



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Mestrado em Saúde Pública



DANIELE SILVA DE MORAES VAN-LUME

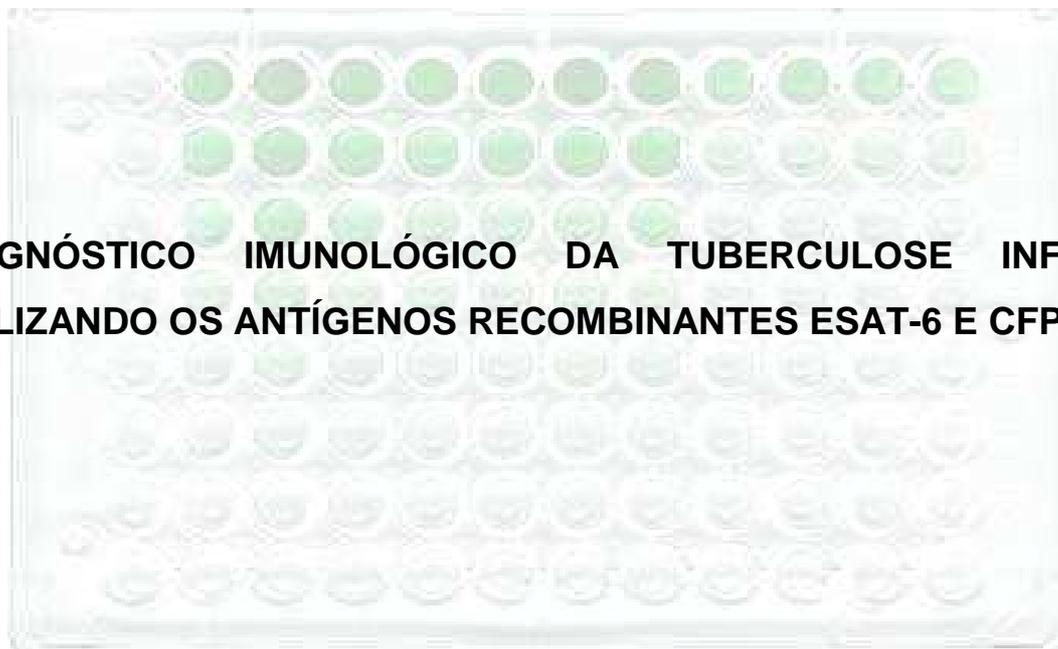
---

**DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA TUBERCULOSE  
INFANTIL UTILIZANDO OS ANTÍGENOS  
RECOMBINANTES ESAT-6 E CFP-10.**

---

RECIFE  
2008

**Daniele Silva de Moraes Van-Lume**



**DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA TUBERCULOSE INFANTIL  
UTILIZANDO OS ANTÍGENOS RECOMBINANTES ESAT-6 E CFP-10.**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientadores:**

Silvia Maria Lucena Montenegro

Frederico Guilherme Coutinho Abath (*in memoriam*)

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

V261d Van-Lume , Daniele Silva de Moraes.  
**Diagnóstico imunológico da tuberculose infantil utilizando os antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10 / Daniele Silva de Moraes Van-Lume. — Recife: D. S. M. Van-Lume, 2008.**  
102 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado em saúde pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

Orientadora: Silvia Maria Lucena Montenegro.

Co-orientador: Frederico Guilherme Coutinho Abath.

1. Tuberculose infantil - diagnóstico. 2. Tuberculose infantil - imunologia. 3. Antígenos de bactérias – imunologia. 4. Mycobacterium tuberculosis. – imunologia. 5. Interferon tipo II – sangue. 6. ELISA. 7. Sensibilidade e especificidade. I. Montenegro, Silvia Maria Lucena. II. Abath, Frederico Guilherme Coutinho. II. Título.

---

CDU 616-002.5

**Daniele Silva de Moraes Van-Lume**

**DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA TUBERCULOSE INFANTIL  
UTILIZANDO OS ANTÍGENOS RECOMBINANTES ESAT-6 E CFP-10.**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Banca Examinadora**

---

Dr<sup>a</sup> Silvia Maria Lucena Montenegro  
(Orientadora) CPqAM/FIOCRUZ

---

Dr<sup>a</sup> Yara de Miranda Gomes  
(Titular – Departamento de Imunologia – CPqAM/FIOCRUZ)

---

Dr. José Cândido Ferraz  
(Titular – UFPE).

---

Dr<sup>a</sup> Haiana Charifker Schindler  
(Suplente – Departamento de Imunologia – CPqAM/FIOCRUZ)

---

Dr. Luciano Montenegro  
(Suplente – Departamento de Patologia – UFPE)

Dedico ao meu pai Lourival por ter me proporcionado acesso aos estudos, à educação e ao meu sonho.

A minha mãe Nadja por ter cuidado de mim durante esses 25 anos.

A minha orientadora Silvia, por todos esses anos de amizade e profissionalismo.

Frederico Guilherme Coutinho Abath  
*(in memoriam)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

A Dr<sup>a</sup> Silvia Montenegro, minha orientadora, não só pelo exemplo de vida profissional e de ética, mas também pela paciência, dedicação, confiança, carinho e, sobretudo, pelo apoio nos momentos mais difíceis. Isso chama-se amizade.

Ao Dr. Frederico Abath (*in memoriam*) por seu incentivo, perspicácia, profissionalismo e apoio, durante a elaboração do projeto.

Ao meu pai Lourival pela dedicação, incentivo, cuidado, apoio e amor. Por ter me educado e ter proporcionado condições para que eu alcançasse meus objetivos, acreditasse nos meus sonhos e nunca desistisse.

A minha mãe Nadja pelo amor, cuidado e dedicação durante toda minha vida.

A Dr<sup>a</sup> Haiana e toda sua equipe: Victor Melo, Bruno Canto, Juliana Lima, Haiana Azevedo, Joanna D'Arc, Rosana Montenegro e especialmente Lílian Montenegro, pela colaboração fundamental, disponibilidade, amizade e carinho.

Ao Dr. Joakim Rego e a Dr<sup>a</sup> Marta Maciel pela seleção dos pacientes, pela amizade, colaboração e seriedade imprescindíveis na realização desse estudo.

Às equipes dos hospitais IMIP e HC pelo profissionalismo e colaboração.

Aos doutores Cândido Ferraz, Yara Gomes, Luciano Montenegro, Maria Helena Saad e Valdir Balbino pela disponibilidade e amizade.

Ao Dr. Roberto Werkhauser pelas palavras de amizade, compreensão, ajuda e pela torcida para que tudo desse certo.

A Wlademir, pela colaboração e amizade durante os procedimentos laboratoriais.

Aos meus amigos Clarice, Joelma, Andréa Moraes, Roni, Eduardo Henrique, Sheilla, Fábio, Myllena, Virgínia, Simone e todos os que compõem o departamento de Imunologia do CPqAM, o meu muito obrigada por cada palavra de consolo, de apoio e incentivo e também pelo carinho.

Aos funcionários da biblioteca do CPqAM, em especial Mégine e Adalgilson, pelo apoio e colaboração.

Às minhas queridas amigas Dyana Siqueira, Heloísa Bezerra, Dayse Tavares e Lílian Beck pelo amor, pela amizade e por entender todas as vezes que eu estive ausente devido ao trabalho. Agradeço pelas palavras de força, por terem me botado pra cima quando precisei e por acreditarem que eu seria capaz.

Aos meus colegas da turma do mestrado por compartilharem essa etapa vencida comigo, em especial Fabiana e Andréia, pela ajuda, torcida e principalmente pelas horas que passamos juntas estudando, durante a seleção do mestrado, para alcançarmos nossos sonhos, com muita lealdade, amizade e ajuda mútua.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente participaram da realização desse trabalho.

“Eu não sou jovem o suficiente para saber tudo.”

Oscar Wilde

---

VAN-LUME, Daniele Silva de Moraes. **Diagnóstico imunológico da tuberculose infantil utilizando os antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10**. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

---

## RESUMO

O diagnóstico da tuberculose (TB) se baseia em dados clínicos e epidemiológicos associados aos métodos laboratoriais (baciloscopia, cultura de materiais biológicos e TTI – Teste Tuberculínico Intradérmico) e radiografia de tórax. Em crianças, por serem paucibacilares e muitas vezes apresentarem reações cruzadas ao TST, devido à vacinação recente com BCG e à exposição à micobactérias ambientais, existem dificuldades maiores para obter esse diagnóstico. Diante disso, métodos imunológicos têm sido propostos. Dentre eles, destacam-se os baseados em antígenos recombinantes específicos do complexo *M. tuberculosis*: o ESAT-6 (*early secretory antigen target 6*) e o CFP-10 (*culture filtrate protein 10*), que são potentes indutores de IFN- $\gamma$ . Baseado nisso, o nosso estudo teve como objetivos: avaliar os níveis de IFN- $\gamma$ , produzidos por células sanguíneas induzidos por ESAT-6, CFP-10 e PPD *in vitro*, através de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), em pacientes pediátricos e determinar a sensibilidade e a especificidade dos ensaios definindo qual o teste mais apropriado para o diagnóstico. Foram selecionadas, no Hospital das Clínicas e no Instituto Professor Fernando Figueira-PE, crianças com idade de 3 a 15 anos, de ambos os sexos, e de acordo com os fatores de inclusão foram distribuídas em grupos de TB doença (n = 21) e TB latente (n = 17). O grupo controle negativo (n=21) foi formado por crianças com ausência de sinais e sintomas de TB e sem história de contato com adulto bacilífero. Os níveis de IFN- $\gamma$  contra os antígenos ESAT-6, CFP-10 e PPD *in vitro* foram quantificados e a curva ROC (*receiving operating characteristics*) foi utilizada para avaliar a capacidade desses antígenos de diagnosticar TB infantil (latente e/ou doença). O único antígeno que demonstrou essa capacidade foi o ESAT-6 ( $P < 0,05$ ), tanto para TB latente (AAC = 0,731), para TB doença (AAC = 0,780) e TB (latente e doença; AAC = 0,758). Esses dados sugerem que o ESAT-6 pode ser útil no imunodiagnóstico da TB infantil na fase inicial (latente) ou ativa da doença devido à boa sensibilidade e alta especificidade, quando associado aos dados clínicos e epidemiológicos, permitindo o tratamento precoce e evitando a evolução da doença para as formas mais graves.

Palavras Chave: Tuberculose infantil, diagnóstico imunológico, ESAT-6, CFP-10, PPD *in vitro*.

---

VAN-LUME, Daniele Silva de Moraes. **Immunological diagnosis of tuberculosis in children based on the recombinants antigens ESAT-6 and CFP-10**. 2008. Dissertation (Master of Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

---

### ABSTRACT

The diagnosis of tuberculosis (TB) infection is based on clinical and epidemiological data and chest radiography associated with laboratory methods (baciloscopia, culture of *Mycobacterium tuberculosis* and TST - Tuberculin Skin Test). The diagnosis of childhood tuberculosis is complicated because children usually have paucibacillary infection, recent exposure to BCG vaccination and prior exposure to environmental mycobacteria, which commonly cross-reacts with PPD (Purified Protein Derivate) antigen used in TST. For this reason, early diagnosis of TB is crucial to prevent the spread of this disease and improved methods are urgently required. A whole blood assay has recently been developed to quantitatively measure interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) production by lymphocytes specific to the TB antigens, ESAT-6 and CFP-10. The present study investigated the diagnostic potential by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) of these two antigens compared to PPD *in vitro*, in latent TB or active disease in children. Children with 3 to 15 years old, from both genders, with latent TB (n = 17) or TB disease (n = 21), from the Hospital das Clínicas and Instituto Professor Fernando Figueira-PE, were eligible for inclusion. The negative control group (n = 21) was composed of children without signs and symptoms of TB infection and without any previous contact with adult TB infection. IFN- $\gamma$  levels against ESAT-6, CFP-10 and PPD *in vitro* were quantified and the ROC curve (receiving operating characteristics) was used to evaluate the potential of these antigens to diagnose TB in children. ESAT-6 (P < 0.05) was the only specific TB antigen showing a significant degree of discrimination between the latent TB (AAC = 0,731), active TB (AAC = 0,780) or TB (latent and active; AAC = 0,758) and the negative control group, respectively. The ESAT-6 was found to be more sensitive and more specific than the others antigens, and in association with clinical and epidemiological data, it can be a useful immunodiagnostic tool for the diagnosis of latent TB or active TB in children.

Key words: Tuberculosis in children, Immunodiagnosis, ESAT-6, CFP-10, PPD *in vitro*.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Novos casos de tuberculose registrados no mundo durante o ano de 2005, de acordo com a OMS.	17
<b>Figura 2</b> Características do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	20
<b>Figura 3</b> Modelo epidemiológico da história natural da tuberculose.	21
<b>Figura 4</b> Esquema identificando a região responsável pela codificação dos antígenos ESAT-6 e CFP-10 no genoma do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , a qual encontra-se deletada no genoma do <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. avium</i> .	31
<b>Figura 5</b> Níveis de IFN- $\gamma$ após estimulação com ESAT-6 (A), CFP-10 (B) e PPD (C) obtidos de pacientes com TB doença (n = 21), TB latente (n =17) e controles negativos - CN (n=21).	47
<b>Figura 6</b> A curva ROC demonstra a capacidade dos testes ESAT-6, CFP-10 e PPD <i>in vitro</i> de discriminarem pacientes com TB latente dos controles negativos.	48
<b>Figura 7</b> Demonstração da capacidade dos testes ESAT-6, CFP-10 e PPD <i>in vitro</i> de discriminarem pacientes com TB doença do grupo CN.	51
<b>Figura 8</b> Este gráfico demonstra a capacidade dos testes ESAT-6, CFP-10 e PPD <i>in vitro</i> de diagnosticarem pacientes com tuberculose (latente ou doença).	54

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> Escala de concordância do <i>Kappa</i> .	41
<b>Tabela 2</b> Análise descritiva dos grupos de estudo da pesquisa.	45
<b>Tabela 3</b> Desempenho do teste ESAT-6 para detecção de indivíduos com tuberculose latente.	49
<b>Tabela 4</b> Desempenho do teste ESAT-6 para detecção de pacientes com tuberculose doença.	52
<b>Tabela 5</b> Desempenho do teste ESAT-6 para detecção de pacientes com tuberculose (doença ou latente).	55

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
<b>1.1 Histórico</b>	14
<b>1.2 Epidemiologia</b>	16
1.2.1 Distribuição mundial	16
1.2.2 Distribuição no Brasil	18
<b>1.3 Agente etiológico: características gerais</b>	18
<b>1.4 Modo de transmissão</b>	20
<b>1.5 Imunopatogenia</b>	22
<b>1.6 Diagnóstico</b>	27
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	34
<b>3 OBJETIVO GERAL</b>	35
<b>3.1 Objetivos específicos</b>	35
<b>4 HIPÓTESE</b>	36
<b>5 METODOLOGIA</b>	37
<b>5.1 Seleção de indivíduos</b>	37
<b>5.2 Métodos</b>	38
5.2.1 Preparação celular e condições de cultura	38
5.2.2 Dosagem de IFN- $\gamma$ através de ELISA	39
5.2.3 Análise estatística e determinação da sensibilidade e especificidade dos ensaios	40
<b>6 RESULTADOS</b>	43
<b>6.1 Análise descritiva dos indivíduos que compõem os grupos de estudo da pesquisa: TB latente, TB doença e CN</b>	43
<b>6.2 Discriminação entre indivíduos com TB latente e CN</b>	46
<b>6.3 Discriminação entre pacientes com TB doença e CN</b>	50
<b>6.4 Discriminação entre indivíduos com tuberculose (latente ou doença) do grupo controle negativo (CN)</b>	53
<b>7 DISCUSSÃO</b>	56
<b>8 CONCLUSÕES</b>	63
<b>REFERÊNCIAS</b>	64

<b>APÊNDICE</b> – Artigo submetido à publicação	76
<b>ANEXO A</b> – Aprovação do Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ	88
<b>ANEXO B</b> – Aprovação do Comitê de Ética do IMIP	89
<b>ANEXO C</b> – Termo de consentimento dos pacientes	90
<b>ANEXO D</b> – Termo de consentimento de controle negativo	91
<b>ANEXO E</b> – Modelo de ficha epidemiológica	92
<b>ANEXO F</b> – Capa do protocolo do <i>Kit Quantikine R&amp;D Systems</i>	102

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico

A tuberculose é uma das mais antigas doenças identificadas no ser humano, havendo relatos de evidências dessa patologia em esqueletos de 8.000 a.C., na Alemanha. Também foram encontradas múmias egípcias datando de 3.000 a.C. com lesões na coluna vertebral características de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Povos orientais, como os Hindus e Chineses, já descreviam quadros clínicos semelhantes à tuberculose desde 2.000 a.C. Hipócrates, o pai da medicina, descreveu em 380 a.C. a doença como “tísica”, que significa “derreter-se”, devido às lesões caseosas que ela provocava. Aristóteles descreve o caráter contagioso da tuberculose, por volta de 350 a.C. No século II d.C., um médico grego chamado Galeno desenvolveu esquemas terapêuticos para a doença que serviram por quase mil anos e incluíam repouso, boa alimentação e habitação em climas amenos (RIBEIRO, 1955).

Apenas em 1478, na época Renascentista, é que houve o aprofundamento do estudo da histopatologia da tuberculose. Andréas Versalius, em 1543, publicou a primeira obra de anatomia humana, baseada em dissecações reais, onde foi observado que indivíduos falecidos por tísica apresentavam, na maioria das vezes, lesões em suas cavidades pulmonares características de tuberculose. Duzentos anos depois, o anatomista holandês Francisco de Layden, descreveu nódulos endurecidos encontrados em pulmões de indivíduos doentes e os denominou de “tubérculos”, chegando à conclusão de que a doença tinha início no pulmão. No início do século XVIII, durante a Revolução Industrial, a tuberculose torna-se uma epidemia, graças ao surgimento de cidades populosas e desorganizadas, trabalho extenuante do proletariado em fábricas com péssimas condições de trabalho e falta de higiene, propagando-se dessa forma pela Europa e posteriormente nas Américas e na África (RIBEIRO, 1955).

Em 1839, o nome tuberculose surge pela primeira vez, pelo médico Johann Schönheim. Em 1865, Jean Villemin demonstrou o aparecimento de nódulos em animais inoculados com pus de cavidades pulmonares de doentes, comprovando a tuberculose. Em 1882, Robert Koch finalmente isola o agente causal, o *Mycobacterium tuberculosis*, conhecido dessa forma por bacilo de Koch, recebendo mais tarde o Prêmio Nobel de Medicina por causa de seus estudos sobre o bacilo (RIBEIRO, 1955).

Na tentativa de se criar uma vacina contra a tuberculose, em 1921, Albert Calmette e Camile Guérin, do Instituto Pasteur, França, obtiveram uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, denominada de BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), dando origem a primeira vacina antituberculose. Ela foi inicialmente administrada por via oral em bebês recém-nascidos de mães tuberculosas na esperança de imunizar as crianças contra a tuberculose. Embora a descoberta da vacina fosse promissora na época, a vacinação foi um desastre. Um terço das crianças que receberam a vacina faleceram, já que a cepa utilizada não estava completamente atenuada e só 20 anos depois é que estudos com a BCG foram retomados (MARCH, 2002).

No Brasil, a tuberculose surgiu por volta da época do descobrimento, trazida pelos colonizadores jesuítas e escravos africanos. Os índios que adquiriam a tuberculose, por não terem imunidade contra a doença, morriam rapidamente e dessa forma muitas tribos indígenas foram dizimadas em curto espaço de tempo. Graças ao crescimento urbano e populacional ocorridos nos séculos posteriores, a doença foi se tornando cada vez mais difícil de ser controlada, assumindo proporções endêmicas (RIBEIRO, 1971).

Embora a descoberta das lesões e o aprofundamento do conhecimento da clínica da tuberculose datem de vários séculos atrás, o avanço no diagnóstico da tuberculose foi bastante lento, e geralmente era baseado na clínica do paciente, quando esse já estava bastante debilitado (RIBEIRO, 1971). Somente na segunda metade do século XX é que o diagnóstico pôde ser feito através do isolamento do *M. tuberculosis* em cultura, embora específico, não é um método muito sensível, especialmente para o diagnóstico em crianças (SANT'ANNA, 2001). Devido ao

caráter endêmico da doença e a dificuldade do diagnóstico precoce, muitos estudos têm surgido nessa área, especialmente nas últimas décadas, tendo se destacado os que utilizam métodos baseados em biologia molecular (STARKE; ONG; EISENACH, 1993; STARKE, 1998) e os métodos imunológicos, mais recentemente (RAVN et al., 2005; WELDINGH et al., 2005).

Por outro lado, a descoberta de um tratamento eficiente contra a tuberculose não foi tão rápida. Somente nos anos 60 é que se desenvolveu um esquema eficaz denominado esquema tríplice, onde três antibióticos são utilizados simultaneamente. Esse esquema foi instituído no Brasil pelo professor Hélio Fraga e utilizava primeiramente as drogas estreptomicina, isoniazida e ácido aminossalicílico e tinha duração de 12 a 24 meses, e foi posteriormente modificado na década de 80, quando se passou a utilizar as drogas rifampicina, isoniazida e pirazinamida e o tratamento foi encurtado para 6 meses. Esse esquema de tratamento para a tuberculose é mantido até os dias atuais no país (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; MARCH, 2002).

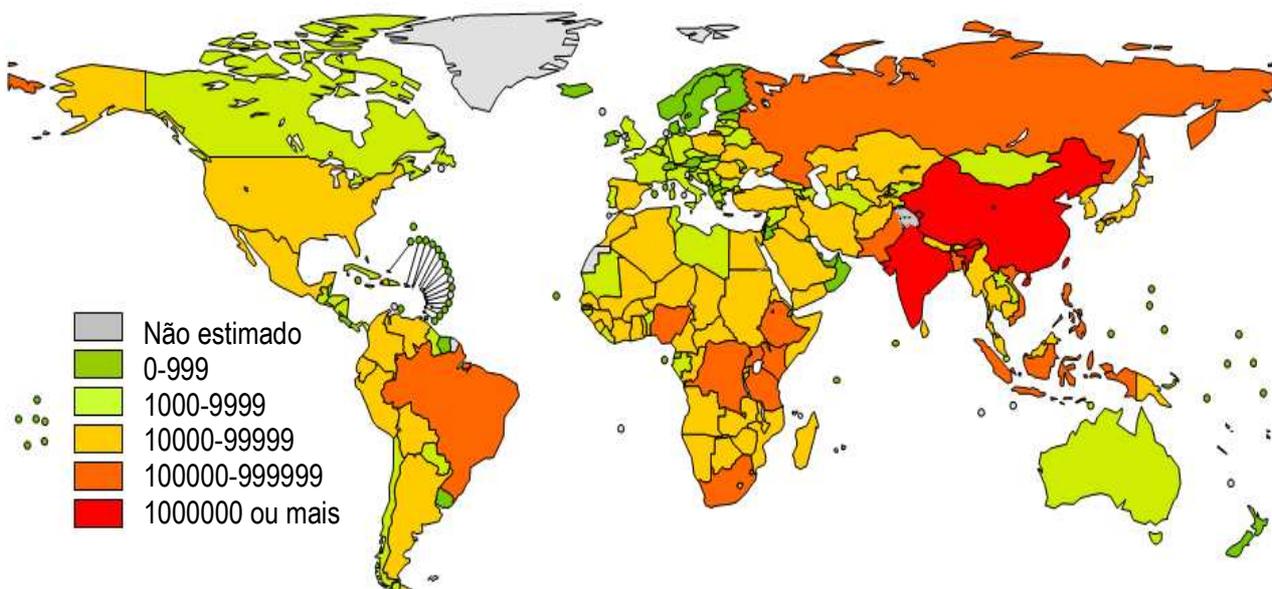
## 1.2 Epidemiologia

### 1.2.1 Distribuição mundial

A diminuição progressiva da incidência da tuberculose durante as primeiras oito décadas do século passado, aproximando-se de zero na maior parte do mundo, levou os microbiologistas a terem convicção de que essa doença estava próxima de ser erradicada. Porém, o que foi observado no início dos anos 80 é que a incidência da tuberculose voltou a subir vertiginosamente, fazendo com que as taxas de mortalidade e morbidade se elevassem com igual rapidez (KONEMAN, 2001). Esse fato ocorreu devido principalmente ao aparecimento de novas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes aos múltiplos quimioterápicos utilizados no tratamento dessa enfermidade, às infecções

concomitantes com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) causada pelo vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), que foi descoberto no início dos anos 80, além da ineficiência dos programas de controle da doença e da deteriorização das condições sócio-econômicas da população (CROFTON, 1992; LEROY; SALMI; DUPON, 1997).

Dessa forma, a tuberculose ainda hoje continua sendo um dos mais sérios problemas de Saúde Pública no mundo, sendo considerada uma doença reemergente (Fig. 1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial está infectada pelo bacilo da tuberculose e que anualmente ocorrem cerca de 8,7 milhões de novos casos no planeta, levando cerca de 3 milhões de pessoas a óbito (DOHERTY et al., 2002; VENDRAMINI et al., 2005). Calcula-se que 95% dos casos no mundo ocorrem em países em desenvolvimento (KOLMOS; BRAHM; BRUNN, 1992), e esse fato fez com que a OMS declarasse estado de emergência nesses países desde 1993. Além disso, é importante salientar que do total de casos de TB no mundo, aproximadamente 11% ocorrem em crianças (NELSON; WELLS, 2004).



**Figura 1:** Novos casos de tuberculose registrados no mundo durante o ano de 2005, de acordo com a OMS.

Fonte: [http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/TB\\_newcases\\_2005.png](http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/TB_newcases_2005.png)

### 1.2.2 Distribuição no Brasil

No Brasil, cerca de 110 mil casos de tuberculose são notificados a cada ano, dos quais aproximadamente 6 mil terminam em morte (BIERRENBACH et al., 2007). A incidência dessa doença no país é em torno de 62 por 100 mil habitantes e a taxa de mortalidade é ainda bastante elevada, cerca de 5,9 por 100 mil habitantes, enquanto que o número de pessoas infectadas é estimado em 42 milhões e cerca de 10% dos casos notificados por ano ocorrem em menores de 15 anos (SOUZA et al., 2005). Essa realidade fez com que a OMS incluísse o Brasil, o único das Américas, na lista das 22 nações que concentram 80% dos casos de tuberculose registrados no mundo, ocupando a 15ª posição (FAÇANHA, 2005).

Em Pernambuco a situação não é diferente do restante do país. No ano de 2006, foram notificados cerca de 5.170 casos de tuberculose, sendo 10% em crianças e adolescentes (BRASIL, 2007). Por outro lado, no mesmo ano ocorreram 645 internações na cidade do Recife devido a essa enfermidade. A taxa de mortalidade de tuberculose no estado é de 5,24 por 100 mil habitantes (BRASIL, 2006c) e a incidência é de 62,83 por 100 mil habitantes (BRASIL, 2006b). No entanto, a incidência da tuberculose em crianças de 0 a 15 anos é menor, cerca de 19,06 por 100 mil habitantes (BRASIL, 2006a), mas ainda é considerada bastante elevada. Esses dados fazem com que Pernambuco ocupe a terceira posição no ranking das mais elevadas taxas de incidência do país, perdendo apenas para os estados do Rio de Janeiro e do Amazonas.

### 1.3 Agente etiológico: características gerais

A tuberculose é uma doença endêmica causada por microorganismos que pertencem à ordem dos *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium* e que têm como característica principal serem bacilos álcool-ácido

resistentes (BAAR). Essa característica designa bactérias que resistem à descoloração com álcool acidificado quando coradas à quente com fucsina fenicada e dessa forma apresentam coloração avermelhada (técnica de Ziehl-Neelsen), quando observadas em esfregaços ao microscópio óptico. Essa propriedade se deve principalmente às características dos lipídeos que compõem a parede celular dessas bactérias (KONEMAN, 2001).

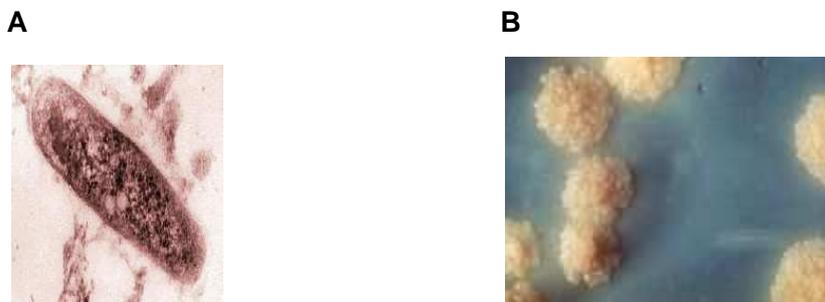
Várias espécies de *Mycobacterium* foram descobertas até o momento, sendo elas diferenciadas entre si através de sua velocidade de crescimento e produção de pigmentos (RUNYON, 1970), além do estudo de suas propriedades fenotípicas, genotípicas e sua estrutura celular (SOMMERS; GOOD, 1985). Dessa forma, o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* pôde ser bem caracterizado e estudado.

A morfologia celular típica do *M. tuberculosis* é a de um bacilo delgado, ligeiramente curvo, que mede 0,3 a 0,6 por 1 a 4  $\mu\text{m}$ , corado em vermelho intenso pela coloração de Ziehl-Neelsen (fortemente ácido-resistente - Figura 2A), sendo essas bactérias classificadas como micobactérias não pigmentadas de crescimento lento. Além dessas características, o agrupamento dos bacilos formando ramos longos e tortuosos, conhecidos como cordas, é peculiar da espécie *M. tuberculosis* (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1994). Sua parede celular é composta por alto conteúdo lipídico, sendo responsável por importantes efeitos biológicos como a indução do granuloma (KUBICA; WAYNE, 1984). O bacilo da tuberculose é aeróbio estrito e é considerado um parasito intracelular facultativo, devido a sua capacidade de sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos (KUBICA; WAYNE, 1984).

Em relação às colônias, elas apresentam aspecto rugoso, não pigmentado, cor camurça após 14 a 28 dias de incubação a 37° em meio de Löwenstein-Jensen ou Middlebrook - Figura 2B (KONEMAN, 2001).

O *M. tuberculosis* pode ainda entrar em estado de dormência após a infecção e sobreviver no interior no organismo humano durante anos sem se dividir. Essa característica tem importância na clínica médica, já que a tuberculose doença, é frequentemente desenvolvida através de uma reativação de uma

infecção antiga, subclínica, ocorrida há vários anos antes (COLSTON; COX, 1999).



**Figura 2:** Características do *Mycobacterium tuberculosis*.

Fontes: a) <http://www.wadsworth.org/databank/hirez/mcdonp4.gif>;

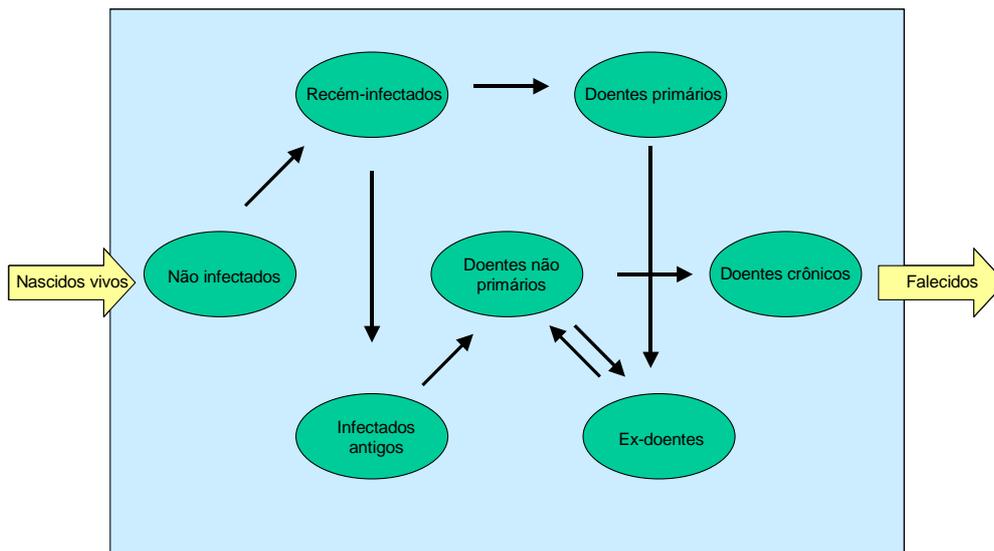
b) [http://a.abcnews.com/images/Health/ht\\_tuberculosis\\_070428\\_ms.jpg](http://a.abcnews.com/images/Health/ht_tuberculosis_070428_ms.jpg)

Notas: a) Coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen;

b) Aspectos da cultura.

#### 1.4 Modo de transmissão

A história natural da tuberculose envolve a interação entre o conjunto de fatores: micobactéria, hospedeiro, ambiente e tempo. Fatores genotípicos e fenotípicos de cada indivíduo influenciam na interação do organismo humano com o *M. tuberculosis*, assim como as características próprias de cepas dessa espécie. Um esquema simplificado do modelo clássico pode ser observado na Figura 3 (CAMPANHA NACIONAL CONTRA A TUBERCULOSE, 1987).



**Figura 3:** Modelo epidemiológico da história natural da tuberculose.

Fonte: Campanha Nacional contra a Tuberculose, 1987.

Nota: O retângulo em azul representa uma população qualquer, incrementada pelos nascimentos e diminuída pelos óbitos ocorridos no período.

Para o entendimento do processo que leva à tuberculose doença, é necessário o entendimento da distinção entre os termos infecção e doença. São considerados infectados os indivíduos que têm histórico de contato com adulto tuberculoso e/ou teste tuberculínico positivo (TTI), mas não apresentam sinais ou sintomas clínicos específicos da doença ativa. Já a doença é caracterizada quando há desequilíbrio entre a interação bacilo-hospedeiro nos indivíduos infectados, ocorrendo dessa forma os sinais e sintomas clássicos da tuberculose. A transição do estado de infecção latente para o estado de doença ativa pode se dar vários anos após o contágio, já que o bacilo pode sobreviver em estado latente, dentro do organismo humano, por vários anos (BARROSO, 2002).

A transmissão da TB é feita através de indivíduo adulto bacilífero, normalmente com a forma pulmonar da doença, o qual elimina bacilos para o ambiente através de gotículas de saliva (ROM; GARAY, 1995). Essas gotículas podem permanecer em suspensão por vários dias, em condições favoráveis, e uma vez aspiradas, as partículas infectantes maiores são retidas pelo sistema mucociliar da mucosa respiratória, sendo removidas dos brônquios, deglutidas e

eliminadas pelas fezes. Por outro lado, as partículas menores, com cerca de 1 a 5 µm de diâmetro, podem alcançar os pulmões (BARROSO, 2002).

Os adultos infectados com mais de 5.000 bacilos/mL no escarro têm grande capacidade de transmissão da tuberculose. A chance de adquirir a infecção aumenta em famílias de baixa renda, que moram em casas mal ventiladas e pequenas e que têm pelo menos um adulto tuberculoso no seu convívio (BARROSO, 2002). As crianças não são capazes de transmitir a infecção tuberculosa, já que as mesmas são paucibacilares e possuem dificuldade de expectoração (MACIEL et al., 2006).

### 1.5 Imunopatogenia

Quando o indivíduo entra em contato com o *M. tuberculosis*, pode ocorrer um dos três eventos: 1- o hospedeiro elimina a infecção através de barreiras físicas do sistema respiratório, como por exemplo, a mucosa ciliada existente nos brônquios e também através da fagocitose dos bacilos por células da imunidade inata, com ação dos macrófagos em nível dos alvéolos pulmonares; 2- infecção latente, acontece quando o sistema imune do hospedeiro é capaz de controlar, mas não de eliminar a infecção, permanecendo dessa forma focos infecciosos nos órgãos infectados durante vários anos; 3- desenvolvimento da doença ativa, que aparece quando há um desequilíbrio da relação parasita-hospedeiro, geralmente após uma reativação de um foco de infecção latente existente no hospedeiro (LAPA E SILVA; BOECHAT, 2004).

A destruição dos macrófagos ocorre devido à multiplicação intracelular dos bacilos, levando à progressão da reação inflamatória mononuclear, com a formação do foco pulmonar primário ou foco de Gohn (BETHLEM, 1984). Esses bacilos migram via drenagem linfática e chegam a linfonodos satélites da região atingida, onde lá continuam a multiplicar-se dentro de células fagocíticas, e ao lisá-las, provocam uma nova reação inflamatória, com conseqüente hiperplasia do

linfonodo infectado. A esse conjunto de eventos (foco pulmonar, linfagite intermediária e foco ganglionar) denominou-se complexo primário da TB caracterizando a primoinfecção tuberculosa (KAUFMANN et al., 1989). Após infecção dos linfonodos satélites, pode haver disseminação hematogênica do bacilo, denominada “bacilemia silenciosa”, por todo o organismo do hospedeiro (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Com o desenvolvimento da imunidade mediada por células e da hipersensibilidade do tipo tardio, em locais como baço, fígado e medula óssea, os bacilos que migraram via corrente sanguínea são geralmente erradicados desses tecidos. Não havendo a total erradicação desses microorganismos, ocorre a formação de focos metastáticos de TB (BARROSO, 2002).

Quando os focos de Gohn evoluem para fibrose e/ou calcificação das lesões pulmonares iniciais, podendo ser percebidas através de radiografia de tórax, há a instalação da tuberculose primária e geralmente ocorre até os 5 primeiros anos após a primoinfecção. As principais formas de tuberculose primária são: ganglionar, pneumônica, bronco-pneumônica, cavitária, atelectásicas e miliar, sendo esta última um dos mais graves tipos de tuberculose primária, que é resultado de uma disseminação sistêmica do bacilo com difusão de lesões granulomatosas por vários órgãos (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Cerca de 40-50 % das crianças com primoinfecção desenvolvem a TB primária (SHINGADIA; NOVELLI, 2003), sendo este número reduzido para cerca de 5-10% nos adultos (STYBLO, 1980).

Por ser uma bactéria estritamente aeróbia, o foco de infecção tuberculosa primária ocorre geralmente nos pulmões, próximo à pleura, nas zonas médias e inferiores, para onde é direcionado o maior volume de ar inalado (BARROSO, 2002).

Clinicamente a tuberculose primária pode ser caracterizada de duas formas: 1- aguda e grave, que é menos comum ou 2- insidiosa e lenta, sendo esta última com maior ocorrência entre os infectados. Alguns dos sintomas da forma lenta, especialmente em crianças, são: febre baixa, irritação, sudorese noturna, inapetência e exame físico inexpressivo, caracterizando sintomatologia

inespecífica e dificultando o diagnóstico baseado na clínica (FRANCO et al., 2003; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

A tuberculose pós-primária é uma forma que ocorre tardiamente, anos depois do estabelecimento da TB primária. É caracterizada por lesões circunscritas, cavitação e fibrose, de evolução mais lenta que a tuberculose primária e também por um aumento da reação inflamatória do tipo hipersensibilidade, já que o indivíduo infectado apresenta memória imunológica contra os antígenos do *M. tuberculosis* (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Geralmente traz seqüelas graves ao hospedeiro, devido às lesões cavitárias, altamente destrutivas do tecido parenquimatoso, no sítio de infecção (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

A origem dessa forma de TB pode ser endógena, com reativação de um foco latente resultante da tuberculose primária ou exógena, a partir de uma nova contaminação por *M. tuberculosis*, geralmente por uma cepa mais virulenta (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Dois tipos celulares principais do sistema imune são responsáveis pela defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *M. tuberculosis*: os macrófagos e os linfócitos T. Quando a micobactéria invade os pulmões dos hospedeiros, durante a primo-infecção, inicia-se a fagocitose pelos macrófagos alveolares. Dependendo da virulência do bacilo e da quantidade de bactérias inalada, o macrófago pode ser capaz de debelar essa infecção inicial ou não. Em geral, essa célula do sistema imune não é capaz de destruir o *M. tuberculosis* sozinha (LAPA E SILVA; BOECHAT, 2004). Após ser fagocitado, o bacilo permanece no interior do fagossomo. Quando há o encontro do fagossomo infectado com o lisossomo, os antígenos micobacterianos podem ser processados e apresentados aos linfócitos TCD4+, através do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) do tipo II presente nos macrófagos (FERRAZ et al., 2006; TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007).

Ao realizarem a fagocitose, os macrófagos também liberam enzimas proteolíticas que têm sido associadas à liquefação do *caseum* do granuloma (BARROSO, 2002) e citocinas, que são moléculas sinalizadoras produzidas por uma variedade enorme de células do sistema imune e possuem variadas funções,

e neste caso da infecção pelo *M. tuberculosis*, atraem para o local de infecção os linfócitos T, especialmente os Th1 e TCD8+, dando início ao processo de inflamação local no pulmão.

A estimulação dos linfócitos TCD8+ pelas micobactérias se deve principalmente à formação de vesículas apoptóticas, oriundas de células infectadas e contendo antígenos do bacilo associados ao MHC de classe I (WINAU et al., 2006) e à produção de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). Além disso, esses linfócitos TCD8+ ativados são capazes de destruir macrófagos que sucumbiram à infecção micobacteriana, liberando o seu conteúdo citoplasmático no meio extracelular e possibilitando uma fagocitose eficiente dos bacilos liberados por outros macrófagos (LAPA E SILVA; BOECHAT, 2004).

Por outro lado, a ativação dos linfócitos TCD4+ envolve o reconhecimento do peptídeo micobacteriano ligado ao MHC II, interação de moléculas co-estimuladoras, por exemplo CD80/CD86 - CD28, e a produção de citocinas pelas APCs, como a interleucina 12 (IL-12), que vão ativar os linfócitos T a produzirem IL-2 (que também está envolvida na ativação e proliferação dos linfócitos T) e IFN- $\gamma$ , principal citocina envolvida na fase inicial da resposta imune adaptativa. Essa última citocina induz a ativação, diferenciação e expansão das células Th1 antígeno-específicas, que são as principais células responsáveis pela modulação da resposta imune contra o bacilo da tuberculose e no controle da fase crônica da infecção (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007).

O IFN- $\gamma$  atua também na indução do aumento na expressão do MHC e de receptores para imunoglobulinas, recruta linfócitos T que participam da destruição bacteriana a produzirem mais IFN- $\gamma$  e estimula a produção de óxido nítrico. Embora a presença apenas desta citocina não seja suficiente para controle do bacilo da TB, ela é um dos componentes cruciais para a resposta protetora contra o patógeno (NORTH; JUNG, 2004) e dessa forma é utilizada como um marcador da atividade celular efetora e de indicação de infecção, quando há exposição do sistema biológico aos antígenos micobacterianos (BOEHM et al., 1997). Apesar de

existir uma produção de IL-4 durante a infecção tuberculosa humana, a resposta do tipo Th2 é geralmente pouco significativa (SEAH; SCOTT; ROOK, 2000).

Na TB, quanto maior a quantidade de bacilos de *M. tuberculosis* adquirida durante a infecção, maior a produção de citocinas do tipo Th1, como IL-2 e IFN- $\gamma$ . Um caso particular é a infecção latente, na qual a migração de macrófagos e células T (como também algumas células B) para o sítio de infecção culmina na formação do granuloma. O granuloma tuberculoso consiste de um acúmulo de células fagocitárias infectadas com o bacilo da tuberculose e linfocíticas, células dendríticas, endoteliais, fibroblastos e células estromais (GONZALEZ-JUARRERO et al., 2001). A formação do granuloma é essencial para conter a infecção tuberculosa, já que o mesmo funciona como uma barreira, envolta de tecido conjuntivo, delimitando o sítio de infecção (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003). Embora a produção de citocinas e a ação de células do sistema imune dentro do granuloma sejam ativas na tentativa de eliminar a infecção no interior do mesmo, o *M. tuberculosis* encontrou mecanismos de defesa, para escapar da ação do sistema imune do indivíduo infectado. Algumas estratégias de defesa desses microorganismos são: permanecerem dentro de fagossomos que tendem a não se fundirem com os lisossomos secundários (ARMSTRONG & HART, 1971), liberação da micobactéria no citoplasma, através da indução da lise das paredes do fagossomas, escapando dessa forma da ação dos lisossomas, entre outros fatores não completamente elucidados (BARROSO, 2002).

Quando há formação de granuloma, mas a replicação das micobactérias no interior dos macrófagos é baixa e a infecção fica restrita ao mesmo, há um estado de “equilíbrio” entre bacilo-hospedeiro, caracterizando a infecção latente. O bacilo pode sobreviver no interior do granuloma por vários anos, servindo como um reservatório de infecção (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003).

No entanto, havendo um comprometimento do sistema imune do hospedeiro infectado por *M. tuberculosis*, pode ocorrer uma reativação da infecção latente, mesmo anos após o primeiro contato. Neste caso, há o aumento da replicação das micobactérias no interior dos macrófagos, com elevada produção de citocinas e substâncias teciduais líticas, causando extensa necrose no tecido

infectado e formação de lesões cavitárias, caracterizando a doença ativa (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003).

Em crianças há um alto risco de conversão de infecção latente para TB doença, já que essa primeira forma se mostra assintomática nesses indivíduos, dificultando o controle e erradicação do foco latente precocemente, não sendo capaz de proteger eficazmente contra o desenvolvimento da tuberculose ativa (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003).

## 1.6 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico da TB é feito através do histórico epidemiológico do indivíduo, para saber se ele teve contato com algum adulto tuberculoso ou mora em área endêmica; observação de sinais e sintomas específicos da tuberculose; realização do TTI (Teste Tuberculínico Intradérmico); realização de radiografia do tórax, nos casos de suspeita de TB pulmonar. São realizadas baciloscopia e a cultura microbiológica para confirmação de *M. tuberculosis* no espécime quando há possibilidade de coleta de amostra biológica suspeita de infecção. O tratamento profilático é realizado quando há forte suspeita de TB e é considerado caso positivo quando há resposta ao tratamento, cura dos sinais e melhora da sintomatologia no indivíduo suspeito (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2001).

As principais medidas para conter o avanço da TB no mundo englobam o diagnóstico precoce dos pacientes, tratamento efetivo contra as formas resistentes de TB e uma vacina mais aperfeiçoada e protetora do que a atual BCG (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2001). Devemos salientar que do total de casos que ocorrem no nosso país, apenas 68% são diagnosticados corretamente (LEMOS et al., 2004).

Em crianças, a TB é particularmente difícil de ser diagnosticada, impedindo muitas vezes o tratamento precoce e o controle da transmissão. Ela pode se

apresentar desde sua forma assintomática até suas formas graves disseminadas, levando muitas vezes o paciente a óbito (HOUWERT et al., 1998). O quadro clínico clássico (tosse há mais de três semanas, febre, perda de peso, dificuldade respiratória) na maioria dos casos de tuberculose infantil está ausente, sendo mais comum a presença de sintomas inespecíficos comumente encontrados em outras doenças como viroses ou pneumonias, caracterizando dessa forma o polimorfismo clínico da tuberculose em crianças (FRANCO et al., 2003).

No adulto, o diagnóstico de certeza da tuberculose é dado pela presença do bacilo através da baciloscopia ou cultura microbiológica (BRASIL, 2004). Na TB pulmonar, a tosse produtiva é o sintoma mais comum no início da doença. Com o desenvolvimento da infecção, o escarro começa a ser produzido devido ao aumento da inflamação e da necrose do tecido pulmonar. Devido a isso, a baciloscopia ainda é um método largamente utilizado no diagnóstico da TB. O principal método para pesquisa de bacilos em amostras de escarro é a coloração de Ziehl-Neelsen. É um método barato e que não exige pessoal treinado nem equipamentos caros para ser realizado (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007), mas apresenta como maior desvantagem a baixa sensibilidade, em torno de 50 a 70% em adultos infectados pelo *M. tuberculosis*, em parte devido à necessidade de que a amostra contenha pelo menos 5.000 bacilos/mL para ser positiva ao microscópio (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Em crianças, o percentual de diagnóstico através da baciloscopia é ainda mais baixo, em torno de < 10% (STARKE, 2003; ZAR et al., 2005). Os principais fatores que contribuem para a baixa sensibilidade desse método é que a criança além de ser paucibacilar, dificilmente expectora, sendo de pouca utilidade sua utilização em amostras de escarro e lavados gástricos (MACIEL et al., 2006).

As culturas de materiais biológicos são utilizadas em conjunto com a baciloscopia para diagnóstico da TB, e embora sejam mais sensíveis e específicas, necessitando apenas de 10 a 100 bacilos/mL de amostra para ser positiva para *M. tuberculosis*, elas apresentam resultado demorado, necessitando de cerca de 8-10 semanas para a liberação do laudo (SNIDER, 1988) e dessa forma protelando o diagnóstico definitivo da doença. Em pacientes pediátricos, a

positividade de culturas de materiais biológicos é em torno de < 30%, percentual esse considerado de baixíssima sensibilidade (STARKE, 2003; ZAR et al., 2005).

Na tentativa de diminuir o tempo de cultivo de microorganismos, alguns sistemas automatizados de cultura para detecção de micobactérias foram desenvolvidos. Esses métodos utilizam meios enriquecidos que promovem o crescimento bacteriano acelerado, mas também têm altos índices de falso-positivos devido às contaminações por outras bactérias (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

Uma alternativa laboratorial para diagnosticar a tuberculose infantil é a utilização do TTI. É um método baseado na reação celular desenvolvida na pele, 24 a 72 h depois da inoculação intradérmica de PPD (*Purified Protein Derivative*), que é uma mistura de proteínas de micobactérias de baixo peso molecular, na dose de 0,1 mL no antebraço. Após 72 h, a leitura da induração formada é feita, e dependendo dos fatores de risco do indivíduo, resultados entre 5-15 mm ou mais podem ser considerados positivos (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2001).

Apesar da boa sensibilidade, a especificidade do PPD é baixíssima, em torno de 7% (VAN PINXTEREN et al., 2000), sobretudo após vacinação recente com BCG (SANT'ANNA et al., 2002), já que o antígeno utilizado neste teste, o PPD, compartilha vários epítomos antigênicos com o BCG, *Mycobacterium avium* e com a maioria das micobactérias ambientais, (ANDERSEN et al., 2000), sendo incapaz de distinguir com segurança pessoas vacinadas com BCG daquelas expostas a micobactérias do ambiente ou infectadas com *M. tuberculosis* (FINE et al., 1994).

Um outro método auxiliar no diagnóstico da TB é a radiografia de tórax, principalmente em pacientes sintomáticos e negativos à baciloscopia. O método é baseado na presença de opacidades radiológicas características, mas só é útil quando já há acometimento do tecido pulmonar. Em crianças, muitas vezes, as imagens não são conclusivas, visto que lesões pulmonares semelhantes às causadas pela tuberculose podem ocorrer em outras doenças respiratórias, eventos esses bastante recorrentes nessa fase da vida. Embora seja útil no diagnóstico de TB pulmonar, a análise através de radiografia não é um exame

específico para detectar casos de TB, visto que lesões pulmonares semelhantes às causadas pelo bacilo da TB podem ocorrer em outras doenças (DIAGNOSTIC STANDARDS AND CLASSIFICATION OF TUBERCULOSIS IN ADULTS AND CHILDREN, 2000; MARAIS; PAI, 2007). A tomografia de tórax também pode ser utilizada, já que apresenta imagens de alta resolução, porém seu custo é muito elevado, sendo disponível somente em centros de referências (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

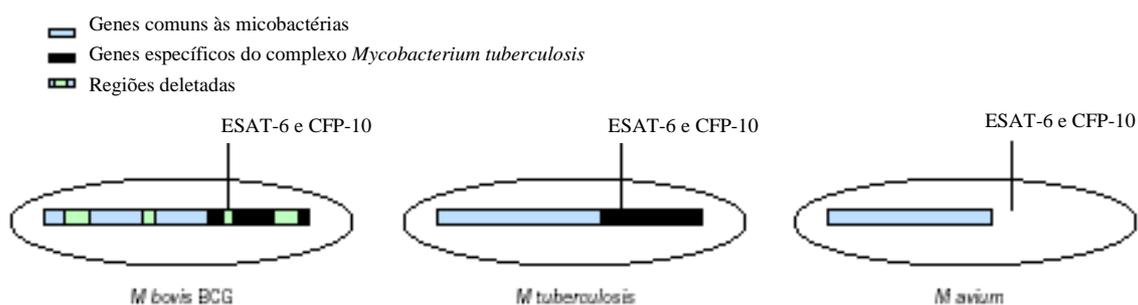
Dentre os métodos diagnósticos atualmente utilizados para TB, nenhum deles tem obtido o sucesso desejado para diminuir a incidência da doença de forma significativa (FRIEDEN et al., 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2001) nem capacidade de diagnosticar precocemente a tuberculose (FRANCO et al., 2003), sobretudo em crianças. A importância de se diagnosticar TB latente em crianças se deve ao fato de que a infecção tuberculosa pode persistir por vários anos, com risco de reativação para doença ativa em cerca de 10% nos dois primeiros anos e 50% até os 5 anos após o primeiro contato com adulto tuberculoso (JASMER; NAHID; HOPEWELL, 2002; TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003).

Diante dessas dificuldades, vários métodos diagnósticos alternativos têm sido desenvolvidos e intensamente estudados. Dentre esses métodos, destacam-se os baseados em biologia molecular e os de imunodiagnóstico baseados em antígenos recombinantes específicos do complexo *M. tuberculosis* (WELDINGH et al., 2005).

O método PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um método de biologia molecular baseado na amplificação *in vitro* do DNA micobacteriano, através da reação de polimerase em cadeia, podendo por sua vez fornecer uma resposta diagnóstica rápida e sensível. Mas apresenta como desvantagens a exigência de um laboratório e pessoal técnico especializado (MELLO et al., 2002; SPERHACKE et al., 2004). O método também não é de grande aplicabilidade nos casos de TB extra-pulmonar, visto que é necessário haver um procedimento invasivo para obtenção da amostra para análise. Por ser uma técnica cara e apresentar muitos resultados falso-positivos devido à alta sensibilidade, o método ainda não está

comercialmente disponível para o diagnóstico da TB (ANDERSEN et al., 2000; SHINGADIA; NOVELLI, 2003; TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007). Em vários estudos com pacientes pediátricos, a sensibilidade encontrada para o teste PCR foi cerca de 40-60%, sendo considerada baixa e muito próxima à encontrada quando o diagnóstico é feito baseado em achados clínicos, microbiológicos, radiológicos e em histórico epidemiológico compatível com TB, concomitantemente (FAUVILLE-DUFAUX et al., 1996; GÓMEZ-PESTRANA; TORRONTERAS; CARO, 1999; SHINGADIA; NOVELLI, 2003; SMITH et al., 1996; STARKE; ONG; EISENACH, 1993).

Em relação aos métodos de imunodiagnóstico para TB, dois antígenos recombinantes estão sendo intensamente estudados: o ESAT-6 (*early secretory antigen target*) e o CFP-10 (*culture filtrate protein*) têm se destacado para este fim (MARAIS e PAI, 2006; MUNK et al., 2001; PALAZZO et al., 2008; POLLOCK; ANDERSEN, 1997; RAVN et al., 2005). Esses antígenos estão contidos na região codificadora RD-1 do genoma micobacteriano (Figura 4), região esta específica do complexo *M. tuberculosis* e que está ausente no genoma do *M. bovis BCG* e do *Mycobacterium avium*, além da maioria das micobactérias ambientais (RAVN et al., 1999, 2005).



**Figura 4:** Esquema identificando a região responsável pela codificação dos antígenos ESAT-6 e CFP-10 no genoma do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, a qual encontra-se deletada no genoma do *M. bovis BCG* e do *M. avium*.

Fonte: [www.biomedimages.com](http://www.biomedimages.com)

Nota: Essa região encontra-se inserida numa maior denominada RD-1, em preto.

Uma das características principais desses antígenos é que são potentes indutores de IFN- $\gamma$ , já que estimulam uma resposta do tipo Th1 (MUNK et al., 2001; PAI; RILEY; COLFORD, 2004; RAVN et al., 1999; RAVN et al., 2005; VAN PINXTEREN et al., 2000), permitindo que a tuberculose ativa seja diagnosticada com base nos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos (SCHOLVINCK et al., 2004). Alguns estudos envolvendo mutações nos genes que codificam o ESAT-6 e o CFP-10 mostraram a ausência na indução da resposta específica de células T e a anulação da virulência da micobactéria (BRODIN et al., 2005), logo se chegou à conclusão que essas duas moléculas são fortemente imunodominantes quando o bacilo infecta o hospedeiro, sendo responsáveis pela ativação de células T durante o início da TB (ANDERSEN et al., 2000; ULRICHS et al., 1998).

Por essa razão, os antígenos ESAT-6 e CFP-10 são reconhecidos especificamente pelo sistema imune de pacientes com tuberculose ativa pulmonar ou extrapulmonar e também com tuberculose latente (MARAIS; PAI, 2007; RAVN et al., 2005), característica essa que confere sensibilidade aos testes baseados nesses antígenos. Por outro lado, indivíduos não expostos ao complexo *M. tuberculosis*, porém reativos ao PPD devido à vacinação prévia com BCG ou indivíduos que já entraram em contato com micobactérias ambientais (vacinados ou não), não reconhecem esses antígenos recombinantes (AREND et al., 2000a, 2000b; LALVANI; NAGVENKAR; UDWADIA, 2001; RAVN et al., 2005), e dessa forma esses testes apresentam também uma especificidade elevada no que se refere ao diagnóstico da tuberculose. Porém, alguns estudos afirmam que testes imunodiagnósticos utilizando ESAT-6 e CFP-10 sejam pouco sensíveis, apesar da alta especificidade, sendo de pouca utilidade em áreas não endêmicas (HILL et al., 2004; VAN PINXTEREN et al., 2000).

Atualmente, existem dois testes disponíveis comercialmente baseados na produção de IFN- $\gamma$ . O primeiro a ser aprovado foi o QuantiFERON – TB, em 2001, pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA) que utilizava como antígeno principal o PPD para estimular a cultura de células. Logo foi observada a baixa especificidade, já que esse ensaio apresentava os mesmo problemas do teste cutâneo com PPD (ANDERSEN et al., 2000). Posteriormente,

o QuantiFERON – TB foi substituído pelo QuantiFERON – TB – Gold, só que dessa vez utilizando os antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10, em vez de PPD. Esse novo teste, que foi aprovado pela FDA em 2004 para diagnóstico da TB em adultos, utiliza o ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e apresenta como vantagens altas sensibilidade e especificidade, além de rapidez diagnóstica e baixo custo (MAZUREK, 2005; PAI; RILEY; COLFORD, 2004; PALAZZO et al., 2008). Contudo, ainda não houve aprovação pela FDA para diagnóstico da TB em crianças através desse método (CONNELL et al., 2006).

O outro teste de imunodiagnóstico em estudo é o T SPOT TB, no qual o número de células T produtoras de IFN- $\gamma$ , *M. tuberculosis* específicas, pode ser quantificado (ANDERSEN et al., 2000; HILL et al., 2004; LALVANI, 2003; ULRICHS et al., 2000). Esse ensaio emprega o ESAT-6 e o CFP-10 como antígenos específicos para estimulação dos linfócitos sanguíneos. No entanto, sua liberação para uso no diagnóstico da TB ainda não foi aceita pela FDA (MARAIS; PAI, 2007; PAI; RILEY; COLFORD, 2004).

A proposta do nosso estudo é analisar os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos em resposta aos antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10 bem como PPD *in vitro*, em crianças, avaliando o desempenho desses métodos imunológicos para diagnosticar a tuberculose infantil, especialmente a sua forma latente, haja vista as inúmeras dificuldades encontradas no diagnóstico dessa doença, mesmo em áreas endêmicas como Pernambuco. Por outro lado, há poucos estudos no que se refere ao diagnóstico imunológico da tuberculose no Brasil, especialmente em crianças.

## 2 JUSTIFICATIVA

A dificuldade em se diagnosticar corretamente a tuberculose infantil se deve principalmente ao fato de que as crianças são paucibacilares e possuem dificuldade de expectoração, não sendo os métodos laboratoriais convencionais, como baciloscopia e cultura de secreções, eficientes para esse fim. Além disso, o diagnóstico clínico apresenta critérios subjetivos.

Em razão disso, é de nosso interesse desenvolver um estudo com pacientes pediátricos, avaliando um método imunodiagnóstico baseado na resposta imune celular de IFN- $\gamma$  frente aos antígenos ESAT-6 e CFP-10 (MUNK et al., 2001; RAVN et al., 2005), que estão presentes no complexo *M. tuberculosis*. Espera-se que esse trabalho possa contribuir como uma alternativa diagnóstica, evitando os processos invasivos e tratamentos não apropriados, assim como para a diminuição da resistência terapêutica, auxiliando no controle da tuberculose infantil.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Avaliar um teste imunológico baseado na detecção dos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos frente a antígenos recombinantes específicos de *M. tuberculosis*, para diagnóstico da tuberculose infantil.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

a) Analisar os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pelas células sanguíneas induzidos por ESAT-6, CFP-10 e PPD *in vitro*, através de ELISA, em pacientes pediátricos com tuberculose-doença, com tuberculose latente e no grupo sem tuberculose.

b) Determinar a sensibilidade e a especificidade dos ensaios definindo qual o teste mais apropriado para diagnóstico dos pacientes pediátricos com TB.

#### **4 HIPÓTESE**

O ELISA para a dosagem de IFN- $\gamma$ , utilizando os antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10, apresenta altas sensibilidade e especificidade no diagnóstico da tuberculose infantil.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Seleção de indivíduos

Os pacientes e os indivíduos pertencentes ao grupo controle negativo, de ambos os sexos, com idades entre 3 e 15 anos e vacinados com BCG, foram selecionados segundo os critérios preconizados pela *American Thoracic Society* (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2001; INSTITUTO MATERNO INFANTIL PROFESSOR FERNANDO FIGUEIRA, 1996), durante o período de 2005 a 2007. O grupo de pacientes foi dividido em dois subgrupos, descritos abaixo:

1- Grupo com TB doença (n = 21): Formado por pacientes com confirmação de tuberculose doença (pulmonar ou extrapulmonar), que tiveram história epidemiológica de contato com adulto bacilífero, evidências clínicas e radiografia de tórax compatível com tuberculose além de TTI  $\geq 10$  mm ou com isolamento do *M. tuberculosis* em amostra biológica através de cultura.

2- Grupo com TB latente (n = 17): Composto por crianças com alto risco de ter infecção por *M. tuberculosis*, com história de contato com adulto tuberculoso bacilífero ou aqueles que apresentaram TTI  $\geq 10$  mm.

Ambos os grupos de TB doença e de TB latente foram selecionados para o estudo antes do início do tratamento.

3- Controles negativos (CN, n = 21): Participaram desse grupo crianças com TTI não reator e/ou com ausência de história de contato com adulto tuberculoso e sem evidências clínicas sugestivas de tuberculose.

As crianças participantes da pesquisa foram provenientes do Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP) e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC).

Não foi possível obter todos os resultados do TTI para os participantes dos grupos devido a problemas técnicos-operacionais e também ao não retorno dos mesmos após 72 h para leitura do exame.

O presente projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Recife (parecer nº 55/02) e do Instituto Professor Fernando Figueira-IMIP, Recife (anexos a e b). Os responsáveis pelas crianças e adolescentes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido no que se refere à participação no projeto (anexos c e d). As informações clínicas e epidemiológicas relevantes de cada paciente foram registradas em suas respectivas fichas epidemiológicas (anexo e) e foram repassadas para um banco de dados, para posterior análise estatística. Os critérios de exclusão foram aplicados, excluindo aqueles indivíduos com sorologia positiva para HIV, cardiopatia reumática, doença auto-imune e também pacientes que fizeram uso de corticóides por mais de 10 dias até três meses antes da participação na pesquisa ou aqueles que tinham idade inferior a 3 anos ou superior a 15 anos.

## 5.2 Métodos

### 5.2.1 Preparação celular e condições de cultura:

Foram coletados 3 mL de sangue de cada paciente ou controle, através de punção venosa, utilizando tubos Vacutainer de 5 mL com heparina sódica como anticoagulante (10 U/mL; *Becton Dickinson Vacutainer Systems*). As células sanguíneas foram cultivadas, em ambiente estéril, sem separação da camada mononuclear em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (1:3) da Sigma, com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), ambos os antibióticos da GIBCO. As placas de cultura foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Os sobrenadantes foram coletados após 120 h de cultivo, sendo imediatamente armazenados a -70°C para posterior dosagem de citocinas. Os antígenos PPD, ESAT-6 e CFP-10 foram usados em concentrações finais de 5 µg/mL, 3 µg/mL e 3 µg/mL, respectivamente. Poços contendo PMA/Iono (13-

acetato de forbol 12-miristato/ionomicina; da CALBIOCHEM) como mitógeno, nas concentrações de 5 µg/mL e 1 µg/mL respectivamente, foram usados para estimulação das células sanguíneas. Os antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10 foram doados pelo *Statens Serum Institute*, Copenhagen, Dinamarca e o PPD *in vitro* foi obtido comercialmente através desse Instituto.

#### 5.2.2 Dosagem de IFN- $\gamma$ (*kit Quantikine R&D Systems*) através de ELISA:

Às placas de ELISA já com o anticorpo de captura anti-IFN- $\gamma$  contidas no *kit*, foram adicionados 100 µL do diluente RD1-51. Em seguida, 100 µL dos sobrenadantes de cultura ou dos padrões, (IFN- $\gamma$  recombinante com concentrações máximas e mínimas de 1000 e 15,6 pg/mL, respectivamente), foram adicionados à placa, em cada poço, em duplicata. Após essa etapa, as placas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas 4 vezes com a solução de lavagem e foram adicionados 200 µL do conjugado IFN- $\gamma$  (anticorpo policlonal anti-IFN- $\gamma$  conjugado com peroxidase), em cada poço, sendo as placas incubadas por mais 2 h, em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas 4 vezes e foram adicionados 200 µL por poço da solução-substrato que é formada em iguais volumes por duas soluções: a solução A, que contém peróxido de hidrogênio e a solução B contendo tetrametilbenzidina. Novamente, placas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após esse período, os resultados foram revelados e reação foi parada com a adição de 50 µL de solução contendo ácido sulfúrico 2 N em cada poço. Todas as soluções utilizadas no ensaio foram provenientes do *kit Quantikine* (anexo F). Dois poços denominados de brancos (não contendo citocinas padrão nem os sobrenadantes) foram incluídos em cada placa como controle de *background* da reação. Em seguida, as placas foram lidas em fotômetro com comprimento de onda duplo: 450 e 595 nm e as densidades ópticas obtidas

através do *software* Microplate Manager versão 4.0 (BIO RAD LABORATORIES, 2000) e expressas em pg/mL.

### 5.2.3 Análise estatística e determinação da sensibilidade e especificidade dos ensaios:

A análise estatística foi feita utilizando-se de alguns parâmetros para uma melhor interpretação dos resultados, são eles:

- *Cut-off*: Indica um valor acima do qual os resultados são considerados positivos, correspondentes aos doentes. Resultados abaixo do *cut-off* são considerados negativos e indicam os não-doentes (FERREIRA; ÁVILA, 2001).
- Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*): utilizada para mostrar o equilíbrio entre a sensibilidade e especificidade de um teste e o seu melhor ponto de corte ou *cut-off* (FLETCHER et al., 1996).
- Sensibilidade: é a proporção entre os indivíduos doentes com teste positivo sobre a população doente, que é a soma dos indivíduos com teste positivo e aqueles com teste falso-negativo (FERREIRA; ÁVILA, 2001).
- Especificidade: é a proporção entre os indivíduos sem a doença com teste negativo sobre a população saudável, que é a soma dos indivíduos com teste negativo e aqueles com teste falso-positivo (FERREIRA; ÁVILA, 2001).
- *Likelihood Ratio* (LR): Indica a probabilidade de resultado em pessoas com a doença dividida pela probabilidade do mesmo resultado em pessoas sem a doença. Expressa quantas vezes mais (LR +) ou menos (LR -) é provável encontrar um resultado de um

teste em pessoas doentes comparadas com as não-doentes (FLETCHER et al. 1996).

- Índice *Kappa* (*k*): Expressa a confiabilidade de um teste diagnóstico, refletindo o grau de concordância entre observadores ou de medidas da mesma variável categórica que não acontece ao acaso. De acordo com a Tabela 1 (LANDIS E KOCH, 1977), quanto mais próximo de 1 o índice *Kappa*, melhor a concordância entre duas avaliações diagnósticas.

**Tabela 1:** Escala de concordância do *Kappa*.

<i>Kappa</i>	Concordância
<0,00	Nenhuma
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Fonte: Landis & Koch, 1977

A área sob a curva ROC, o *cut-off* e suas respectivas sensibilidades e especificidades para os testes ESAT-6, CFP-10 e PPD *in vitro* foram estimados através do *software* estatístico SPSS Base versão 13.0 (SPSS, 2004), com intervalos de confiança de 95%. Os gráficos da curva ROC mostram a sensibilidade versus 1-especificidade, de forma que as áreas geradas abaixo da curva (AACs) variem de 0,5 a 1,0, sendo os valores dos testes mais próximos de 1,0 os que têm maior poder discriminatório. O índice *Kappa* foi obtido através do *software* Epi info, versão 6.04 e expressa a concordância entre a classificação dos pacientes e os resultados obtidos das dosagens dos ensaios.

As LRs + e – de cada teste foram calculadas como descrito por Sackett et al. (1991).

As médias das dosagens de IFN- $\gamma$  dos grupos estudados, para cada teste diagnóstico, foram analisadas utilizando o Teste *t* de *Student* não pareado através do *software* Stat View versão 5.1 (SAS INSTITUTE, 1998).

As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$  para todas as análises realizadas.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Análise descritiva dos indivíduos que compõem os grupos de estudo da pesquisa: TB latente, TB doença e CN.

De acordo com a análise descritiva dos grupos de estudo, podemos observar que as médias das idades dos indivíduos para os três grupos mantiveram-se muito semelhantes entre si, não havendo variação significativa entre elas (Tabela 2).

O percentual de indivíduos do sexo masculino foi maior no grupo TB latente, totalizando 12 dos 17 pacientes estudados (70,5%). Nos grupos CN e TB doença, o percentual observado foi de 38% e 47,6% respectivamente.

O resultado do TTI só foi obtido de alguns indivíduos, devido a problemas técnicos-operacionais e principalmente a dificuldades encontradas pelos responsáveis dos pacientes em retornar ao hospital com as crianças para a leitura do exame após 72 h da aplicação do PPD intradérmico. Do grupo TB latente, 8 (47%) dos 17 pacientes realizaram o exame e a média dos resultados ficou em torno de  $10 \pm 4,3$  mm. Em relação, ao grupo com TB doença, o TTI foi realizado em 52,3% dos pacientes e a média dos resultados obtidos foi de  $14 \pm 6,7$  mm. Em relação ao grupo CN, o resultado desse exame só foi possível ser obtido de 9 indivíduos (42,8%) e a média observada foi de 0 mm (não reator). Nesse grupo, a dificuldade em se obter o resultado do TTI ocorreu devido ao fato de que as crianças não necessitavam realizar o exame no ambulatório já que não eram suspeitas de TB, logo os médicos que as atendiam usualmente não o solicitavam. As crianças do grupo CN, que tinham o resultado do TTI, foram provenientes da enfermaria cardiológica do IMIP e embora elas não tenham história epidemiológica de contato com adulto bacilífero nem sinais e sintomas compatíveis com TB, se encaixando nos nossos critérios para seleção do grupo CN, o exame era solicitado rotineiramente como requisito pré-operatório.

Em relação à presença ou ausência de sinais e sintomas, 11 dos 17 pacientes do grupo TB latente (64%) apresentaram alguma manifestação clínica inespecífica para TB doença. No grupo TB doença foram encontradas manifestações clínicas sugestivas de TB em todos os pacientes (100%). Essas manifestações incluíam febre por mais de três dias, emagrecimento, tosse persistente por mais de três semanas, falta de ar, cansaço, sudorese noturna e presença de linfonodos hiperplásicos.

No grupo controle, nenhuma manifestação clínica relacionada ao sistema respiratório foi observada nestes indivíduos.

Nos indivíduos com TB latente, a história epidemiológica de contato com adulto bacilífero esteve presente em cerca de 88% dos indivíduos. O restante desse grupo (12%) foi selecionado através do resultado do TTI. No grupo TB doença, 18 pacientes (85,7%) apresentaram história de contato com adulto tuberculoso. Em relação ao grupo CN, não houve história de contato com adulto com TB, segundo os responsáveis pelas crianças.

O exame complementar de radiografia de tórax foi realizado em alguns pacientes, tanto do grupo TB latente quanto TB doença. Dos 6 indivíduos com TB latente que se submeteram à radiografia, foram observadas alterações radiológicas inespecíficas em apenas 1 exame (16%). No grupo TB doença, 14 pacientes foram submetidos ao exame, sendo encontradas alterações sugestivas de TB em 11 destes (75,5%).

Todas as crianças do estudo eram vacinadas com BCG, com constatação da presença de cicatriz. Vale citar que no grupo TB doença, houve dois casos de TB extrapulmonar (9,5% do total), sendo um de TB miliar e outro de TB óssea.

**Tabela 2:** Análise descritiva dos grupos de estudo da pesquisa.

<b>Variável</b>	<b>CN<sup>1</sup></b> (n = 21)	<b>TB latente <sup>1</sup></b> (n = 17)	<b>TB doença <sup>1*</sup></b> (n = 21)
<b>Idade (anos)</b> Média ± DP	9,7 ± 2,4	7,8 ± 2,7	10,2 ± 3,0
<b>Masculino (%)</b>	8 (38%)	12 (70,5%)	10 (47,6%)
<b>Feminino (%)</b>	13 (62%)	5 (29,5%)	11 (52,4%)
<b>TTI</b> n realizados (%) / média ± DP mm	9 (42,8%) / 0	8 (47%) / 10 ± 4,3	11 (52,3%) / 14 ± 6,7
<b>Sinais e sintomas</b> n presença (%) / n ausência	0 (0%) / 21	11 (64%) / 6	21 (100%) / 0
<b>História epidemiológica de contato</b> n presente (%) / n ausente	0 (0%) / 21	15 (88%) / 2	18 (85,7%) / 3
<b>Raio X</b> realizados / alterados (%)	-	6 / 1 (16%)	14 / 11 (75,5%)

Fonte: Tabela de elaboração própria.

Notas: <sup>1</sup> Vacinação de BCG e constatação da presença da cicatriz em todas as crianças.

\* 2 pacientes com tuberculose extrapulmonar: 1 caso de TB miliar e 1 de TB óssea.

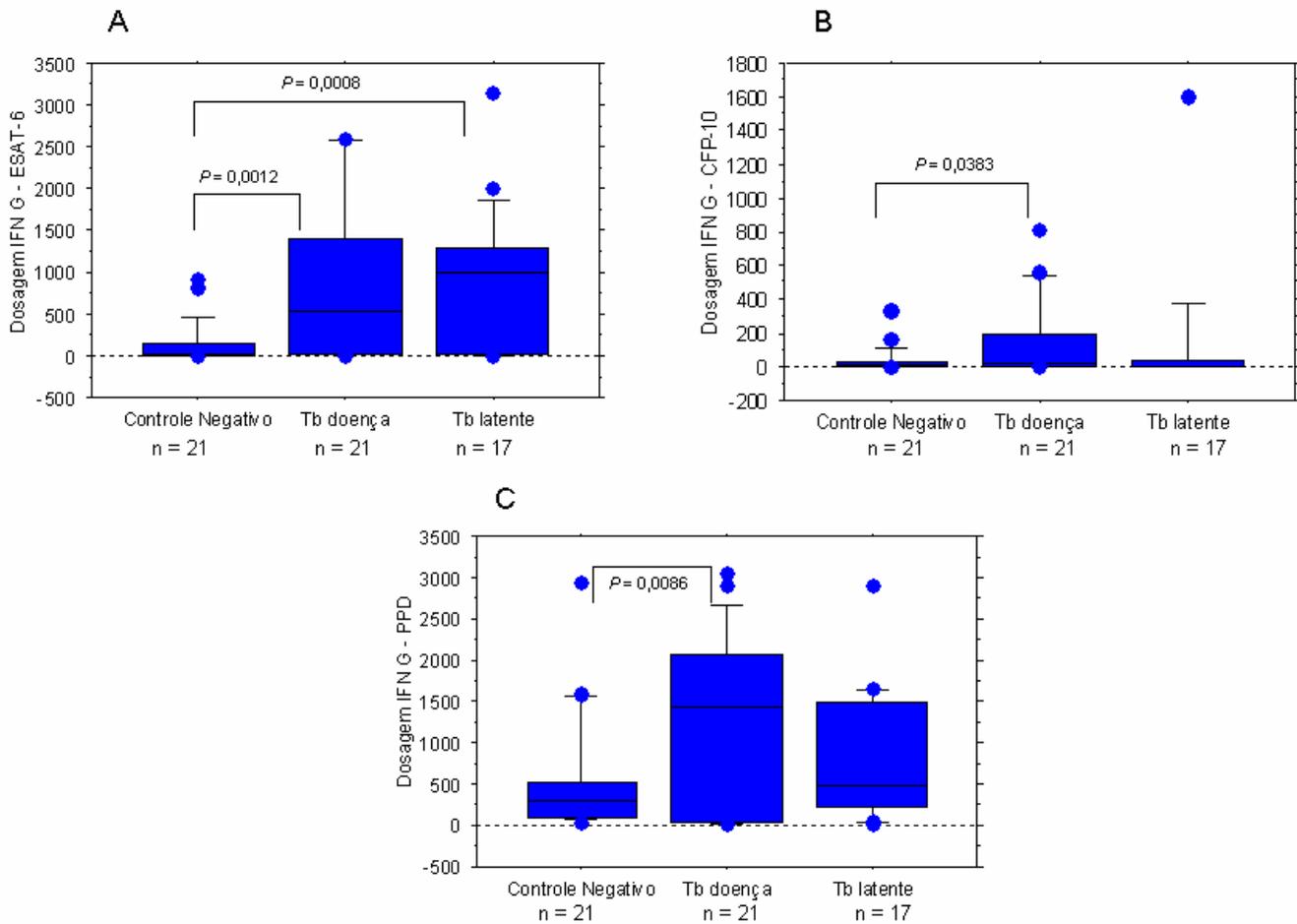
- Não houve necessidade de realização do exame.

DP = Desvio Padrão

## 6.2 Discriminação entre indivíduos com TB latente e CN.

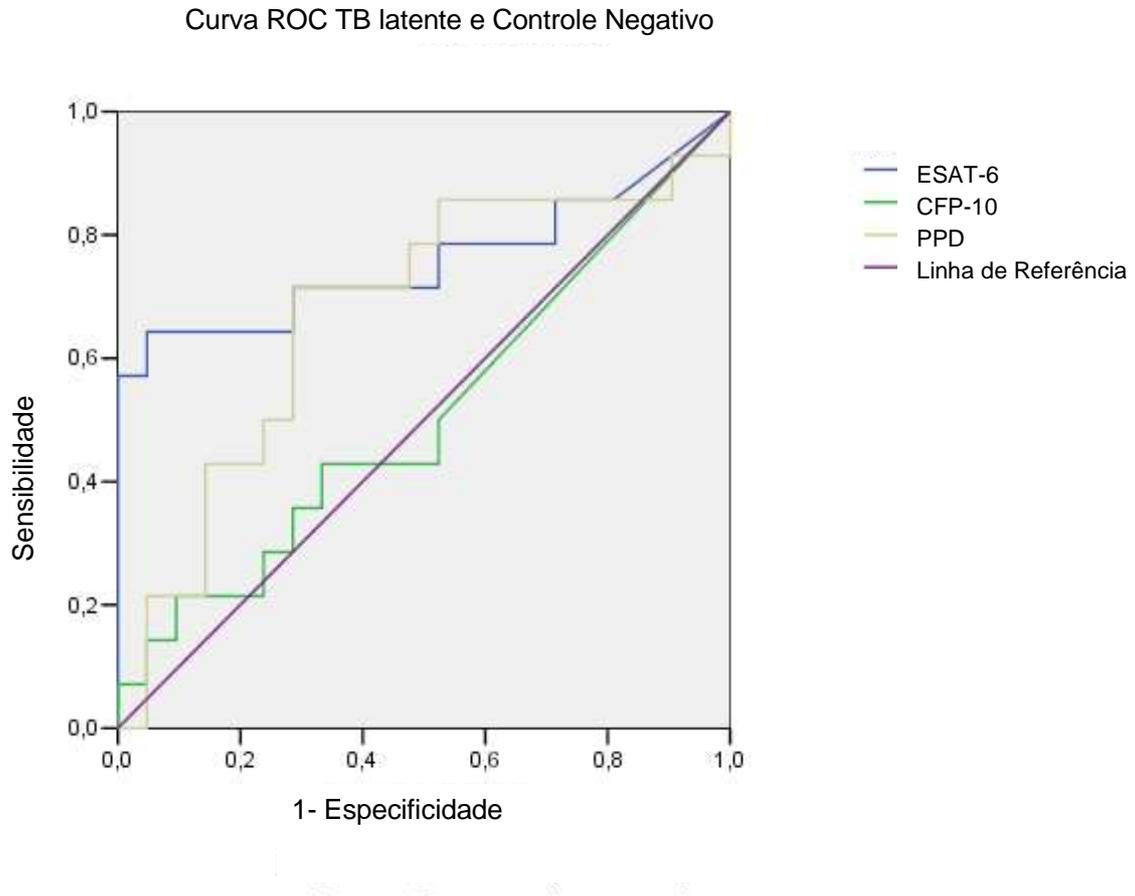
De acordo com nossos resultados analisados pelo Teste *t* de Student, foi observada diferença estatística entre as médias das dosagens de IFN- $\gamma$  entre os grupos TB latente e CN apenas no teste que utilizou o ESAT-6 como antígeno ( $P = 0,0008$ ), Figura 5A. Não foi observada diferença estatística entre TB latente e CN para os demais antígenos utilizados (Figuras 5B e C).

Os antígenos ESAT-6, CFP-10 e PPD *in vitro* apresentaram AAC's na curva ROC com valores de 0,731, 0,510 e 0,629, respectivamente (Figura 6), sendo observada diferença estatística entre os grupos com TB latente e controle negativo também apenas para o teste com o antígeno ESAT-6 ( $P = 0,015$ ). O índice *Kappa* para este teste foi de 0,559 ( $P < 0,001$ ), sendo considerado razoável de acordo com a Tabela 1. O *cut-off*, a sensibilidade e a especificidade encontrados para este teste, bem como as *Likelihood Ratio* + e – podem ser observados na Tabela 3.



**Figura 5:** Níveis de IFN- $\gamma$  após estimulação com ESAT-6 (A), CFP-10 (B) e PPD (C) obtidos de pacientes com TB doença (n = 21), TB latente (n = 17) e controles negativos - CN (n=21).  
Fonte: Figura de elaboração própria.

Nota: Houve diferença estatística entre o grupo CN e TB latente ( $P = 0,0008$ ) e entre CN e TB doença ( $P = 0,0012$ ) quando estimulados com ESAT-6. Diferença estatística entre os grupos CN e TB doença ( $P = 0,0383$ ;  $P = 0,0086$ ) também foi observada quando estimulados com CFP-10 e PPD, respectivamente. Não houve diferença significativa entre o grupo CN e TB latente para esses dois antígenos.



**Figura 6:** A curva ROC demonstra a capacidade dos testes ESAT-6 ( $AAC = 0,731$ ;  $P = 0,015$ ), CFP-10 ( $AAC = 510$ ;  $P = 0,92$ ) e PPD *in vitro* ( $AAC = 0,629$ ;  $P = 0,177$ ) de discriminarem pacientes com TB latente dos controles negativos.

Fonte: Figura de elaboração própria.

Nota: Quanto maior a área abaixo da curva, melhor o poder discriminatório do teste.

**Tabela 3:** Desempenho do teste ESAT-6 para detecção de indivíduos com tuberculose latente.\*

Teste	AAC (IC 95%)	Cut-Off (pg/ml)	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-	Kappa
ESAT-6 ( <i>P</i> = 0,015)	0,731 (0,641-0,821)	873,244	58,8 (33,5 – 80,6)	95,2 (74,1 – 99,8)	12,25	0,43	0,559

Fonte: Tabela de elaboração própria.

Notas: \*Dados mostrados apenas do teste que apresentou diferença estatística entre os grupos.

AAC: Área Abaixo da Curva ROC

IC: Intervalo de Confiança

LR+: para resultados com probabilidade de serem positivos

LR-: para resultados com probabilidade de serem negativos

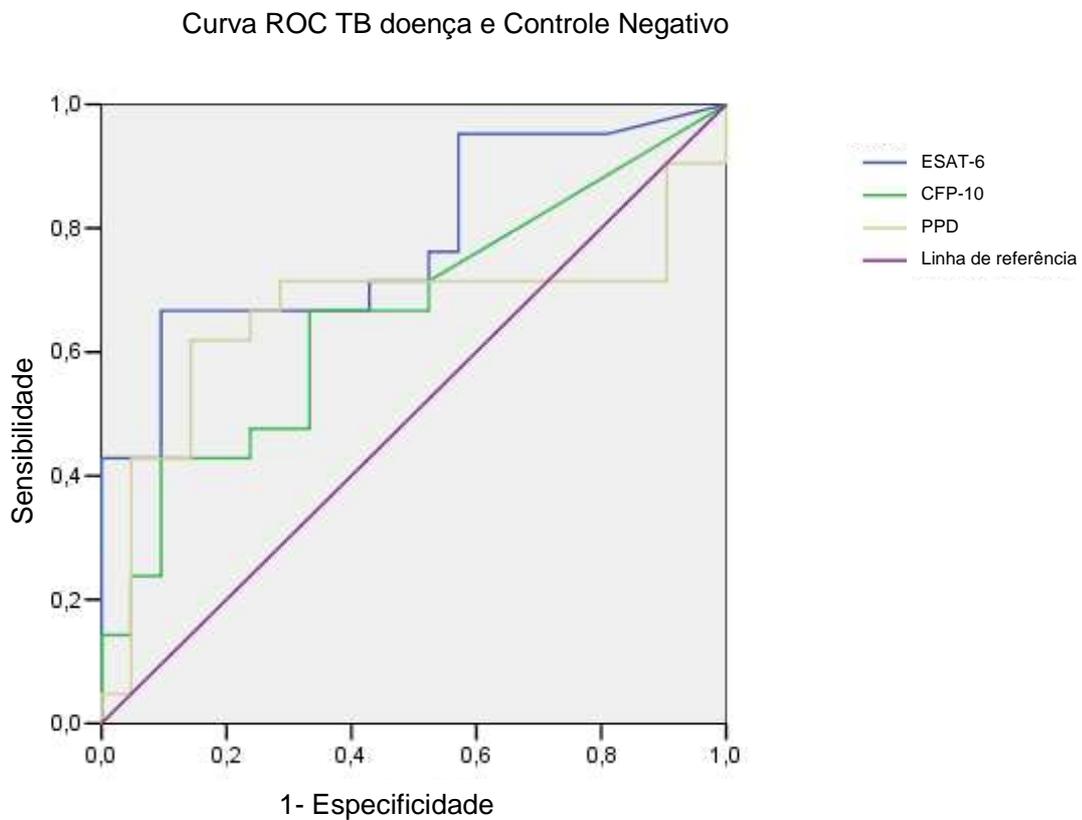
Cut-Off: Valor acima do qual a amostra é considerada positiva.

### 6.3 Discriminação entre pacientes com TB doença e CN.

Foi encontrada diferença estatística entre as médias das dosagens de IFN- $\gamma$  entre os grupos em questão para os três antígenos testados: ESAT-6 ( $P = 0,0012$ ), CFP-10 ( $P = 0,0383$ ) e PPD ( $P = 0,0086$ ), quando foi utilizado o Teste  $t$  de Student, Figura 5 (A, B e C). Foi observado ainda que os menores valores das dosagens de IFN- $\gamma$  para todos os grupos ocorreram quando o estímulo utilizado foi o CFP-10. Por outro lado, os maiores níveis de IFN- $\gamma$  foram obtidos em resposta ao antígeno PPD para todos os grupos, inclusive no CN.

De acordo com a análise da curva ROC, os resultados sugerem que o antígeno ESAT-6 (AAC = 0,780;  $P = 0,002$ ) é o único que apresenta capacidade de detecção de pacientes com TB doença (Figura 7). Também foi demonstrado que o ESAT-6 teve o melhor desempenho na discriminação entre doentes e não doentes, com boa sensibilidade e alta especificidade (Tabela 4). O *cut-off* e as LR + e – também estão expressos nessa tabela. O índice *Kappa* de concordância para este teste foi de 0,571 ( $P < 0,001$ ).

Em relação aos demais antígenos testados, não foi observada significância estatística entre os grupos, através da análise da curva ROC (Figura 7).



**Figura 7:** Demonstração da capacidade dos testes ESAT-6 ( $AAC = 0,780$ ;  $P = 0,002$ ), CFP-10 ( $AAC = 0,660$ ;  $P = 0,076$ ) e PPD *in vitro* ( $AAC = 0,662$ ;  $P = 0,072$ ) de discriminarem pacientes com TB doença do grupo CN.

Fonte: Figura de elaboração própria.

Nota: Quanto maior a área abaixo da curva no gráfico, melhor o poder discriminatório do teste.

**Tabela 4:** Desempenho do teste ESAT-6 para detecção de pacientes com tuberculose doença.\*

Teste	AAC (IC 95%)	Cut-Off (pg/ml)	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-	<i>Kappa</i>
ESAT-6 ( <i>P</i> = 0,002)	0,780 (0,707-0,853)	230,900	66,7 (43,1 – 84,5)	90,5 (68,2 – 98,3)	7,02	0,36	0,571

Fonte: Tabela de elaboração própria.

Notas: \* Foi apresentado apenas o teste onde houve diferença estatística entre os grupos.

AAC: Área Abaixo da Curva ROC

IC: Intervalo de Confiança

LR+: para resultados com probabilidade de serem positivos

LR-: para resultados com probabilidade de serem negativos

Cut-Off: Valor acima do qual a amostra é considerada positiva.

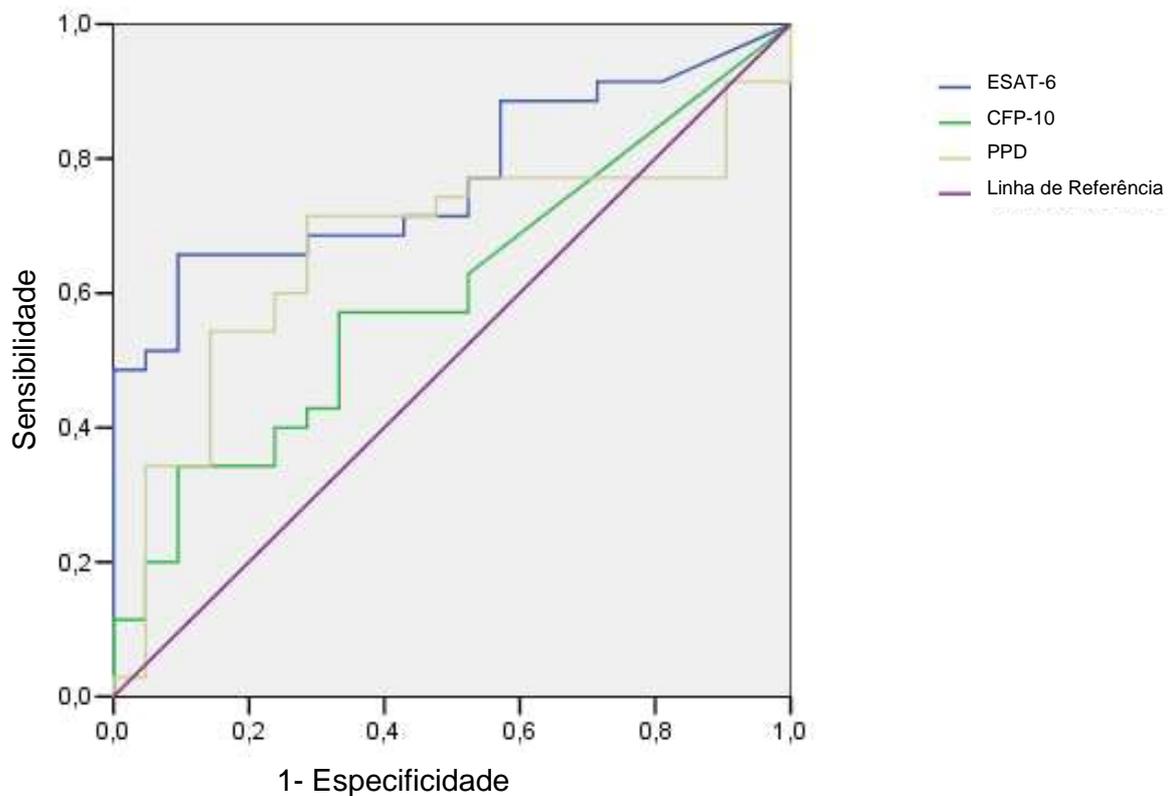
#### **6.4 Discriminação entre indivíduos com tuberculose (latente ou doença) do grupo controle negativo (CN).**

Para uma melhor avaliação da capacidade diagnóstica dos testes, os grupos com TB latente e TB doença foram reunidos em um único grupo ( $n = 38$ ), com o objetivo de analisar o poder discriminatório entre os pacientes com tuberculose, seja na fase inicial ou crônica da doença, daqueles sem a infecção (CN), vacinados com BCG.

Os resultados obtidos mostraram que as AACs para ESAT-6, CFP-10 e PPD correspondem aos valores de 0,758, 0,600 e 0,647, respectivamente (Figura 8). Observou-se que o teste que utiliza o ESAT-6 como antígeno apresentou maior área no gráfico da curva ROC ( $P = 0,001$ ) e maiores sensibilidade e especificidade (Tabela 5), não diferindo da análise dos resultados encontrados quando os grupos com tuberculose (latente e doença) foram comparados separadamente com os controles negativos (Tabelas 3 e 4, respectivamente). Esses resultados demonstram um bom poder discriminatório do teste entre pacientes com TB, inclusive no início da infecção, daqueles indivíduos sem a infecção. O índice *Kappa* encontrado para este teste foi de 0,476 ( $P < 0,001$ ).

Não foi observada diferença estatística entre as médias das dosagens de IFN- $\gamma$  entre os grupos TB latente e TB doença, em relação a todos os antígenos estudados, segundo o teste *t* de Student não pareado (Figura 5 A, B e C).

Curva ROC TB (latente + doença) e Controle Negativo



**Figura 8:** Este gráfico demonstra a capacidade dos testes ESAT-6 (AAC = 0,758;  $P = 0,001$ ), CFP-10 (AAC = 0,600;  $P = 0,214$ ) e PPD *in vitro* (AAC = 0,647;  $P = 0,063$ ) de diagnosticarem pacientes com tuberculose (latente ou doença).

Fonte: Figura de elaboração própria.

Nota: Quanto maior a área abaixo da curva no gráfico, melhor o poder discriminatório do teste entre doentes e não doentes.

**Tabela 5:** Desempenho do teste ESAT-6 para detecção de pacientes com tuberculose (doença ou latente).\*

Teste	AAC (IC 95%)	Cut-Off (pg/ml)	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-	Kappa
ESAT-6 ( <i>P</i> = 0,001)	0,758 (0,697-0,819)	230,900	63,2 (46,0 – 77,7)	90,5 (68,2 – 98,3)	6,65	0,40	0,476

Fonte: Tabela de elaboração própria.

Notas: \*Foi apresentado apenas o teste onde houve diferença estatística entre os grupos.

AAC: Área Abaixo da Curva ROC

IC: Intervalo de Confiança

LR+: para resultados com probabilidade de serem positivos

LR-: para resultados com probabilidade de serem negativos

Cut-Off: Valor acima do qual a amostra é considerada positiva.

## 7 DISCUSSÃO

O diagnóstico precoce de qualquer doença infecciosa, inclusive da tuberculose, é de extrema importância, pois pode-se, dessa forma, evitar a evolução da doença para formas crônicas que são mais debilitantes, instituindo-se o tratamento precoce nos indivíduos recentemente infectados e assim, conter a transmissão da infecção para indivíduos saudáveis. Além disso, pode ser uma ferramenta muito útil no estudo do perfil epidemiológico da enfermidade em uma população definida, permitindo aos serviços de saúde intervir de acordo com as necessidades locais e escolher as ações de controle mais pertinentes.

O padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose em adultos continua sendo a confirmação do patógeno através da cultura microbiológica. No entanto é um método que necessita de pelo menos 2 meses para se obter o resultado, além de apresentar baixa sensibilidade. Outro método de escolha utilizado para diagnosticar TB é a baciloscopia, que também apresenta como limitações a baixa sensibilidade além de não ser específico para *M. tuberculosis* (MARAIS; PAI, 2007).

Em crianças, a TB é ainda mais difícil de ser diagnosticada devido à ausência de um padrão-ouro aplicável, já que esses pacientes são paucibacilares, dificultando a confirmação diagnóstica através da cultura e da baciloscopia. No entanto, para o diagnóstico da TB em crianças faz-se uso da tríade: história epidemiológica de contato com adulto bacilífero, quadro clínico e TTI reator (CONNELL et al., 2006; STARKE, 1993). Entretanto, em áreas endêmicas, a confirmação da TB nesses pacientes através desses critérios possui acurácia reduzida devido a vários fatores. Um deles é que a grande maioria das crianças já teve contato com adulto tuberculoso, tornando-se difícil selecionar as crianças que de fato correm o risco de desenvolver a doença (SCHAAF et al., 2003).

Outro fator importante é que o TTI em crianças costuma ser reator, já que a imunidade estimulada pela vacinação por BCG (medida adotada em países com TB endêmica, inclusive no Brasil) induz a reatividade ao PPD, tendo uma duração

de até 15 anos, com isso dificultando a distinção entre quem é reator devido à infecção pelo *M. tuberculosis* daquele indivíduo que reage devido à vacinação prévia com BCG (COMSTOCK, 1975). O PPD, antígeno utilizado no TTI, além de compartilhar epítomos antigênicos com *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. bovis* (BCG), também o faz com diversas espécies de micobactérias ambientais, provocando reações cruzadas e diminuindo a especificidade do teste (KARAM et al., 2008). Além disso, o TTI tem a sua sensibilidade diminuída em pacientes imunocomprometidos, pessoas recentemente infectadas e crianças muito jovens (ANDERSEN et al., 2000; TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007). Em áreas de alta incidência de TB, a baixa sensibilidade e especificidade do TTI podem resultar numa falsa estimativa do real risco de transmissão da doença (NAKAOKA et al., 2006). Nesses casos, o diagnóstico da TB infantil muitas vezes é baseado apenas nos sinais e sintomas, que na maioria das vezes são inespecíficos, e na interpretação de radiografias de tórax, que tem caráter subjetivo (SCHAAF et al., 2003).

Devido a esses inconvenientes, vários métodos têm sido estudados na tentativa de diagnosticar precocemente casos de tuberculose, dentre eles, os imunológicos têm se destacado para esse fim (NISHIMURA et al., 2008). Apesar de haver vários estudos nessa área, a maioria está focada no diagnóstico de TB em adultos em áreas de baixa prevalência, existindo poucos trabalhos na literatura que estudam o diagnóstico precoce da TB em crianças através desses métodos, sobretudo onde a TB é endêmica (NAKAOKA et al., 2006). A vantagem de um teste diagnóstico imunológico está na sua capacidade de demonstrar se o paciente possui uma infecção latente ou ativa, sem a necessidade de detecção do bacilo de Koch no escarro ou em alguma outra amostra biológica do paciente (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007).

Diante disso, e percebendo a importância de se estabelecer um método diagnóstico eficiente para a TB, seja latente ou doença, em crianças e também a carência de estudos nessa área, esse trabalho propõe avaliar a capacidade dos antígenos recombinantes específicos ESAT-6 e CFP-10 e também do PPD *in vitro* para diagnóstico da TB infantil.

Nossos resultados mostraram que houve diferença estatística significativa entre as médias das dosagens de IFN- $\gamma$  dos grupos TB latente e CN ( $P = 0,0008$ ) e TB doença e CN ( $P = 0,0012$ ), quando o antígeno utilizado no teste foi o ESAT-6.

Quando a análise foi feita através da curva ROC, também foi encontrada diferença estatística entre os grupos TB latente e CN, entre TB doença e CN e entre TB (latente + doença) e CN, indicando que testes imunológicos baseados na resposta de IFN- $\gamma$  contra o antígeno ESAT-6 seja uma ferramenta útil no diagnóstico de TB infantil, corroborando com dados de Arend et al., 2000a e 2000b, Brock et al., 2001 e Nakaoka et al., 2006. Vale salientar que o ESAT-6 foi o único antígeno capaz de diferenciar pacientes com TB latente dos CN, concordando com dados de Kunst, 2006.

Apesar de alguns estudos mostrarem que a acurácia de testes baseados em ESAT-6 não seja muito boa em países onde há alta prevalência de TB (KUNST, 2006), nossos resultados apresentaram médias sensibilidades e altas especificidades no que diz respeito ao diagnóstico da TB infantil, tanto entre o grupo latente e CN ( $S = 58,8\%$ ;  $E = 95,2\%$ ), entre o grupo com TB doença e CN ( $S = 66,7\%$ ;  $E = 90,5\%$ ) e entre os dois grupos com TB e CN ( $S = 63,2\%$ ;  $E = 90,5\%$ ).

Embora a sensibilidade encontrada para diagnóstico de pacientes infantis com TB latente não ter sido muito alta, corroborando com resultados encontrados por Connell et al. (2006), a especificidade do nosso ensaio foi elevada. Esse fato tem valor principalmente em países onde a TB é endêmica e é necessário um diagnóstico de exclusão para TB, já que a grande maioria das crianças provavelmente já teve contato com adulto tuberculoso e/ou foi vacinada com BCG. Um teste específico com resultado negativo é capaz de selecionar criteriosamente crianças não infectadas daquelas com suspeita de infecção. No entanto, testes positivos podem ajudar a identificar focos latentes de TB e possíveis candidatos à quimioprofilaxia (RAVN et al., 2005).

Já em relação ao diagnóstico de crianças com TB doença, a sensibilidade do ensaio mostrou-se mais elevada (66,7%), resultados esses muito próximos aos encontrados por Van Pinxteren et al. (2000), mas não apresentou diferença

estatística entre dados de sensibilidade do TTI encontrados na literatura que ficam em torno de 70-75%, em adultos residentes em países endêmicos como o Brasil (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007). No entanto, a especificidade desse ensaio foi bastante elevada, em torno de 90%, corroborando com resultados encontrados por vários autores (AREND et al, 2000a, 2000b; GOLETTI et al., 2005; MORI et al., 2004; SCARPELLINI et al., 2004; VAN PINTXTEREN et al., 2000), sugerindo que esse método pode ser útil no diagnóstico da TB doença em crianças.

Em relação ao grupo TB (latente + doença) e CN, a sensibilidade manteve-se em torno de 63% e a especificidade continuou elevada, em torno de 90%. Alguns estudos imunológicos que utilizaram o ESAT-6 para diagnóstico da TB (latente ou doença) apresentaram sensibilidade maior e especificidade semelhante quando comparados com os nossos achados. Esse fato pode ter ocorrido devido ao *n* amostral dos outros estudos (MORI et al., 2004; SCARPELLINI et al., 2004) ter sido maior que o nosso, uma vez que a maioria dessas pesquisas foi realizada com adultos, o que favorece um estudo com maior número de indivíduos (NISHIMURA et al., 2008). Por outro lado, essas pesquisas foram realizadas em países com baixa prevalência de TB, onde também existem diferenças nas características das cepas das micobactérias, com variação dos níveis de expressão de antígenos pelos bacilos, além de diferentes características imunológicas da população, incluindo produção de citocinas e/ou polimorfismo genético do HLA, e também dos receptores de citocinas. Todos esses fatores podem levar às variações de sensibilidade e especificidade encontradas para um mesmo teste, em diferentes populações (AREND et al., 2000a; AREND et al., 2001; MORI et al., 2004). Além disso, diferenças na preparação dos antígenos e nas concentrações utilizadas nos ensaios, diferentes critérios de exclusão e a escolha do *cut-off* podem também influenciar na sensibilidade e na especificidade do teste (AREND et al., 2000a; GOLETTI et al., 2005).

Estudos de Ravn et al. (1999) indicaram que em países com baixa endemicidade para TB, o ESAT-6 é altamente específico e sensível para o diagnóstico da TB ativa e que indivíduos saudáveis, mesmo vacinados com BCG não reconhecem esse antígeno. Já em áreas endêmicas, o ESAT-6, apesar de ter

uma sensibilidade mais baixa (SOYSAL et al., 2008), se mostrou apto na detecção de casos de TB latente, resultados esses que estão de acordo com os encontrados em nosso estudo, onde houve diferença estatística entre os grupos TB latente e CN. No entanto, estudos de Arend et al. (2000b) afirmaram que a resposta elevada de IFN- $\gamma$  contra ESAT-6 em pacientes suspeitos de infecção por TB está associada com o risco de desenvolver doença ativa, sendo um indicador de infecção latente.

No presente trabalho, não foi possível distinguir os grupos TB latente e TB doença com nenhum dos antígenos testados, concordando com dados de Ravn et al., 2005. Diante disso, é importante salientar que esses testes imunológicos baseiam-se no fato de que as células T (de memória) de indivíduos previamente sensibilizados por antígenos de *M. tuberculosis* liberam IFN- $\gamma$  e que quando reestimuladas com antígenos específicos, nesse caso ESAT-6 e CFP-10, vão produzir mais IFN- $\gamma$  em resposta a esses antígenos, podendo ser indicador de uma sensibilização prévia (infecção latente), mas não necessariamente de uma doença ativa (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007).

Em relação ao antígeno CFP-10, apesar de ter havido diferença estatística entre as médias das dosagens de IFN- $\gamma$  entre os grupos TB doença e CN ( $P = 0,0383$ ) de acordo com o Teste *t* de Student, os níveis dessa citocina se mantiveram muito baixos nos três grupos quando comparados com o antígeno ESAT-6. Hill et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes, onde a resposta de IFN- $\gamma$  observada contra o antígeno CFP-10 foi menor do que aquela encontrada contra ESAT-6.

Quando a análise da curva ROC foi realizada, nenhuma diferença estatística entre os grupos foi observada, indicando que o antígeno CFP-10 não seja uma boa ferramenta diagnóstica de TB infantil. Em trabalhos de Arend et al. (2000b), foi observado que a maioria dos suspeitos de TB respondeu ao antígeno ESAT-6, mas não ao CFP-10. Em nosso estudo, mesmo entre o grupo com TB doença e o grupo CN, onde houve diferença estatística na média das dosagens de IFN- $\gamma$  contra o antígeno CFP-10, essa resposta não foi tão alta quanto à encontrada por outros autores (MORI et al., 2004; TSIOURIS et al., 2006). Uma

possível razão para este fato é que a presença do gene HLA-DR15, que é o maior subtipo DR2, está fortemente associada com altas respostas dos linfócitos TCD4+ contra o antígeno CFP-10 (AREND et al., 2000a), indicando uma maior susceptibilidade à infecção por *M. tuberculosis* em populações onde esse gene é expresso (SELVARAJ et al., 1998). A ausência de expressão desse gene numa determinada população faz com que a resposta contra o antígeno CFP-10 seja diminuída ou mesmo ausente, já que diferentes populações apresentam diferenças no processamento de antígenos e no seu reconhecimento de epítomos antigênicos pelas células T. Um epítomo pode ser fortemente reconhecido por uma determinada população, sendo considerado imunogênico e não ser reconhecido por outra, quando o gene que codifica o subtipo de HLA responsável pela sua expressão está ausente ou inativo (RAVN et al., 1999). Esse fato explica o polimorfismo genético encontrado entre as populações (HILL et al., 2005) e as diferenças entre as respostas imunes observadas contra o mesmo antígeno.

Foram utilizadas proteínas recombinantes ESAT-6 e CFP-10 em vez de peptídeos sintéticos extraídos dessas proteínas no nosso trabalho. Apesar do custo das proteínas recombinantes ser mais elevado, a acurácia do teste é maior, já que alguns peptídeos sintéticos selecionados podem ter caráter imunogênico em uma população, mas não em outra, alterando dessa forma a sensibilidade e a especificidade do ensaio, podendo gerar resultados falso-negativos (RAVN et al., 1999).

Em relação ao PPD *in vitro*, foi encontrada diferença estatística entre as médias das dosagens de IFN- $\gamma$  entre os grupos TB doença e CN ( $P = 0,0086$ ), através do Teste *t* de Student. Em relação ao grupo TB latente e CN não foi encontrada diferença estatística, já que as médias das dosagens dos dois grupos foram bastante elevadas. No entanto, a análise das curvas ROC para os grupos TB latente e CN, TB doença e CN e TB (latente + doença) e CN não apresentou diferença significativa entre nenhum dos grupos ( $P > 0,05$ ). Este achado indica que o teste, apesar de apresentar uma razoável sensibilidade, apresentou baixa especificidade para os três grupos (cerca de 70% - dados não mostrados) em contraste com ESAT-6. Esse fato sugere que o PPD *in vitro* não seja muito útil

para a discriminação de crianças com TB, daquelas vacinadas com BCG ou que tiveram contato com micobactérias ambientais, corroborando com dados encontrados por Brock et al. (2001), cuja especificidade demonstrada foi ainda menor, em torno de 53%, onde metade dos indivíduos vacinados respondeu ao PPD *in vitro*. Especificidades baixas para testes que utilizam o PPD *in vitro* como antígeno também foram encontradas por Goletti et al. (2005). Esse fato se deve principalmente ao antígeno PPD compartilhar epítomos antigênicos com *M. bovis* BCG e com outras micobactérias ambientais, fazendo com que testes baseados nesse antígeno, seja TTI ou *in vitro*, apresentem uma especificidade limitada (RAVN et al., 2005).

De acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, é sugerido que o teste ESAT-6 seja o mais apropriado para o diagnóstico da TB infantil, tanto latente como doença, já que apresenta boa sensibilidade e elevada especificidade. Além disso, não apresenta reações cruzadas com vacinação BCG nem com a maioria das micobactérias ambientais, podendo ser uma ferramenta auxiliar útil no diagnóstico precoce da TB em crianças, quando associado aos dados epidemiológicos e de exames clínicos.

## 8 CONCLUSÕES

- Ao analisarmos a resposta de IFN- $\gamma$  contra antígenos recombinantes específicos do complexo *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10), os resultados indicam que o único teste que é capaz de discriminar TB latente de CN em crianças é o que utiliza ESAT-6 como antígeno. Esse teste apresentou uma elevada especificidade, sendo, portanto capaz de discriminar crianças saudáveis vacinadas com BCG daquelas infectadas com TB, mas que não desenvolveram a doença ativa.
- O ESAT-6 também foi o único teste capaz de diagnosticar crianças com TB doença.
- O teste CFP-10 não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados, indicando não ser uma boa ferramenta diagnóstica para TB infantil.
- O teste PPD *in vitro* não parece ser um bom método para discriminar doentes de não doentes devido à sua baixa especificidade, inclusive em áreas endêmicas. Esse fato ocorre provavelmente devido às reações cruzadas em crianças vacinadas com BCG e também naquelas que tiveram contato com micobactérias ambientais, como relatado na literatura.
- O teste que apresentou melhor desempenho no diagnóstico da TB infantil, com maior discriminação entre crianças com TB (latente ou doença) e crianças saudáveis vacinadas com BCG (CN) foi o ESAT-6, sugerindo que esse antígeno pode ser promissor no que se refere ao imunodiagnóstico da TB em crianças, especialmente daquelas provenientes de áreas endêmicas.
- O ESAT-6 pode ser utilizado em inquéritos epidemiológicos na tentativa de estimar a real incidência e prevalência da TB no Brasil.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adult and children. American Thoracic Society Guidelines, New York, 2001.

ANDERSEN, P. et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet, Londres, v. 356, s. (9235), p. 1099-1104, 2000.

AREND, S. M. et al. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* – specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington, v. 8, p. 1089-1096, 2001.

AREND, S. M. et al. Antigenic equivalence of human T-Cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* – specific RD-1 encoded protein antigens ESAT-6 and CFP-10 and to mixtures of synthetic peptides. Infection and Immunity, Washington, v. 68, n. 6, p. 3314-3321, 2000a.

AREND, S. M. et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. The Journal of Infectious Diseases, v. 181, p. 1850-1854, 2000b.

ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. A. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. Journal of Experimental Medicine, New York, v. 134, p. 713-740.

BARROSO, E. W. Imunopatogenia. In: SANT'ANNA, C. C. Tuberculose na infância e na adolescência. São Paulo: Atheneu, 2002. Cap. 3.

BETHLEM, N. Pneumologia. São Paulo: Atheneu, 1984.

BIERRENBACH, A. L. et al. Incidência da tuberculose e taxa de cura, Brasil, 2000 a 2004. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 24-33, 2007.

BIO RAD. Microplate Manager PC, versão 4.0., Hercules, 2000.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 15, p. 749-795, 1997.

BRASIL. Controle global da tuberculose. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <[http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF\\_Files/BR\\_2004\\_Detail.ed.PDF](http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/BR_2004_Detail.ed.PDF)>. Acesso em: 15 out. 2006.

BRASIL. Secretaria Executiva. Departamento de Informática do SUS. Casos Notificados de Tuberculose no Estado de PE, em 2006. Brasília, DF, 2007. Disponível em: [http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinan/tuberculose/bases/tuber\\_cbr.def](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinan/tuberculose/bases/tuber_cbr.def)>. Acesso em: 16 out 2007.

BRASIL. Secretaria Executiva. Departamento de Informática do SUS. Taxa de Incidência de Tuberculose em crianças de 3 a 15 anos, no estado de PE, em 2004. Brasília, DF, 2006a. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/d0202.def>>. Acesso em: 15 out 2007.

BRASIL. Secretaria Executiva. Departamento de Informática do SUS. Taxa de Incidência de Tuberculose no estado de PE, em 2005. Brasília, DF, 2006b. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/d0202.def>>. Acesso em: 15 out 2007.

BRASIL. Secretaria executiva. Departamento de Informática do SUS. Taxa de Mortalidade de Tuberculose para o estado de PE, em 2004. Brasília, DF, 2006c. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/c17.def>>. Acesso em: 15 de out de 2007.

BROCK, I. et al. Performance of whole blood IFN- $\gamma$  test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 5, n. 5, p. 462-467, 2001.

BRODIN, P. et al. Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant T-cell antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence and immunogenicity. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 280, n. 4, p. 33953-33959, 2005.

CAMPANHA NACIONAL CONTRA A TUBERCULOSE (Brasil). Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: NUTES, 1987.

COLSTON, M. J.; COX, R. A. Mycobacterial growth and dormancy. In: Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence. 1. ed. London: Blackwell Science, 1999.

COMSTOCK, G. W. False tuberculin test results. Chest, Park Ridge, v. 68, p. 465-469, 1975.

CONNELL, T. G. et al. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with Mycobacterium tuberculosis in children. Thorax, Londres, v. 61, p. 616-620, 2006.

CROFTON, H. Miller Clinical tuberculosis. London: the Macmillan, 1992.

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, 2000.

DOHERTY, T. M. et al. Immune Responses to the Mycobacterium tuberculosis-Specific Antigen ESAT-6 signal subclinical infection among Contacts of Tuberculosis Patients. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 40, n. 2, p. 704-706, 2002.

FAÇANHA, M. C. Tuberculose: subnotificação de casos que evoluíram para óbito em Fortaleza-CE. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 25-30, 2005.

FAUVILLE-DUFAUX, M. et al. Contribution of the polymerase chain reaction to the diagnosis of tuberculosis infection in children. European Journal of Pediatrics, Heidelberg, v. 155, p. 106-111, 1996.

FERRAZ, J. C. ET AL. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 39, p. 1387-1397, 2006.

FERREIRA A. W.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e parasitárias. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FINE, P. E. et al. Delayed type hypersensitivity, mycobacterial vaccines and protective immunity. Lancet, London, v. 344, p. 1245-1249, 1994.

FLETCHER, R. H. et al. Clinical Epidemiology: the essentials, Baltimore: Willians e Wilkins, 1996.

FRANCO, R. et al. Clinical and radiological analysis of children and adolescents with tuberculosis in Bahia, Brasil. Brazilian Journal of Infectious Diseases, Salvador, v. 7, p. 73-81, 2003.

FRIEDEN, T. R. et al. Tuberculosis. Lancet, London, v. 362, p. 887-899, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). O problema da tuberculose. In: \_\_\_\_\_. Controle da Tuberculose, uma proposta de integração ensino-serviço. 5. ed. Rio de Janeiro: Sociedade brasileira de pneumologia e tisiologia, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2. ed. Rio de Janeiro:1994.

GOLETTI, D. et al. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: Comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunospot assay. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington, v. 12, n. 11, p. 1311-1316, 2005.

GOMEZ-PESTRANA, D.; TORRONTERAS, R.; CARO, P. Diagnosis of tuberculosis in children using a polymerase chain reaction. Pediatric Pulmonology, New York, v. 28, p. 344-351, 1999.

GONZALEZ-JUARRERO, M. et al. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity, Washington, v. 69, p. 1722-1728, 2001.

HILL, P. C. et al. Esat-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 43, n. 5, p. 2070-2074, 2005.

HILL, P. C. et al. Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection against a gradient of exposure in the Gambia. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 38, n. 7, p. 966-973, 2004.

HOUWERT, K. A. et al. Prospective evaluation of World Health Organization criteria to assist diagnosis of tuberculosis in children. European Respiratory Journal, Copenhagen, v. 11, p. 1116-1120, 1998.

INSTITUTO MATERNO INFANTIL FERNANDO FIGUEIRA. *Pediatria*. Cavalcanti et al., 2ª ed., Recife, v. 10, p. 243-260, 1996.

JASMER, R. M.; NAHID, P.; HOPEWELL, P. C. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. New England Journal of Medicine, Boston, v. 347, p. 1860-1866, 2002.

KAUFMANN, S. H. et al. Cell mediated immunity to mycobacteria: a double-sided sword?. Rheumatology International, Berlim, v. 9, p. 181-186, 1989.

KARAM, F. et al. Sensitivity of IFN- $\gamma$  release assay to detect latent tuberculosis infection is retained in HIV-infected patients but dependent on HIV/AIDS progression. Public Library of Science, San Francisco, v. 3, n. 1, p. e1441, 2008.

KOLMOS, H. J.; BRAHM, M.; BRUNN, B. Peritonitis with *Mycobacterium fortuitum* in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis, Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Estolcomo, v. 24, p. 801-803, 1992.

KONEMAN, E. W. *Diagnóstico Microbiológico*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KUBICA, G. P.; WAYNE, L. G. The mycobacteria: a sourcebook. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 1984.

KUNST, H. Diagnosis of latent tuberculosis infection: The potential role of new technologies. Respiratory Medicine, Londres, v. 100, p. 2098-2106, 2006.

LALVANI, A.; NAGVENKAR, P.; UDWADIA, Z. Enumeration of T cells specific for RDi-encoded antigens suggest a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 183, p. 469-477, 2001.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LAPA E SILVA, J. R.; BOECHAT, N. The resurgence of tuberculosis and the impact of the study of pulmonary immunopathogenesis. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 30, n. 4, p. 478-483, 2004.

LEMOS, A. C. et al. Risk of tuberculosis among household contacts in Salvador, Bahia. Brazilian Journal of Infectious Diseases, Salvador, v. 8, n. 6, p. 424-430, 2004.

LEROY, V.; SALMI, L. R.; DUPON, M. Progression of human immunodeficiency vírus infection in patients with tuberculosis disease. A cohort study in Bordeaux, France 1988-1994. American Journal of Epidemiology, Baltimore, v. 145, p. 193-200, 1997.

MACIEL, E. L. N. et al. O perfil epidemiológico da tuberculose em crianças e adolescentes menores de 15 anos na Grande Vitória, Brasil, no período de 1990-2001. Cadernos de Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 81-94, 2006.

MARAIS, B. J.; PAI, M. Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. Archives of Disease in Childhood, Londres, v. 92, p. 446-452, 2007.

MARCH, M. F. B. P. Tuberculose: histórico. In: SANTA'ANNA, C. C. Tuberculose na infância e na adolescência. São Paulo: Atheneu, 2002.

MAZUREK, G. H. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, v. 52, n. RR02, p. 49-55, 2005.

MELLO, F. C. Q. et al. Evaluation of an amplification test - AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* (MTB test – Roche Molecular Systems – for the diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis (SNPT at a teaching hospital, in Rio de Janeiro, Brasil [abstract]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, New York, v. 165, p. 628, 2002.

MORI, T. et al. Specific detection of tuberculosis infection: An interferon- $\gamma$  based assay using new antigens. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, New York, v. 170, p. 59-64, 2004.

MUNK, M. E. et al. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 183, p. 175-176, 2001.

NAKAOKA, H. et al. Risk for tuberculosis among children. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 12, n. 9, p. 1383 – 1388, 2006.

NELSON, J. L.; WELLS, C. D. Global epidemiology of childhood tuberculosis. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 8, p. 636-647, 2004.

NISHIMURA, T. et al. Accuracy of an interferon-gamma release assay to detect active pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 12, n. 3, p. 269-274, 2008.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Novos casos de tuberculose registrados no mundo durante o ano de 2005. Geneva, 2007. Disponível em: <[http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/TB\\_newcases\\_2005.png](http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/TB_newcases_2005.png)>. Acesso em: 16 out. 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global Tuberculosis Control. Geneva, 2001.

PAI, M.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M. Interferon- $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. Lancet Infectious Diseases, New York, v. 4, p. 761-776, 2004.

PALAZZO, R. et al. Use of whole-blood samples in in-house bulk and single-cell antigen-specific gamma interferon assays for surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* infections. Clinical and Vaccine Immunology, Washington, v. 15, n. 2, p. 327-337, 2008.

POLLOCK, J. M.; ANDERSEN, P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 175, n. 5, p. 1251-1254, 1997.

RAVN, P. et al. Prospective evolution of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis active tuberculosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington, v. 12, n. 4, p. 491-496, 2005.

RAVN, P. A. et al. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 179, n. 3, p. 637-645, 1999.

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

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

ROM, W. N.; GARAY, S. M. (Ed.). Tuberculosis. New York: Little, Brown and Company, 1995.

RUNYON, E. H. Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. American Journal of Clinical Pathology, Baltimore, v. 54, p. 578-586, 1970.

SACKETT, D. L. et al. Clinical epidemiology. A Basic Science for Clinical Medicine. Boston: Little, Brown and Company, 1991.

SANT'ANNA, C. C. et al. Diagnóstico e terapêutica da tuberculose infantil – uma visão atualizada de um antigo problema. Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p. 205-214, 2002.

SANT'ANNA, C. C. Dificuldades e desafios do diagnóstico da tuberculose pulmonar na infância. Revista de Pediatria do Ceará, Fortaleza, v. 2, p. 27-32, 2001.

SAS INSTITUTE, INC. Stat View for Windows versão 5.1., Cary, 1998.

SCARPELLINI, P. et al. Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 42, n. 8, p. 3469-3474, 2004.

SCHAAF, H. S. et al. Adult to child transmission of tuberculosis: household or community contact?. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 7, p. 426-431, 2003.

SCHOLVINCK, E. et al. Gamma Interferon-Based Immunodiagnosis of tuberculosis: between Whole-Blood and Enzyme-Linked Immunospot Methods. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 42, n. 2, p. 829-831, 2004.

SEAH, G. T.; SCOTT, G. M.; ROOK, G. A. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 181, n. 1, p. 385-389, 2000.

SELVARAJ, P. et al. Influence of HLA-DR2 phenotype on humoral immunity and lymphocyte response to *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate antigens in pulmonary tuberculosis. Indian Journal of Medical Research, Nova Déli, v. 107, p. 208-217, 1998.

SHINGADIA, D. NOVELLI, V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. Lancet Infectious Diseases, New York, v. 3, p. 624-632, 2003.

SMITH, K. C. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. Pediatrics, Evanston, v. 97, n. 2, p. 155-160, 1996.

SNIDER, D. E. et al. Tuberculosis in children. Pediatric Infectious Disease Journal, Baltimore, v. 7, p. 271-278, 1988.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA II. Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes brasileiras para tuberculose 2004. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 30, supl. 1, p. 1-55, 2004.

SOMMERS, H. M.; GOOD, R. C. Mycobacterium. In: LENNETTE, E. H. (Ed). Manual of Clinical Microbiology. 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985. Cap 22.

SOUZA, W. V. et al. Tuberculose no Brasil: construção de um sistema de vigilância de base territorial. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 82-89, 2005.

SOYSAL, A. et al. Evaluation of cut-off values of interferon-gamma-based assays in the diagnosis of *M. tuberculosis* infection. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 12, n. 1, p. 50-56, 2008.

SPERHACKE, R. D. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 8, n. 3, p. 312-317, 2004.

SPSS. SPSS Base 13.0 for Windows User's Guide., Chicago, 2004.

STARKE, J. R. Pediatric tuberculosis: time for a new approach. Tuberculosis, Edinburgo, v. 83, p. 208-212, 2003.

STARKE, J. R. Tuberculose na criança: diagnóstico e tratamento. Anais Nestlé, Vevey, v. 56, 1998.

STARKE, J. R.; ONG, L.; EISENACH, K. Detection of *M. tuberculosis* in gastric aspirate samples from children using polymerase chain reaction, American Review of Respiratory Disease, New York, v. 147, p. A801, 1993.

STYBLO, K. Recent advances in epidemiological research in tuberculosis. Advances in Tuberculosis Research, Basel, v. 20, p. 1-63, 1980.

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, p. 323-334, 2007.

TSIOURIS, S. J. et al. Sensitivity analysis and potential uses of a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 44, n. 8, p. 2844-2850, 2006.

TUFARIELLO, J. M.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. Lancet Infectious Diseases, New York, v. 3, p. 578-590, 2003.

ULRICHS, T. et al. Numbers of IFN-gamma-producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 4, n. 12, p. 1181-1013, 2000.

ULRICHS, T. et al. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 in tuberculosis patients and healthy donors. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 28, n. 12, p. 39-49, 1998.

VAN PINXTEREN, L. A. H. et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington, v. 7, p. 155-160, 2000.

VENDRAMINI, S. H. F. et al. Tuberculose em município de porte médio do Sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade de 1985 a 2003. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 31, n. 3, p. 237-243, 2005.

WELDINGH K. et al. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serologic antigens. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 43, p. 57-65, 2005.

WINAU, F. et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. Immunity, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 105-117, 2006.

ZAR, H. J. et al. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. Lancet, London, v. 365, p. 130-134, 2005.

# APÊNDICE

**Running Title: Tuberculosis in children****Preliminary results in the immunodiagnosis of tuberculosis in children based on the T cell response to ESAT-6 and PPD antigens.**

Daniele S M Van-Lume, Joelma R de Souza, Wladimir G Melo, Victor L Melo\*, Marta M L Cabral\*, Joakim C. Rego\*\*, Haiana C. Schindler, Frederico G C Abath†, Silvia M L Montenegro/+/>++.

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Moares Rego s/nº, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil.

\*Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

\*\*Ambulatório de Pediatria e Cardiologia Infantil, Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira, Recife, PE, Brasil.

*The aim of this work was to study the difference of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) levels produced after early secretory antigen target 6 (ESAT-6) and purified protein derivate (PPD) stimulation in supernatant cultures of children with tuberculosis (TB) disease ( $n = 21$ ), TB latent infection ( $n = 16$ ) and negative controls (NC,  $n = 22$ ) from an endemic area. The concentration of IFN- $\gamma$  was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the results were evaluated by unpaired  $t$  Student test.  $P$  values  $< 0.05$  were considered significant. IFN- $\gamma$  levels after ESAT-6 stimulation showed the possibility of early diagnosis for the TB latent children group ( $P = 0.0030$ ). Nevertheless, the same group showed similar response with NC ( $P > 0.05$ ) after PPD stimulation. IFN- $\gamma$  assay using ESAT-6 as an antigenic*

*stimulation has the potential to be used as a tool for immunodiagnosis of early TB in children.*

† *In memoriam*

Key Words: Tuberculosis in children, Immunodiagnosis, ESAT-6 and PPD.

Financial Support: PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico de Insumos em Saúde) /FIOCRUZ, CAPES.

+Corresponding author: [silvia@cpqam.fiocruz.br](mailto:silvia@cpqam.fiocruz.br)

++CNPq research scholarships

Tuberculosis (TB) is one of the major global Public Health problems. The World Health Organization (WHO) estimates that one-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* which is responsible for 8,7 millions of new cases and approximately 3 millions of deaths, annually (Doherty et al. 2002, Vendramini et al. 2005).

In Brazil, according to the Ministry of Health (2004), 116 thousand cases of tuberculosis are notified every year, of which, 10% are in children. Recently, there has been an increase of interest in the field of tuberculosis diagnosis, especially in developing countries (Hijjar et al. 2001).

The gold standard for TB diagnosis is often based on a combination of clinical and radiological examination, epidemiological investigation, appropriate response to anti-tuberculosis therapy and microbiological tests (bacilloscopy and culture) confirmation. In children, diagnosis is particularly difficult because they are generally paucibacilar, decreasing the sensitivity of microbiological tests and establishing an asymptomatic infection.

This asymptomatic and/or latent phase can persist for many years with the risk of the active disease reactivation of approximately 10% (Jasmer et al. 2002, Tufariello et al. 2003). Tuberculin skin test (TST), using purified protein derivative (PPD), has been used to support the diagnosis of active and TB latent infection. However, the main drawback of this TST is the lack of specificity due to cross reactivity with antigens present in other *Mycobacterium* species, such as *M.bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) used for vaccination and, the previous exposure to environmental nontuberculosis mycobacteria (Lein et al. 1999, American Thoracic Society 2000, Sant'Anna et al. 2002, Scarpellini et al. 2004).

Thus, new strategies for specific, early and active TB infection diagnosis in children are urgently needed to overcome the limitations of PPD (Scarpellini et al. 2004; Kunst 2006, Teixeira et al. 2007).

Recently, *in vitro* studies with cattle and humans measuring IFN- $\gamma$  secreting T cells have shown that ESAT-6 (early secretory antigen target – 6) is a potential diagnostic tool, that presents high specificity for active TB disease (Van Pinxteren et al. 2000, Munk et al. 2001, Pai et al. 2004, Weldingh et al. 2005, Teixeira et al. 2007). This protein encoded within the region of difference 1 (RD1) of *M. tuberculosis* genome, is more specific to this bacteria than PPD (Scarpellini et al. 2004, Goletti et al. 2005) due to its absence in all vaccine strains of BCG and in environmental isolates, with the exception of *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium flavescens* and *Mycobacterium marinum* (Ravn et al. 1999, Arend et al. 2002, Goletti et al. 2004, Scarpellini et al. 2004, Ravn et al. 2005).

Therefore, the aim of this study was to investigate the difference of IFN- $\gamma$  levels produced against the recombinant antigen, ESAT-6, and PPD *in vitro*, in children with tuberculosis disease, suspect contact (latent infection) or healthy people, in an endemic area.

Children, with age between 3 to 15 years old and BCG vaccinated, were selected according to the criteria used by ATS (American Thoracic Society, 1990), and were enrolled into three groups: 1- patients with confirmed tuberculosis disease (TB disease, n = 21), composed of people who had epidemiological history of contact, clinical evidences and chest radiography compatible with tuberculosis and TST > 10 mm; 2- subjects with a high risk to have tuberculosis infection (TB latent, n = 16), including children with history of contact with an adult with tuberculosis or who have shown TST > 10mm. Both groups were selected, prior to treatment, from Hospital das Clínicas, Recife-PE and IMIP (Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira); 3-negative controls (NC, n = 22), composed of healthy children with TST negative reaction, without TB contact history and without specific symptoms of tuberculosis. This group was selected from IMIP cardiologic infirmary.

Individuals with positive HIV (Human Immunodeficiency virus), autoimmune diseases, rheumatic cardiopathies or who have taken immune suppressive drugs in the 3 months before enrollment were excluded from this study.

The protocol study was approved by the Ethical Committee of Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ and by the Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira. All studied subjects answered a questionnaire about

having had contact with patients known to have TB or at risk groups for such infection. Informed consent was obtained from the parents or legal representatives of minor participants.

Blood samples (3ml) were taken with heparin (10 U/ml) by venipuncture. The whole blood was cultivated in RPMI 1640 medium with penicillin/streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml) and incubated with ESAT-6 (3 µg/ml), PPD (5 µg/ml) or PMA/Iono (Phorbol Miristate Acetate, 5 µg/ml/ Ionomycin, 1 µg/ml) at 37°C in a humidified CO<sub>2</sub> atmosphere for 120 h. Supernatants were harvested and immediately frozen at -70° C until analysis. The concentration of IFN-γ in duplicate samples was determined by Quantikine kit (R&D Systems) ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) as described in the manufacturer's instructions, and the results were expressed as pg/ml. ESAT-6 was obtained from Statens Serum Institute's donation, Copenhagen, Denmark. Differences between groups were evaluated by unpaired *t Student test*. *P* values of <0.05 were considered significant.

The TB disease group and the NC groups differed significantly in respect to the levels of IFN-γ in response to ESAT-6 antigen stimulation (*p* = 0.0025). Also, difference was observed in this cytokine levels for the TB latent and NC groups (*p* = 0.0030; Figure 1A). ESAT-6 antigen is a major target molecule for the memory T-cell response and a possible antigen candidate for a future vaccine (Harboe et al. 1996). Thus, the analysis of IFN-γ levels in response to ESAT-6 antigen stimulation can be an important tool of immunodiagnostic assay to detect TB latent infection.

In humans, PPD is a highly sensitive reagent for both conditions, as an *in vivo* skin test, and as an antigen for *in vitro* stimulation studies (Connell et al. 2006). In this work, statistical differences were showed with the negative controls and the TB disease group (*p*

= 0.0321), when the used stimulus was PPD. Moreover, IFN- $\gamma$  levels were increased in the NC group after stimulation with this antigen as compared to ESAT-6 stimulation. This fact happens because PPD contains a large number of antigens shared among different mycobacterial strains (Aggerbeck & Madsen 2006). This condition contributes to a decreased specificity in populations who are sensitized to mycobacterial antigens, as a consequence of BCG vaccination and/or contact to environmental mycobacteria (Van Pinxteren et al. 2000).

IFN- $\gamma$  levels decreased were observed in NC and TB disease groups after ESAT-6 stimulation, as compared to PPD stimulation, showing a better specificity response and that BCG vaccination can be interfering in the specificity after PPD stimulation (Fig. 1A and B).

Based on the condition that ESAT-6 antigen is more specific as compared to PPD antigen, the TB latent group showed to be different from NC group ( $p < 0.0030$ ; Figure 1A). This early diagnostic to detect TB latent is very important, especially in children, to treat this disease in advance.

Further studies are required to clarify the real value of this assay, particularly in children with possible TB latent infection (Marais & Pai 2006).

### **Acknowledgements**

The cooperation of all patients and control subjects is gratefully acknowledged.

**References:**

- Aggerbeck H, Madsen SM 2006. Safety of ESAT-6. *Tuberculosis* 86: 363-373.
- American Thoracic Society 1990. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *The American Review of Respiratory Disease* 142: 725-735.
- American Thoracic Society 2000. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49: 1-51.
- Arend SM, Van Meijgaarden KE, de Boer K, de Palou EC, Van Soolingen D, Ottenhoff TH, Van Dissel JT 2002. Tuberculin skin testing and in vitro T-cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *Mycobacterium kansasii*. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1797-1807.
- Connel TG, Curtis N, Ranganathan SC, Buttery JP 2006. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in children. *Thorax* 61: 616-620.
- Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Egale T, Ravn P, Andersen P 2002. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 704-706.
- Goletti D, Vincenti D, Carrara S, Butera O, Bizzoni F, Bernardini G, Amicosante M, Girardi E 2005. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunospot assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12: 1311-1316.

- Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P 1996. Evidence of occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity* 64: 16-22.
- Hijjar MA, Oliveira MJPR, Teixeira GM 2001. A tuberculose no Brasil e no mundo. *Boletim de Pneumologia Sanitária* 9: 9-16.
- Houwert KA, Borggreven PA, Schaaf HS, Nel E, Donald PR, Stolk J 1998. Prospective evaluation of World Health Organization criteria to assist diagnosis of tuberculosis in children. *European Respiratory Journal* 11: 1116-1120.
- Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC 2002. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. *The New England Journal of Medicine* 347: 1860-1866.
- Kunst H 2006. Diagnosis of latent tuberculosis infection: the potential role of new technologies. *Respiratory Medicine* 100: 2098-2106.
- Lein AD, von Reyn CF, Ravn P, Horsburgh Jr C, Alexander LN, Andersen P 1999. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6: 606-609.
- Marais BJ, Pai M 2007. Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Archives of Disease in Childhood* 92: 446-452.
- Ministério da Saúde. Controle global da tuberculose {S.L.}, 2004. Disponível em: [http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF\\_Files/BR\\_2004\\_Detailed.PDF](http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/BR_2004_Detailed.PDF)
- . Acesso em: 15 out. 2006.

- Munk ME, Arend SM, Brock I, Ottenhoff TH, Andersen P 2001. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases* 183: 175-176.
- Pai M, Riley LW, Colford JM 2004. Interferon- $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases* 4: 761-776.
- Ravn PA, Demissie A, Egualé T, Wondwosson H, Lein D, Amoudy HA, Mustafa AS, Jansen AK, Holm A, Rosenkrands I, Oftung F, Olobo J, von Reyn F, Andersen P 1999. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases* 179: 637-645.
- Ravn PA, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, Jensen AK, Andersen P, Weldingh K 2005. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis active tuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12: 491-496.
- Sant'Anna CC, Mourgues LV, Ferrero F, Balançar AM 2002. Diagnóstico e terapêutica da tuberculose infantil – uma visão atualizada de um antigo problema. *Jornal de Pediatria* 78: 205-214.
- Scarpellini P, Tasca S, Galli L, Beretta A, Lazzarin A, Fortis C 2004. Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 3469-3474.
- Teixeira HC, Abramo C, Munk ME 2007. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 33: 323-334.
- Tufariello JM, Chan J, Flynn JL 2003. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *The Lancet Infectious Disease* 3: 578-590.

- Van Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7: 155-160.
- Vendramini SHF, Gazetta CE, Chiaravalotti Netto F, Cury MR, Meirelles EB, Kuyumjian FG, Villa TCS 2005. Tuberculose em município de porte médio do Sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade de 1985 a 2003. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 31: 237-243.
- Weldingh K, Rosenkrands I, Okkels LM, Doherty TM, Andersen P 2005. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serologic antigens. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 57-65.

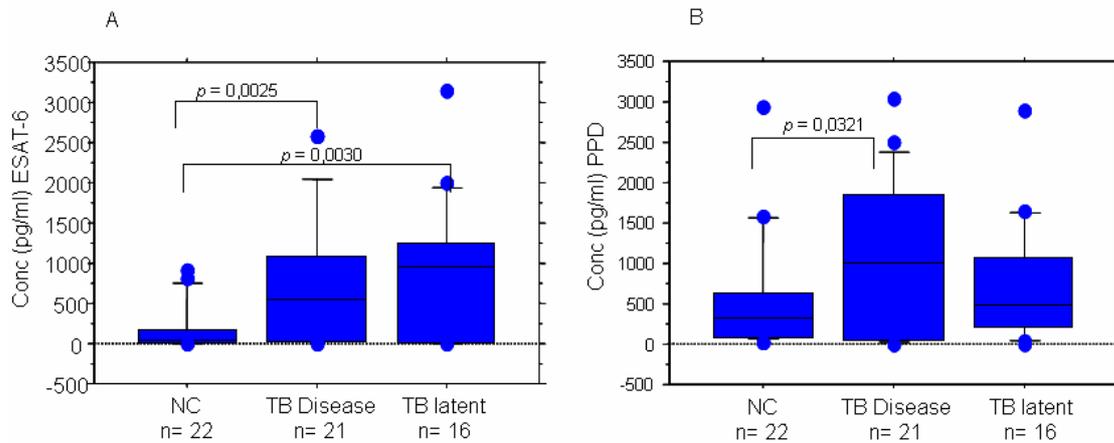


Fig. 1: Box Plot percentiles of the levels of IFN- $\gamma$  to early secretory antigen target-6 – ESAT-6 (A) and purified protein derivate – PPD (B) measured by Quantikine ELISA in supernatants of TB disease patients (n = 21), TB latent infection, (n = 16) and negative controls (n = 22), were expressed as pg/ml. Statistical differences were observed between negative controls and latent TB group ( $p = 0,0030$ ) and between negative controls and TB disease patients ( $p = 0,0025$ ) when stimulated with ESAT-6 and between negative controls and TB disease patients ( $p = 0,0321$ ) when the stimulus was PPD.

# **ANEXOS**



Centro de Pesquisas  
AGGEU MAGALHÃES

ANEXO A



Ministério da Saúde

## COMISSÃO DE ÉTICA DO CPqAM/FIOCRUZ

### Projeto

“Desenvolvimento e validação de abordagens moleculares e imunológicas para o diagnóstico de tuberculose infantil”

**Coordenador:** Haiana Charifker Schindler

Departamento de Imunologia/CPqAM

**Registro no CEP:** 55/02

### PARECER

A Comissão 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 CNS 196/96, e complementares.

Recife, 05 de março de 2002

  
 Dra. Nilma Cintra Leal  
Pesquisador Titular  
Coordenação  
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

ANEXO B



**INSTITUTO MATERNO INFANTIL DE PERNAMBUCO**

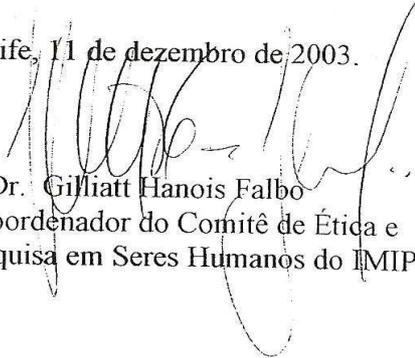
**DEPARTAMENTO DE PESQUISA**

**COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS**

### DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa de **Haiana Charifker Schindler** intitulado: “**Desenvolvimento e validação de abordagens moleculares e imunológicas para o diagnóstico da tuberculose infantil**” foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Materno Infantil de Pernambuco, em sua reunião em 01 de dezembro de 2003.

Recife, 11 de dezembro de 2003.

  
Dr. Gilliatt Hanois Falbo  
Coordenador do Comitê de Ética e  
Pesquisa em Seres Humanos do IMIP

## ANEXO C

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

<b>HOSPITAL:</b> _____	
<b>CIDADE:</b> _____	<b>ESTADO:</b> _____
<b>PACIENTE:</b> _____	<b>IDADE:</b> _____

Seu filho(a) está sendo convidado a participar da pesquisa – “**Diagnóstico imunológico da tuberculose infantil baseado nos antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10**”

**Telefones para contacto:** Dra. Haiana Charifker Schindler, Dra. Silvia Montenegro pelos telefones **21012560** ou **21012565**.

**Objetivo:** O objetivo de nossa pesquisa é desenvolver um teste de imunodiagnóstico sensível e específico baseado em dosagens de IFN-gama frente a antígenos recombinantes específicos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, para diagnóstico da tuberculose latente e doença em crianças.

#### INFORMAÇÃO PARA O CONSENTIMENTO

A tuberculose, doença infecto-contagiosa, é considerada um dos mais sérios problemas de saúde do mundo, sobretudo em países pobres. No Brasil, cerca de 50 milhões de pessoas são infectadas por ano, ocorrendo 10% dos casos, em menores de 15 anos. O diagnóstico na população infantil, ainda constitui um desafio para os médicos. A identificação de crianças com tuberculose é difícil e difere do adulto, por não apresentarem quadro clínico e laboratorial característicos.

Nós estamos elaborando uma pesquisa, com o objetivo de desenvolver novos métodos diagnósticos que possam auxiliar ou definir a presença ou não da tuberculose doença e/ou infecção, em pacientes menores de 15 anos e nos casos em que o diagnóstico é difícil, pelos meios habituais, onde faz-se necessário uma definição precoce, tratamento específico e detecção dos adultos contactantes.

Durante o atendimento médico no serviço de saúde, seu filho(a) será examinado, minuciosamente, por dois médicos, sendo pelo menos um deles pediatra participante da pesquisa e receberá a mesma assistência que os outros pacientes, no que diz respeito a consulta clínica, exames laboratoriais, tratamento e outros procedimentos que sejam necessários para a definição da doença. Não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou hospitalar.

Nos pacientes selecionados para o estudo, atendidos a nível ambulatorial, serão coletadas amostras de sangue (5,0 ml) para serem feitos os testes moleculares e imunológicos no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ e os resultados serão fornecidos ao profissional de saúde responsável pelo acompanhamento do caso. Quando o paciente necessitar de internamento, utilizaremos apenas as amostras biológicas (lavado gástrico, LCR, tecido ganglionar, sangue, líquido pleural, entre outras) solicitadas pelo médico da enfermaria, seguindo rigorosamente a rotina do serviço de saúde.

O benefício deste estudo será o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas que possam ser adequadas à realidade do nosso sistema público de saúde e a padronização de critérios mais eficazes que irão beneficiar o diagnóstico e tratamento precoces da tuberculose, sobretudo, nas crianças e adolescentes que vivem em países pobres, permitindo também a identificação mais rápida dos focos de transmissão.

#### CONSENTIMENTO

Compreendo os objetivos da pesquisa e sem ter recebido nenhuma pressão ou constrangimento concordo que meu filho(a) dela participe. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento se assim o desejar e que as informações colhidas guardarão o devido sigilo e confidencialidade. Os seus resultados podem ser publicados e apresentados em revistas e congressos técnicos.

\_\_\_\_\_  
Assinatura da genitora/responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico/pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura de testemunha

\_\_\_\_\_  
Local e data

## ANEXO D

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO EM INDIVÍDUOS SEM SUSPEITA DE TUBERCULOSE

<b>HOSPITAL:</b> _____	
<b>CIDADE:</b> _____	<b>ESTADO:</b> _____
<b>PACIENTE:</b> _____	<b>IDADE:</b> _____

Seu filho(a) está sendo convidado a participar como voluntário(a) da pesquisa – **“Diagnóstico imunológico da tuberculose infantil baseado nos antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10”**. Como toda pesquisa científica é necessário um grupo de indivíduos que não esteja infectado.

**Telefones para contato:** Dra. Haiana Charifker Schindler, Dr<sup>a</sup> Silvia Montenegro  
**21012560 ou 21012565.**

#### INFORMAÇÃO PARA O CONSENTIMENTO

A tuberculose, doença infecto-contagiosa, é considerada um dos mais sérios problemas de saúde do mundo, sobretudo em países pobres. No Brasil, cerca de 50 milhões de pessoas são infectadas por ano, ocorrendo 10%, dos casos, em menores de 15 anos. O diagnóstico na população infantil, ainda constitui um desafio para os médicos. A identificação de crianças com tuberculose é difícil e difere do adulto, por não apresentarem quadro clínico e laboratorial característicos.

Nós estamos elaborando uma pesquisa, com o objetivo de desenvolver um novo método diagnóstico que possa auxiliar ou definir a presença ou não da tuberculose doença e/ou infecção, em pacientes menores de 15 anos e nos casos em que o diagnóstico é difícil, pelos meios habituais, onde se faz necessário uma definição precoce, tratamento específico e detecção dos adultos contactantes.

Durante o atendimento médico no serviço de saúde, seu filho(a) será examinado, minuciosamente, por dois médicos sendo pelo menos um deles pediatra participante da pesquisa e receberá a mesma assistência que os outros pacientes, no que diz respeito a consulta clínica, exames laboratoriais, tratamento e outros procedimentos que sejam necessários para a definição da doença. Seu filho(a) não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional, uma vez que serão coletados 5,0 ml de sangue para serem feitos os testes moleculares no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ no momento da coleta de sangue para realização dos outros exames para a doença que você está sendo atendido e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou hospitalar. Os resultados serão fornecidos ao profissional de saúde responsável pelo acompanhamento do caso em duplicata.

Para o êxito da pesquisa há necessidade de dois grupos de pacientes, um com tuberculose e outro sem tuberculose (controle). No seu caso seu filho(a) está sendo convidado para ser controle de fundamental importância científica e de saúde pública a sua colaboração.

O benefício deste estudo será o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas que possam ser adequadas à realidade do nosso sistema público de saúde e a padronização de critérios mais eficazes que irão beneficiar o diagnóstico e tratamento precoce da tuberculose nas crianças e adolescentes permitindo também a identificação mais rápida dos focos de transmissão.

#### CONSENTIMENTO

Compreendo os objetivos da pesquisa e sem ter recebido nenhuma pressão ou constrangimento concordo que meu filho(a) dela participe como voluntário. Tenho consciência do direito do meu filho(a) de abandonar a pesquisa a qualquer momento se assim o desejar e que as informações colhidas guardarão o devido sigilo e confidencialidade. Os seus resultados podem ser publicados e apresentados em revistas e congressos técnicos.

\_\_\_\_\_  
Assinatura da genitora/responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico/pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura de testemunha

\_\_\_\_\_  
Local e data

## ANEXO E

### TUBERCULOSE INFANTIL

#### FICHA DE REGISTRO DE DADOS DO PACIENTE

IDENTIFICAÇÃO		
<b>1. Número da ficha na pesquisa</b> <div style="border: 1px solid black; width: 80px; height: 20px; margin: 5px auto;"></div>	<b>2. Data da entrevista</b> ____/____/____	<b>3. Procedência:</b> 1. Ambulatório <input type="checkbox"/> 2. Enfermaria <input type="checkbox"/>
<b>4. Hospital de origem:</b> 1. Hospital das Clínicas      3. IMIP <input type="checkbox"/> 2. Hospital Barão de Lucena    4. Outro		<b>5. Número do prontuário</b> <div style="border: 1px solid black; width: 200px; height: 20px; margin: 5px auto;"></div>
DADOS DO PACIENTE		
<b>6. Nome do Paciente</b> _____		
<b>7. Nome da Mãe</b> _____		
<b>8. Data de nascimento</b> ____/____/____	<b>9. Idade do paciente</b> <div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; width: 30px; height: 20px;"></div>             anos             <div style="border: 1px solid black; width: 30px; height: 20px;"></div>             meses           </div>	<b>10. Sexo</b> 1. Feminino <input type="checkbox"/> 2. Masculino <input type="checkbox"/>
<b>11. Endereço</b> _____ _____ <b>Ponto de referência</b> _____ _____		
<b>12. Bairro</b> _____	<b>13. Cidade</b> _____	<b>14. UF</b> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; margin: 5px auto;"></div>
<b>15. Telefone</b> (____) _____ - _____	<b>16. Informante</b> 1. Mãe <input type="checkbox"/> 2. Pai 3. Outro familiar: _____ 4. Outro informante: _____	<b>17. Zona de localização da moradia</b> 1. Urbana <input type="checkbox"/> 2. Rural <input type="checkbox"/>
DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS		
<b>18. Grau de instrução do paciente</b> 1. Iniciou alfabetização <input type="checkbox"/> 2. Não iniciou	<b>19. Grau de instrução do tutor</b> 1. Analfabeto                      4. Até 2º grau <input type="checkbox"/> 2. Sabe ler e escrever            5. Superior 3. Até 1º grau                      8. Não sabe informar	



<b>40. Já teve/tem outras doenças?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar		<b>Qual doença?</b> <b>41. Asma?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar		<b>42. Pneumonia?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar	
<b>Caso a resposta seja Não, seguir para 49</b>					
<b>43. Bronquite?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar		<b>44. Tuberculose?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar		<b>45. Diabetes?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar	
<b>46. Fibrose cística?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar		<b>47. HIV?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar			
<b>48. Câncer?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar		<b>49. Tem cicatriz de BCG? (vista pelo entrevistador)</b> 1. Sim 2. Não 8. Não verificado		<b>50. Quantas doses, pelo nº de cicatrizes? (visto pelo entrevistador)</b> 1. Uma 2. Duas 3. Mais de duas 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	
<b>51. Imunização com BCG vista no cartão?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não disponível 9. Inaplicável			<b>52. Tempo desde a última dose:</b> 1. Menos de 6 meses 2. De 6 meses a 1 ano 3. De + de 1 ano a 2 anos 4. Mais de 2 anos 8. Não sabe informar 9. Inaplicável		
<b>53. Fez PPD anterior?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe Data de realização: ____/____/____ <b>Caso não tenha feito, seguir para 55</b>			<b>54. Resultado do PPD</b> 1. Não reator (0-4mm) 2. Reator fraco (5-9mm) 3. Reator forte (10-14mm) 4. Reator muito forte (>15mm) 8. Não sabe informar 9. Inaplicável		
<b>55. Usa corticóide por mais de 10 dias?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar			<b>56. Toma algum medicamento atualmente?</b> 1. Sim 2. Não Qual: _____		
<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (referidos pelo Informante)</b>					
<b>57. Há quanto tempo a criança está doente?</b> [ ] [ ] meses [ ] [ ] dias		<b>58. Tem febre?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe		<b>59. Se Sim, há quanto tempo?</b> [ ] [ ] semanas [ ] [ ] dias	
<b>60. Perdeu peso?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe		<b>61. Tem tosse?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe		<b>62. Se Sim, há quanto tempo?</b> [ ] [ ] [ ] dias	
<b>63. Qual o tipo de tosse:</b> 1. Seca 2. Produtiva 3. Hemoptise 9. Inaplicável					

<b>64. Tem falta de apetite?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe		<b>65. Tem falta de ar desde que ficou doente?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe		66. Tem dor na junta? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe	
Local? 67. Joelho? 1. Sim 2. Não 9. Inaplicável		<b>68. Cotovelo?</b> 1. Sim 2. Não 9. Inaplicável		69. Punho? 1. Sim 2. Não 9. Inaplicável	
<b>70. Coluna?</b> 1. Sim 2. Não 9. Inaplicável		<b>71. Notou gânglio (lândria ou íngua) aumentado?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe		72. Local do gânglio: 1. Pescoço 2. Axila 3. Região inguinal (virilha) 4. Outros _____ 9. Não se aplica	
				73. Está suando mais durante a noite? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe	
<b>INVESTIGAÇÃO CLÍNICA (preenchida pelo médico)</b>					
74. Peso _____ Kg		75. Estatura _____ cm		76. Percentil (NCHS) <input type="text"/> <input type="text"/>	
1. Sim    2. Não    8. Não investigado					
77. Palidez <input type="checkbox"/>		78. Adinamia <input type="checkbox"/>		79. Toxemia <input type="checkbox"/>	
				80. Desnutrição <input type="checkbox"/>	
81. Linfadenomegalia Cervical? 1. Sim 2. Não 8. Não investigado		82. Linfadenomegalia Axilar? 1. Sim 2. Não 8. Não investigado		83. Linfadenomegalia em outro local? 1. Sim 2. Não 8. Não investigado	
84. Presença de sinais inflamatórios: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado 9. Inaplicável		<b>85. Edema:</b> 1. Sim 2. Não 8. Não investigado 9. Inaplicável		<b>86. Dor:</b> 1. Sim 2. Não 8. Não investigado 9. Inaplicável	
87. Rubor: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado 9. Inaplicável		88. Calor: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado 9. Inaplicável		89. Consistência do gânglio: 1. Amolecido 2. Endurecido 8. Não investigado 9. Inaplicável	
				<b>90. Apresenta micropoliadenomegalia generalizada?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não investigado	
1. Sim    2. Não    8. Não investigado					
91. Taquipnéia <input type="checkbox"/>		92. Eupnéico <input type="checkbox"/>		93. Dispnéia <input type="checkbox"/>	
				94. Cianose <input type="checkbox"/>	
				95. BAN <input type="checkbox"/>	

Ausculta (96 ao 102) 1. Sim 2. Não 8. Não investigado					
96. MV Normal <input type="checkbox"/>	97. MV diminuído <input type="checkbox"/>	98. MV ausente <input type="checkbox"/>	99. Roncos <input type="checkbox"/>	100. Crepitação <input type="checkbox"/>	101. Sibilância <input type="checkbox"/>
102. Broncofonia <input type="checkbox"/>	103. Aparelho cardíaco: 1. Normal 2. Alterado <input type="checkbox"/> Caso seja Normal, seguir para 102		Tipo de alteração: 104. Sopro: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado <input type="checkbox"/>		105. Arritmia: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado <input type="checkbox"/>
107. Abdome: 1. Normal 2. Hepatomegalia 3. Ascite sem etiologia 7. Outros _____ 4. Esplenomegalia 5. Hepatoesplenomegalia 6. Massa abdominal sem etiologia <input type="checkbox"/>			108. Sistema Nervoso: 1. Normal 2. Alterado <input type="checkbox"/>		
109. Se alterado, especifique: _____ _____ _____		110. Sist. Músculo-esquelético: 1. Normal 2. Alterado <input type="checkbox"/> Caso seja Normal, seguir para 112		111. Localização da(s) articulação(ões) acometida(s): _____ _____	
Tipo de alteração: 112. Edema: 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>	113. Calor: 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>	114. Dor: 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>	115. Rubor: 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>	116. Deformidades: 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>	
EXAMES LABORATORIAIS (preenchido pelo médico pesquisador)					
117. Realizou hemograma? 1. Sim 8. Não sabe informar 2. Não 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 118		118. Resultado da Hemoglobina <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> (g/dL)		119. N° de leucócitos (mm <sup>3</sup> ) <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
120. Monócitos relativos <input type="text"/> <input type="text"/> %		121. Eosinófilos relativos <input type="text"/> <input type="text"/> %		122. Valor do VSH <input type="text"/> <input type="text"/> mm	
123. Realizou Raio X de Tórax na admissão? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 120			124. Resultado do Raio X de admissão: 1. Normal 2. Forma Pneumônica 3. Forma Pneumoganglionar 4. Forma Pleuropulmonar 5. Forma Ganglionar 6. Forma Miliar 7. Padrão não sugestivo de TB 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>		

<b>125. Realizou Raio X de tórax de controle?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___ <b>Caso a resposta seja Não, seguir para 114</b>	<b>126. Resultado do Raio X de controle:</b> 1. Normalizou <input type="checkbox"/> 2. Houve melhora 3. Houve piora 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	
<b>127. Realizou Tomografia de tórax?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___ <b>Caso a resposta seja Não, seguir para 124</b>	<b>128. Resultado da Tomografia de tórax:</b> 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado sugestivo 3. Alterado inespecífico 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	
<b>129. Realizou PPD da pesquisa?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___ <b>Caso a resposta seja Não, seguir para 126</b>	<b>130. Resultado do PPD:</b> 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 <input type="checkbox"/>	
<b>131. Realizou Histopatologia?</b> 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___ <b>Caso a resposta seja Não, seguir para 129</b>	<b>132. Resultado da histopatologia:</b> 1. Normal 2. BAAR positivo 3. Sugestivo de TB <input type="checkbox"/> 4. Não sugestivo de TB 5. Duvidoso 9. Inaplicável	<b>133. Material da histopatologia:</b>   
<b>134. Realizou Baciloscopia?</b> 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___ <b>Caso a resposta seja Não, seguir para 124</b>	<b>135. Resultado da baciloscopia:</b> 1. Positiva 2. Negativa 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>  _____ Cruzes	<b>136. Material da baciloscopia:</b> 1. Escarro 2. Lavado gástrico 3. Líquor <input type="checkbox"/> 4. Biópsia 5. Outro material 9. Inaplicável Outro _____
<b>137. Realizou Cultura?</b> 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___ <b>Caso a resposta seja Não, seguir para 1127</b>	<b>138. Resultado da Cultura:</b> 1. Positiva 2. Negativa 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	<b>139. Material da Cultura:</b> 1. Escarro 2. Lavado gástrico 3. Líquor <input type="checkbox"/> 4. Biópsia 5. Outro material 9. Inaplicável Outro _____
<b>140. Realizou USG?</b> 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___ <b>Caso seja Não, seguir para o 122</b>	<b>141. Resultado da USG:</b> 1. Normal 2. Sugestivo de TB 3. Não sugestivo de TB 4. Duvidoso 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	<b>142. Tipo de ultra-sonografia:</b> 1. Tórax 2. Abdome 3. Outra <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável Outra: _____
<b>143. Realizou outro exame:</b> 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> 3. <b>Caso seja Não, seguir para o 125</b>	<b>144. Que exame?</b> _____ _____	<b>145. Resultado do exame:</b> 1. Normal 2. Sugestivo de TB <input type="checkbox"/> 3. Não sugestivo de TB 4. Duvidoso 9. Inaplicável

**DIAGNÓSTICO (de acordo com o médico assistente)**

<b>146. Escore de Clemax para TB pulmonar (Ver anexo 1)</b> 1. Muito provável 2. Possível 3. Pouco provável 8. Não realizado 9. Inaplicável	<input type="checkbox"/>	<b>147. Diagnóstico inicial</b> 1. TB infecção 2. TB doença 3. TB suspeita 4. Não é TB	<input type="checkbox"/>
<b>148. Data da notificação</b> ____/____/____		<b>149. Profissional que notificou</b> _____	
<b>150. Diagnóstico Final</b> 1. TB infecção 2. TB doença 3. TB suspeita 4. Não é TB	<input type="checkbox"/>	<b>151. Forma de TB</b> 1. Pulmonar 2. Pleural 3. Ganglionar periférica 4. Ganglionar pulmonar 5. Meningoencefálica 6. Miliar 7. Óssea 8. Outra 9. Inaplicável	<input type="checkbox"/>
<b>152. Tratamento realizado</b> 1. Profilaxia primária (INH por 3 meses) 2. Profilaxia secundária (INH por 6 meses) 3. Esquema I (INH + RMP por 6 meses e PZA por 2 meses) 4. Esquema IR (INH + RMP + BEM por 6 meses e PZA por 2 meses) 5. Esquema II (INH + RMP por 9 meses e PZA por 2 meses) 6. Esquema III (SM + PZA por 3 meses e ETH + EM por 12 meses) 9. Inaplicável	<input type="checkbox"/>	<b>153. Data do início do tratamento</b> ____/____/____	

**DIAGNÓSTICO (feito pelo médico pesquisador)**

<b>154. Diagnóstico</b> 1. TB infecção 2. TB doença 3. TB suspeita 4. Não é TB				<input type="checkbox"/>
<b>Critérios utilizados</b> 1. Sim    2. Não				
<b>155. Epidemiologia positiva</b>	<b>156. Quadro clínico sugestivo</b>	<b>157. Imagem alterada</b>	<b>158. PPD forte reator</b>	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>159. Pontuação de Clemax (TB Pulmonar)</b> 1. Muito provável 2. Possível 3. Pouco provável 8. Não realizado 9. Inaplicável				<input type="checkbox"/>

**EVOLUÇÃO**

**160. Evolução após tratamento (feita pelo médico acompanhante)**

- |                        |                                    |                          |
|------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1. Alta por cura       | 5. Mudança de diagnóstico          | <input type="checkbox"/> |
| 2. Falência do esquema | 6. Transferência                   |                          |
| 3. Alta por abandono   | 7. Alta por completar o tratamento |                          |
| 4. Alta por óbito      | 8. Sem informação                  |                          |

Entrevistador:

---

Assinatura:

---

**IMUNODIAGNÓSTICO (pelo médico pesquisador)****161. Amostra de sangue pré-tratamento:** Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_Esat-6: \_\_\_\_\_ Níveis de INF- $\gamma$ : \_\_\_\_\_CFP-10: \_\_\_\_\_ Níveis de INF- $\gamma$ : \_\_\_\_\_PPD: \_\_\_\_\_ Níveis de INF- $\gamma$ : \_\_\_\_\_**162. Amostra de sangue pré-tratamento:** Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_Esat-6: \_\_\_\_\_ Níveis de INF- $\gamma$ : \_\_\_\_\_CFP-10: \_\_\_\_\_ Níveis de INF- $\gamma$ : \_\_\_\_\_PPD: \_\_\_\_\_ Níveis de INF- $\gamma$ : \_\_\_\_\_**DIAGNÓSTICO MOLECULAR****163. Realizou PCR Único Tubo pré-tratamento?**

- |        |                          |
|--------|--------------------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> |

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**164. Resultado**

- |                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| 1. Positivo      | <input type="checkbox"/> |
| 2. Negativo      | <input type="checkbox"/> |
| 9. Não se aplica | <input type="checkbox"/> |

**165. Material**

- |                    |                                    |
|--------------------|------------------------------------|
| 1. Sangue total    | 6. Líq. Pleural                    |
| 2. Soro            | 7. Biópsia de gânglio              |
| 3. Células brancas | 8. Urina                           |
| 4. Escarro         | 9. Outros <input type="checkbox"/> |
| 5. Lav. Gástrico   | 99. Não se aplica                  |

**166. Repetiu PCR Único Tubo pré-tratamento?**

- |        |                          |
|--------|--------------------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> |

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**167. Resultado**

- |                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| 1. Positivo      | <input type="checkbox"/> |
| 2. Negativo      | <input type="checkbox"/> |
| 9. Não se aplica | <input type="checkbox"/> |

**168. Material**

- |                    |                                    |
|--------------------|------------------------------------|
| 1. Sangue total    | 6. Líq. Pleural                    |
| 2. Soro            | 7. Biópsia de gânglio              |
| 3. Células brancas | 8. Urina                           |
| 4. Escarro         | 9. Outros <input type="checkbox"/> |
| 5. Lav. Gástrico   | 99. Não se aplica                  |

<b>169. Realizou PCR Único Tubo no 3º mês de tto?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___	<b>170. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>171. Material</b> 1. Sangue total 2. Soro 3. Células brancas 4. Escarro 5. Lav. Gástrico 6. Líq. Pleural 7. Biópsia de gânglio 8. Urina 9. Outros <input type="checkbox"/> 99. Não se aplica
<b>172. Realizou PCR Único Tubo pós-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___	<b>173. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>174. Material</b> 1. Sangue total 2. Soro 3. Células brancas 4. Escarro 5. Lav. Gástrico 6. Líq. Pleural 7. Biópsia de gânglio 8. Urina 9. Outros <input type="checkbox"/> 99. Não se aplica
<b>175. Realizou PCR Nested pré-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___	<b>176. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>177. Material</b> 1. Sangue total 2. Soro 3. Células brancas 4. Escarro 5. Lav. Gástrico 6. Líq. Pleural 7. Biópsia de gânglio 8. Urina 9. Outros <input type="checkbox"/> 99. Não se aplica

<b>178. Repetiu PCR Nested pré-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___	<b>179. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>180. Material</b> 1. Sangue total 2. Soro 3. Células brancas 4. Escarro 5. Lav. Gástrico 6. Líq. Pleural 7. Biópsia de gânglio 8. Urina 9. Outros <input type="checkbox"/> 99. Não se aplica
<b>181. Realizou PCR Nested no 3º mês de tto?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___	<b>182. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>183. Material</b> 1. Sangue total 2. Soro 3. Células brancas 4. Escarro 5. Lav. Gástrico 6. Líq. Pleural 7. Biópsia de gânglio 8. Urina 9. Outros <input type="checkbox"/> 99. Não se aplica
<b>184. Realizou PCR Nested pós-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ___/___/___	<b>185. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>186. Material</b> 1. Sangue total 2. Soro 3. Células brancas 4. Escarro 5. Lav. Gástrico 6. Líq. Pleural 7. Biópsia de gânglio 8. Urina 9. Outros <input type="checkbox"/> 99. Não se aplica

**CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO (preenchido pesquisador)**

**2. Hospital de origem:**

1. Hospital das Clínicas  
2. Hospital Barão de Lucena

3. IMIP  
4. Outro

**3. Prontuário do Hospital**

**4. Doenças associadas:**

**Outras doenças:**

**5. HIV registrado:**

1. Sim  
2. Não

**6. Doenças reumáticas:**

1. Sim  
2. Não

**7. Doença autoimune:**

1. Sim  
2. Não

**8. Cardiopatias:**

1. Sim  
2. Não

**9. Nefropatias:**

1. Sim  
2. Não

10. Uso de corticóides ou outros imunossupressores  
nos últimos 10 dias por mais de 10 dias seguidos:

1. Sim  
2. Não

## USA

R&D Systems Inc.  
614 McKinley Place NE  
Minneapolis, MN 55413

USA

(800) 343-7475 (freephone)  
(612) 379-2956 (tele)  
(612) 379-6580 (fax)  
E-mail: [info@RnDSystems.com](mailto:info@RnDSystems.com)  
[www.RnDSystems.com](http://www.RnDSystems.com)

## United Kingdom

R&D Systems Europe Ltd.  
19 Barton Lane  
Abingdon Science Park  
Abingdon, Oxon OX14 3NB

United Kingdom  
800 90 20 30 20 (freephone)  
(0)1235 529449 (tele)  
(0)1235 533420 (fax)

E-mail: [info@RnDSystems.co.uk](mailto:info@RnDSystems.co.uk)  
[www.RnDSystems.com](http://www.RnDSystems.com)

## Germany

R&D Systems GmbH  
Borsigstrasse 7  
65205 Wiesbaden-Nordenstadt  
Germany

(0)800 909 4455 (freephone)  
(0)6122 90980 (tele)  
(0)6122 909819 (fax)

E-mail: [info@RnDSystems.co.uk](mailto:info@RnDSystems.co.uk)  
[www.RnDSystems.com](http://www.RnDSystems.com)

**R&D**  
SYSTEMS

# Quantikine®

human  
IFN- $\gamma$

ANEXO F

FOR RESEARCH USE ONLY.  
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

**R&D**  
SYSTEMS