defining the final diagnosis of patients when compared with the gold standard 1. These results show the limitation of culture tests in the diagnosis of paucibacillary forms of TB, such as the extrapulmonary TB.

The main aim of this study was to evaluate the performance of detection of the IS6110 DNA sequence of *M. tuberculosis* by qPCR in the laboratory diagnosis of extrapulmonary TB. Determination of sensitivity values for qPCR on each type of clinical sample yielded values ranging from 26.7% (in "other extrapulmonary body fluids") to 55.9% (in blood samples), when analyzed alone. However, when the sensitivity of the IS6110-TaqMan® assay was evaluated considering the combination of all clinical samples from a patient, it increased to 73.7%. A decrease in specificity (84.2%) was observed, however, compared to the analysis of clinical samples individually, particularly blood samples.

In regions where TB is endemic, negative results from the IS6110-TaqMan® assay must not be interpreted as excluding the possibility of the disease. We observed that the positive predictive values obtained were equal to or higher than 86% in all analyses, reinforcing the confirmatory power of the assay in the detection of *M. tuberculosis* in patients with suspected extrapulmonary TB, despite the small sample sizes. However, the predictive values for the various tests analyzed (Table 2 and Table 3) cannot be inferred for the general population. These values are not comparable because the prevalence of TB is not the same in all situations.

Our results demonstrate the importance of investigating more than one type of clinical sample collected from the same patient with suspected extrapulmonary tuberculosis, which might improve the predictive power of the IS6110-TaqMan assay®.

The IS6110-TaqMan® assay can be an important tool to facilitate the laboratory diagnosis of extrapulmonary TB, mainly in the most severe cases of the disease, to initiate specific therapy. However, more research is needed to clarify the value of this new technique as a diagnostic test in the clinical setting.

Acknowledgements

We thank the staff of the Immunoepidemiology Laboratory and the professionals involved.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial support

This study was funded by *Programa de Excelência em Pesquisa/Clinical Research* (Grant number: 402058/2012-7), Research Program for the Single Health Service: Shared Health Management 2012 – Pernambuco and *Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz*.

REFERENCES

- Gulland A. Tuberculosis killed 1.5 million people in 2014. *BMJ*. 2015;351:h5798.
- World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2016. Geneva: WHO; 2016. 214p. Available from: http://www.who.int/publications/global_report/en/
- Ministério da Saúde (MS). Sistema de Informação de Agravos de Notificação. (SINAN). Brasília: MS; 2014. Acessado em 12 de abril de 2016. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/tuberculose/bases/tuberbrnet.def>.
- Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília: MS; 2011. 284p.
- Marouane C, Smaoui S, Kammoun S, Slim L, Messadi-Akrout F. Evaluation of molecular detection of extrapulmonary tuberculosis and resistance to rifampicin with GeneXpert®/MTB/RIF. *Med Mal Infect*. 2016;46(1):20-4.
- Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology*. 2010;15(2):220-40.
- Hillemann D, Rüsche-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by automated GeneXpert®/MTB/RIF system. *J Clin Microbiol*. 2011;49(4):1202-5.
- Bento J, Silva AS, Rodrigues F, Duarte R. Diagnostic tools in tuberculosis. *Acta Med Port*. 2011;24(1):145-54.
- McGrath EE, Anderson PB. Diagnostic tests for tuberculous pleural effusion. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(10):1187-93.
- Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. *Clin Infect Dis*. 2017;64(2):111-5.
- Lawn SD, Zumla AI. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis using the Xpert®/MTB/RIF assay. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(6):631-5.
- Furini AAC, Pedro HSP, Rodrigues JF, Montenegro LML, Machado RLD, Franco C, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by nested polymerase chain reaction in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Bras Pneumol*. 2013;39(6):711-8.
- Amin I, Muhammad I, Awan Z, Shahid M, Afzal S, Hussain A. PCR could be a method of choice for identification of both pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *BMC Res Notes*. 2011;4:332.
- Maurya AK, Kant S, Nag VL, Kushwaha RA, Kumar M, Dhole TN. Comparative evaluation of IS6110 PCR via conventional methods in rapid diagnosis of new and previously treated cases of extrapulmonary tuberculosis. *Tuberk Toraks*. 2011;59(3):213-20.
- Cruz HL, Montenegro RA, Lima JF, Poroca DR, Lima JF, Montenegro LM, et al. Evaluation of a nested-PCR for *Mycobacterium tuberculosis* detection in blood and urine samples. *Braz J Microbiol*. 2011;42(1):321-9.
- Lima JFC, Guedes GMR, Lima JFA, Lira LAS, Santos FCF, Arruda ME, et al. Single-tube nested PCR assay with in-house DNA extraction for *Mycobacterium tuberculosis* detection in blood and urine. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):731-8.
- Novais CM, Pires-Alves M, Silva FF. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. *Biotecnologia*. 2004;33:10-3.
- Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaître N. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1772-6.
- Yang YC, Lu PL, Huang SC, Jenh YS, Jou R, Chang TC. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 2011;49(3):797-801.
- Lira LAS, Santos FCF, Carvalho MSZ, Montenegro RA, Lima JFC, Schindler HC, et al. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples of patients with pulmonary TB. *J Appl Microbiol*. 2013;114(4):1103-8.
- Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobacterioses. Brasília: MS; 2008. 406p.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44.
- Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, Zingale A, Brambilla AM, Cichero P, et al. Rapid diagnosis of Mycobacterial infections and quantification of *Mycobacterium tuberculosis* load by two Real time calibrated PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2003;41(10):4565-72.
- Wu SH, Ho CM, Lu JJ. Diagnosis of tuberculosis by PCR-based amplification of mpt64 gene from peripheral blood. *Int J Bio Lab Sci*. 2013;2(1):25-30.
- Purohit M, Mustafa T. Laboratory diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis (EPTB) in resource-constrained setting: state of the art, challenges and the need. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(4):EE01-6.
- Lee JY. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis*. 2015;78(2):47-55.
- Al-Soud WA, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):485-93.
- Valentine-Thon E. Quality control in nucleic acid testing-where do we stand? *J Clin Virol*. 2002;25(3):13-21.
- Lima JF, Montenegro LM, Montenegro RA, Cabral MM, Lima AS, Abath FG, et al. Performance of nested PCR in the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of pediatric patients. *J Bras Pneumol*. 2009;35(7):690-7.
- Pai M, Ling DI. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis using nucleic acid amplification tests: What is the evidence? *Future Microbiol*. 2008;3(1):1-4.
- Ajantha GS, Shetty PC, Kulkarni RD, Biradar U. PCR as a diagnostic tool for extra-pulmonary tuberculosis. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(6):1012-5.
- Rebollo MJ, San Juan Garrido R, Folgueira D, Palenque E, Diaz-Pedroche C, Lumbreras C. Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;56(2):141-6.

33. Green C, Huggett JF, Talbot E, Mwaba P, Reither K, Zumla AI. Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification methods. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(8):505-11.
34. Rosso F, Michelon CT, Sperhake RD, Verza M, Olival L, Conde MB, et al. Evaluation of real-time PCR of patient pleural effusion for diagnosis of tuberculosis. *BMC Res Notes.* 2011;4:279.
35. Sun L, Yuan Q, Feng JM, Yang CM, Yao L, Fan QL et al. Rapid diagnosis in early stage renal tuberculosis by real-time polymerase chain reaction on renal biopsy specimens. *Int J Tuber Lung Dis.* 2010;14(3):341-6.
36. Mehta PK, Raj A, Singh N, Khuller GK. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;66(1):20-36.
37. Khosravi AD, Alami A, Meghdadi H, Hosseini AA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens of patients suspected of having extrapulmonary tuberculosis by application of nested PCR on five different genes. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:3. doi: 10.3389/fcimb.2017.00003.
38. Meghdadi H, Khosravi AD, Ghadiri AA, Sina AH, Alami A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in extrapulmonary biopsy samples using PCR targeting IS6110, *rpoB*, and nested-*rpoB* PCR cloning. *Front Microbiol.* 2015;6:675.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



CENTRO DE PESQUISAS
AGGEU MAGALHÃES/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento, avaliação e validação de um kit molecular baseado em PCR em tempo real com tecnologia nacional para o diagnóstico da tuberculose

Pesquisador: Haiana Charifker Schindler

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45739715.7.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz [inativa]

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.489.477

Apresentação do Projeto:

O presente estudo irá avaliar o desempenho da qPCR com insumos nacionais em comparação com os importados. A partir desta análise, pretende-se padronizar, avaliar e validar um protótipo da qPCR com tecnologia nacional para ser utilizado nos serviços de referência da Rede SUS após a análise de custo-efetividade. O estudo será desenvolvido no Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ. Os indivíduos serão provenientes dos principais Serviços de Referência para Tuberculose do SUS. Os participantes da pesquisa serão indivíduos com suspeita de TB (pulmonar e extrapulmonar), acompanhados prospectivamente e de maneira duplo-cega. O diagnóstico final e a forma clínica da doença serão definidos pelo médico assistente do serviço de saúde sem qualquer interferência dos testes moleculares. Os pacientes serão alocados em 4 grupos de acordo com os critérios clínico-epidemiológicos e laboratoriais: Grupo TB doença (pulmonar e extrapulmonar, Grupo com TB provável (pulmonar e extrapulmonar; Grupo sem TB (controle negativo) 1: Pacientes sem TB saudáveis; Grupo sem TB (controle negativo) 2: Pacientes sem TB que procuraram o serviço de saúde por outra doença, com quadro clínico e laboratorial não compatível com a TB e epidemiologia negativa para TB. De todos os pacientes serão coletados 3 amostras de urina e uma amostra de sangue. Dependendo da forma clínica da tuberculose, poderá ser necessária a inclusão

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



CENTRO DE PESQUISAS
AGGEU MAGALHÃES/



Continuação do Parecer: 1.489.477

de um terceiro tipo de amostra biológica (escarro, biópsia, LCR, entre outras).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo

- Finalizar a validação do teste baseado em PCR em tempo real in house (qPCR) para o diagnóstico da tuberculose em pacientes atendidos na rede SUS de Pernambuco;
- Estabelecer parceria com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná/Instituto de Tecnologia do Paraná (IBMP/TECPAR) para produção dos insumos nacionais a serem utilizados na qPCR nacional;
- Avaliar o uso dos reagentes nacionais e importados no desempenho do teste molecular;
- Analisar a possibilidade de substituição dos reagentes importados por nacionais para a elaboração de um kit de qPCR para detecção de M. tuberculosis em amostras clínicas de escarro, sangue e urina;
- Avaliar a acurácia do protótipo molecular em pacientes com dificuldade diagnóstica portadores de formas paucibacilares da doença (TB infantil, TB pulmonar com baciloscopia negativa, TB extrapulmonar e TB/HIV);
- Validar o protótipo da qPCR em multicêntricos e determinar a reprodutibilidade e estabilidade do mesmo;
- Estabelecer o custo x efetividade do kit de qPCR nacional com a da qPCR usando insumos importados e com o teste molecular rápido GeneXpert Mtb/RIF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A não aceitação dos pacientes em aceitar a participação no projeto; o incômodo causado pela perfuração no ato da coleta de sangue.

Benefícios:

- Produção de um kit de qPCR com insumos nacionais de menor custo-efetividade em relação a outros testes moleculares existentes no comércio e
- obtenção de parceria com o IBMP/TECPAR para propor uma solução inovadora para o diagnóstico da tuberculose em serviços do SUS;
- Implementação de uma ferramenta molecular nacional e de baixo custo que possa auxiliar o diagnóstico clínico dos casos difíceis de elucidação pelos exames bacteriológicos de rotina, sobretudo em pacientes vulneráveis;
- Evidências em termos de custos, efetividade e impacto econômico de uma estratégia inovadora no diagnóstico da tuberculose para o serviço de saúde/SUS;

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetico@cpqam.fiocruz.br



CENTRO DE PESQUISAS
AGGEU MAGALHÃES/



Continuação do Parecer: 1.489.477

- Detecção de casos e início de tratamento tuberculostático mais precocemente, com consequente diminuição dos casos de resistência, do tempo de transmissão da doença e do número de pessoas infectadas pelo indivíduo doente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto relevante que fará um estudo transversal e prospectivo do teste diagnóstico para tuberculose na fase II-III da classificação de SACKETT e HAYNES (2002), com produção de um kit de qPCR com insumos nacionais. O estudo favorecerá uma articulação entre pesquisadores, profissionais de saúde e sociedade civil, possibilitando um aumento da sensibilização, captação e diagnóstico, sobretudo de casos omissos e de contatos domiciliares e peridomiciliares dos pacientes com tuberculose ativa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proponente do projeto acatou todas as sugestões e solicitações feitas pelo comitê na última análise do CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está apto para sua execução.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	26/02/2016		Aceito

Endereço: Av. Prof. Moraes Rago, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



CENTRO DE PESQUISAS
AGGEU MAGALHÃES/



Continuação do Parecer: 1.486.677

Básicas do Projeto	U.T.O. 927882.pdf	14:10:32		Aceito
Folha de Rosto	FolhadorRosto.pdf	26/02/2016 14:10:13	Haiana Charifker Schindler	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	NovoProjetoPesquisaCEP.pdf	26/02/2016 14:09:29	Haiana Charifker Schindler	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Agência	NovoTALLGrupoMenor18anos.pdf	26/02/2016 14:08:50	Haiana Charifker Schindler	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Agência	NovoTCEGrupoMaior18anos.pdf	26/02/2016 14:08:30	Haiana Charifker Schindler	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAnuenciaSecretariaES.pdf	26/02/2016 14:08:10	Haiana Charifker Schindler	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAnuencialBMP.pdf	26/02/2016 14:07:56	Haiana Charifker Schindler	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAnuenciaBaraoLucena.pdf	26/02/2016 14:07:40	Haiana Charifker Schindler	Aceito
Outros	CartaRespostaCEP.pdf	26/02/2016 14:07:25	Haiana Charifker Schindler	Aceito

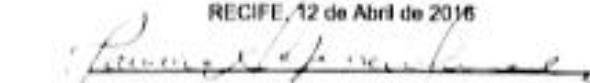
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 12 de Abril de 2016


Assinado por:
Janelina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 51.070-420

UF: PE Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: conep@cep.gov.br