

Samantha Brum Ribeiro

“Produção de Interferon-gama por células T específicas para os antígenos ESAT 6 e CFP10 de *Mycobacterium tuberculosis* como marcador putativo do sucesso do tratamento anti-tuberculose”

Dissertação apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre

Orientadores: Prof. Neio Boéchat

Agosto de 2009

Rio de Janeiro

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Samantha Brum Ribeiro

“Produção de Interferon-gama por células T específicas para os antígenos ESAT6 e CFP 10 de *Mycobacterium tuberculosis* como marcador putativo do sucesso do tratamento anti-tuberculose”

Dissertação apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Clínica Médica, setor de Ciências Pneumológicas.

Orientador: Prof. Neio Boéchat

Banca Examinadora:

Prof. José Roberto Lapa e Silva (Presidente)

Prof. Clemax Couto Sant’Anna

Prof. Walter Martin Roland Oelemann

Prof. Maria Armanda Vieira (Suplente)

Prof. Maurilo Leite Junior (Suplente)

Apresentada em:

Rio de Janeiro, 18 de Agosto de 2009

Ribeiro, Samantha

Produção de Interferon gama por células T específicas para os antígenos ESAT6 e CFP 10 de *Mycobacterium tuberculosis* como marcador putativo do sucesso do tratamento anti-tuberculose. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2009.

xiv, 125.f.: il.; 31.cm.

Orientadores: Neio Boéchat

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Faculdade de Medicina / Departamento de Clínica Médica, 2009.

Referências bibliográficas: f. 72-80

1. Tuberculose pulmonar - imunologia. 2. *Mycobacterium tuberculosis* - imunologia. 3. IFN- γ . 4. ELISPOT – metodologia. 5. TSPOT-TB. 6. Diagnóstico. 7. Clínica Médica (Ciências Pneumológicas) - Tese. I. Boéchat, Neio. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Departamento de Clínica Médica. III. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Afonso que está sempre me apoiando e confortando em todas as dificuldades. À minha mãe Rejane que, infelizmente, se foi antes de ver a conclusão deste trabalho e que sei, está me acompanhando mesmo longe. Ao meu marido, Carlos Henrique, por toda a paciência e carinho. A minha professora querida, M^a Genoveva, pela amizade, carinho e apoio desde o primeiro ano de Faculdade. À amiga Maria del Rosário que está sempre presente para me ouvir, ajudar e apoiar. Aos amigos Dr. Fernando e Dra. Almira pela atenção e ajuda e aos amigos do Laboratório Multidisciplinar por estarem sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Neio Boechat, por todo auxílio profissional, incentivo apoio e amizade durante o desenvolver deste trabalho.

Ao Dr. José Roberto Lapa e Silva, pela atenção, ajuda e apoio durante este período.

À Dra. Susan Dorman que possibilitou minha participação neste trabalho.

À Johns Hopkins University e à Oxford Immunotech.

Ao professor Walter Oelemann que me acompanha desde a graduação, pela amizade e apoio e por ter me direcionado para este trabalho.

À Dra. Fátima (DIP) pela atenção e por disponibilizar espaço em seu laboratório e à Cristiane por me auxiliar com o armazenamento das amostras.

Aos amigos e profissionais do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa, Alessandra Coelho, Beatriz Penedo, Walter Farcks Maia, Alex Sandro Duarte Albuquerque, Cesônia de Assis Martinusso, Sandra Maria, Alysson, Janaína Leung, Célio de Barros, Renata Marques e Raquel Noboa, pela paciência e ajuda durante esse tempo em que passamos juntos.

Aos professores do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa Lúcio, Maurilo, Silvio, Lazzarini, Heitor e Ilana por ajudarem sempre que precisei.

À grande amiga, Bióloga, Patrícia Martins Lago pelo apoio profissional, ajuda com o Inglês, e, principalmente, pela amizade que cultivamos nos últimos anos.

Ao Dr. Marcus Conde, responsável pelo estudo Moxi, à Carla Loredó, enfermeira responsável pelo estudo MOXI e também às enfermeiras Cristina Felix e Gisele pelo auxílio na obtenção das amostras.

A todos os pacientes que participaram deste estudo, fundamentais para a conclusão do mesmo

Apoio financeiro: Johns Hopkins University, FUJB, CNPq.

SUMÁRIO

Abreviaturas	IX
Lista de figuras	XI
Lista de tabelas	XII
Resumo	XIII
Abstract	XIV
1. Introdução	15
2. Revisão de literatura	18
2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> – Características gerais	18
2.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , transmissão e resposta imunológica	19
2.3. Epidemiologia da Tuberculose	20
2.4. Diagnóstico da Tuberculose	21
A - Diagnóstico Clínico	21
B - Diagnóstico Radiológico	22
C - Diagnóstico Bacteriológico	22
D - Diagnóstico Molecular	23
E – Diagnóstico Imunológico	24
E.1 – Tuberculose ativa	24
E.2 – Infecção Latente	25
E.2.1 – Teste Tuberculínico Cutâneo	25
E.2.2 – Interferon-gama release assays	26
F – Comparação entre TST e IGRAs	29
2.5. Marcadores Imunológicos	30
2.6. Resposta Imune no estudo de vacinas	31
2.7. Resposta ao tratamento	32
2.8. História natural da LTBI	34
3. Justificativa	35
4. Definição do problema	37
5. Hipótese de estudo	38
6. Objetivos	39
6.1. Objetivos Gerais	39
6.2. Objetivos Específicos	39
7. Materiais e Métodos	41
7.1. Seleção e inclusão de pacientes	41
7.2. Desenvolvimento do estudo	41
7.3. Coleta de dados e monitoramento	43
A – Formulários usados	43
B – Formulários para submissão e complementação dos dados	43

C – Gravação dos dados e arquivamento	43
D – Gerenciamento	44
E – Monitoramento	45
7.4. Inclusões	45
7.5. Biosegurança	45
7.6. Administração	46
7.7. Informações sobre reagentes e preparo	47
7.8. Coleta e processamento das amostras	47
A - Período Baseline	48
B – Semanas 16 e 24	51
7.9. Interpretação dos resultados	53
7.10. Análise estatística	53
8. Resultados	55
8.1. Sensibilidade do teste em pacientes com cultura confirmada para TB	55
8.2. Sensibilidade do teste entre pacientes com co-infecção com HIV	56
8.3. Frequência de células TRD1 específicas em pacientes com falência de tratamento	56
8.4. Frequência de células TRD1 específicas em pacientes com e sem recidiva	56
8.5. Contagem de SFCs entre os pacientes que tiveram cultura positiva versus negativa na oitava semana de tratamento	57
8.6. Contagem de SFCs durante o tratamento contra TB	59
8.7. Associação entre contagem de SFCs e gravidade clínico-radiológica da TB no tempo zero	62
8.8. Comparação entre duas modalidades de contagem dos “spots”	62
9. Discussão	65
10. Conclusões	70
11. Perspectivas	71
11. Referências	72
12. Anexos	
ANEXO 1. Fig 1- Parede do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	81
ANEXO 2. Aprovação do projeto pelo CEP FM/HUCFF	82
ANEXO 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	83
ANEXO 4. Formulários	93
ANEXO 5. Esquema de coleta	97
ANEXO 6. Formulário para monitoramento do estudo	97
ANEXO 7. Fig.2 Esquema de processamento das amostras	98
ANEXO 8. Figs. 3 e 4 Tubos para coleta das amostras	99

ANEXO 9. Figs. 5 e 6 Processamento das amostras	100
ANEXO 10. Figs. 7 e 8 Contagem dos "spots" e processamento das amostras para ensaio do kit	101
ANEXO 11. Fig. 9 Continuação do teste após incubação <i>overnight</i>	102
ANEXO12. Fig. 10 Foto dos "spots"	103
ANEXO 13. Pôster	104
Anexo 14. Artigos	106

ABREVIATURAS

Ags - antígenos

Ag85A ou Ag85B - Antígeno 85A ou 85B

AIDS - Síndrome de imunodeficiência adquirida - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin

BMI - Índice de massa corporal - Body Mass Index

CD - Grupo de diferenciação - *Cluster of Differentiation*

CDC - Centro de controle de doenças - Centers for Disease Control

CD4 - Proteína de superfície expressa na maioria de células T auxiliares (Th)

CD8 - Proteína de superfície expressa na maioria de células T citotóxicas (CTLs)

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CMI - Imunidade mediada por células - Cell Mediated Immunity

CFP 10- Proteína de filtrado de cultura

CRP - Proteína C-reativa - C-reactive protein

DOT - terapia diretamente observada - Directing observed treatment

ELISPOT - Ensaio imunoenzimático ligado à enzima - *Enzyme Linked Immunospot Assay*

EMB - Etambutol - Ethambutol

EPTB - Tuberculose extrapulmonar

ESAT-6 - Antígeno alvo precocemente secretado - *Early Secretory Antigenic Target-6*

FPR1 - receptor 1 de peptídeoformil

HIV - Vírus da imunodeficiência humana - *Human Immunodeficiency Virus*

HUCFF - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular 1- *Intercellular Adhesion Molecule 1* (CD54)

IGRAs - Ensaios para medida de Interferon-gama - *Interferon-gama release assays*

IFN- γ - Interferon gama - *Gamma Interferon*

INH - isoniazida

LAM - Lipoarabinomanana

LPS - Lipopolissacarídeo

LTBI - Infecção Latente por MTB - Latent Tuberculosis Infection

MTB - *Mycobacterium tuberculosis*

MNT - *Mycobacterium non tuberculosis*

MOXI - Moxifloxacino

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico – *peripheral blood mononuclear cells*

PBS - Salina tamponada com fosfato - *Phosphate Buffered Saline*

PID – número de identificação

PPD – derivado protéico purificado – *purified protein derivative*

PTB – Tuberculose pulmonar – *pulmonary tuberculosis*

PZA - Pirazinamida

RD-1 – Região de diferenciação 1

RIF - Rifampicina

suPAR – receptor derivado de uroquinase plasminogênica solúvel

TB- tuberculose

TBLI – Tuberculose latente – *tuberculosis latent infection*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TST – Teste tuberculínico cutâneo – *tuberculin skin test*

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

WHO- Organização Mundial de saúde – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura A - Média da contagem de "spots" em resposta aos diferentes Ags	58
Figura B - Média da contagem de "spots" nos diferentes tempos estudados	59
Figura C - Perfil da resposta celular individual pela formação de "spots"	61
Figura D.1 - Comparação entre leitura manual e automática dos "spots" para o controle negativo.	63
Figura D.2- Comparação entre leitura manual e automática dos "spots" para o Painel A de antígenos.	63
Figura D.3- Comparação entre leitura manual e automática dos "spots" para o Painel B de antígenos.	64
Figura D.4 - Comparação entre leitura manual e automática dos "spots" para o controle positivo.	64
Figura 1 - Parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	81
Figura 2 - Esquema de processamento das amostras (Oxfor Immunotech)	98
Figura 3 - Tubos para separação celular (a) CPT (b) técnica do Ficoll	99
Figura 4 - Tubos com amostras antes da separação celular	99
Figura 5 - Métodos para separação dos PBMCs	100
Figura 6 - Lavagem dos PBMCs	100
Figura 7 - Contagem das células	101
Figura 8 - Processamento de ensaio do kit	101
Figura 9-Continuação do teste após incubação "overnight"	102
Figura 10 - Foto dos "spots"	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas e clínico-radiológicas dos pacientes incluídos no estudo 55

Tabela 2 – Resultado qualitativo do teste T-SPOT.TB: % de indivíduos que tiveram teste reativo, dividido de acordo com antígeno estimulatório e por resultado de cultura após completar 8 semanas de tratamento 60

RESUMO

Cenário: A resposta imunológica aos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* sofrem mudanças durante o tratamento contra tuberculose (TB) e pode servir como um marcador alternativo de resposta ao tratamento. O Teste T-SPOT.TB detecta células T produtoras de IFN- γ em resposta a certos antígenos micobacterianos. A capacidade deste teste como marcador alternativo da eficácia do tratamento em pacientes com TB ativa ainda não foi bem avaliada.

Métodos: Usando o ensaio T-SPOT.TB nós enumeramos células T produtoras de IFN-gama em resposta aos antígenos específicos ESAT-6 e CFP-10 em pacientes com TB pulmonar recebendo terapia diretamente observada. A resposta das células T (medidas pela formação de "spots"- "spot forming cells" ou "SFCs") foi medida em três tempos – antes do início do tratamento, após completar 16 semanas de tratamento e após completar 24 semanas de tratamento. Foi feita cultura a partir de amostras de escarro após completar 8 semanas de tratamento.

Resultados: 58 pacientes foram avaliados. No geral, a média de "SFCs" declinou após 24 semanas. A média da contagem de "spots" para ESAT-6, CFP-10 e RD1 declinou de 42,7, 41,2, e 83,8 no período zero para 23,3, 23,2 e 46,5 ao completar 24 semanas de tratamento. Combinando os três tempos, a média de contagem de "SFCs" para ESAT-6, CFP-10, e RD1 foi, respectivamente, 32,6 (95% CI: 5,07 - 67,3), 16,6 (-3,09 - 37,2) e 49,2 (10,6 - 97,3) mais alto para o grupo com cultura positiva ao completar oito semanas de tratamento comparado com o grupo com cultura negativa ao completar oito semanas de tratamento.

Conclusão: Células T específicas, produtoras de IFN- γ , como medidas pelo teste T-SPOT.TB, podem estar relacionadas com a carga bacilar em pacientes em terapia contra tuberculose pulmonar.

ABSTRACT

Background: Immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens may change during tuberculosis (TB) treatment and could serve as a surrogate marker of treatment response. The T-SPOT.TB test detects IFN- γ -producing T cells that recognize certain *M. tuberculosis* antigens. Performance of this test as a marker of treatment efficacy in patients with active TB has not been fully evaluated.

Methods: Using the T-SPOT.TB assay, we enumerated ESAT-6- and CFP-10-specific IFN- γ -producing T cells over time in pulmonary TB patients receiving directly observed treatment. T cell responses (measured as spot forming cells or SFCs) were assessed three times – prior to treatment start, and after completion of 16 and 24 weeks of treatment. Sputum was cultured at completion of 8 weeks of treatment.

Results: 58 patients were evaluated. Overall, mean SFCs declined over 24 weeks. Mean (SD) ESAT-6, CFP-10, and summed RD1 specific SFCs declined from 42.7, 41.2, and 83.8 at baseline to 23.3, 23.2, and 46.5 at completion of 24 weeks of treatment, respectively. Combining the three time-points, the mean ESAT-6, CFP-10, and summed RD1 specific SFC counts were, respectively, 32.6 (95% CI: 5.07 to 67.3), 16.6 (-3.09 to 37.2), and 49.2 (10.6-97.3) spots higher for the group that was culture positive at completion of 8 weeks of treatment compared to the group that was culture negative.

Conclusions: IFN- γ -producing RD1-specific T cells, as measured in the T-SPOT.TB assay, may be directly related to bacterial load in patients undergoing treatment for pulmonary TB.

1 – INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma das principais doenças em países em desenvolvimento e um grande problema em países desenvolvidos (Houghton *et al.*, 2002). O agente causador da doença é *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e sua transmissão ocorre por inalação de gotículas de indivíduos infectados (van Crevel, Ottenhoff & van der Meer, 2002). No início do século 21, representa ainda, importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Jacobsen *et al.*, 2006). Segundo estimativas da WHO, um terço da população mundial está infectada com MTB (Pai, 2005); 8 a 9 milhões desenvolvem TB doença anualmente e o número de óbitos chega a 2 milhões por ano (Pai, Kalantri & Dheda, 2006; Wallis, 2009; <http://www.who.int> acessado em 12 junho de 2009).

A infecção por MTB é controlada através da resposta imunológica eficiente em cerca de 90% dos indivíduos infectados, enquanto 10% desenvolvem a doença em algum momento da vida (Jacobsen *et al.*, 2006). Em áreas não endêmicas o diagnóstico precoce e o tratamento da infecção latente é a chave para o controle da doença (Pai, 2005; Pai, Kalantri & Dheda, 2006). O uso de terapia preventiva em indivíduos com Tuberculose Latente (LTBI), que apresentam risco de desenvolver doença ativa, e o diagnóstico rápido com tratamento efetivo dos casos de TB ativa são fundamentais para este controle (Goletti *et al.*, 2008). Estudos demonstram que o tratamento preventivo da doença em indivíduos diagnosticados com infecção latente reduz o risco de doença ativa em até 60% (Jasmer *et al.*, 2002; ATS, 2000). Em países endêmicos a prioridade é o diagnóstico rápido e o tratamento da doença em estágio inicial evitando a sua propagação (Pai, 2005; Dominguez *et al.*, 2008).

Vários aspectos do diagnóstico da TB demonstram a necessidade do desenvolvimento de métodos rápidos, precisos e práticos para melhor controle da

doença (Pai, Kalantri & Dheda, 2006; Sartain *et al.*, 2006): 1- Pacientes com TB pulmonar podem apresentar baciloscopia negativa e o resultado da cultura para início do tratamento demora semanas (Dominguez *et al.*, 2008). 2 - Em pacientes com TB extrapulmonar a obtenção de amostras de escarro é ausente ou difícil e os métodos tradicionais de diagnóstico são ineficientes (Davies & Pai, 2008; Dominguez *et al.*, 2008). 3 - Mesmo após tratamento, episódios de reincidência da doença devido à reativação endógena ou à reinfecção exógena podem ocorrer (Bandera *et al.*, 2001). 4 - As técnicas moleculares, embora rápidas, sensíveis e específicas, são caras e não são aplicáveis em campo (Houghton *et al.*, 2002).

Outro ponto importante no controle da TB é o desenvolvimento de vacinas e novas drogas efetivas contra a doença. Para isso, é necessário o entendimento da resposta imunológica protetora do hospedeiro humano em relação à infecção pelo bacilo. Conseqüentemente é importante entender a relação quantitativa entre a resposta do hospedeiro e a doença e identificar quais populações de células contribuem para a imunidade protetora (Pathan *et al.*, 2001). Testes que demonstrem a relação entre resposta imunológica e declínio da quantidade de bacilos “in vivo”, podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos tratamentos, para prever falência na terapia ou reincidência e para monitorar a eficácia da medicação em casos em que amostras para diagnóstico tradicional são de difícil obtenção (Pathan *et al.*, 2001).

O progresso no entendimento do genoma do MTB e da resposta imunológica do hospedeiro humano tem levado ao desenvolvimento de novos testes para diagnóstico da tuberculose (Pathan *et al.*, 2001; Pai, 2005; Pai, Kalantri & Dheda, 2006) e também ao desenvolvimento de vacinas (Dominguez *et al.*, 2008). Nos últimos anos, tem-se ampliado o interesse no desenvolvimento de testes baseados

na detecção de anticorpos utilizando-se múltiplos antígenos o que aumenta a sensibilidade e especificidade (Sartain *et al.*, 2006).

Os biomarcadores, características mensuráveis indicadoras de processos biológicos normais e patogênicos, têm demonstrado várias utilidades na tuberculose. Tanto no acompanhamento e escolha de drogas para tratamento quanto no desenvolvimento de vacinas (Wallis *et al.*, 2009). Em relação à imunidade protetora na tuberculose, a produção de interferon-gama (IFN- γ) e resposta imunológica do tipo um têm sido escolhidas como biomarcadores para entendimento da proteção dos hospedeiros contra o bacilo (Jacobsen *et al.*, 2006).

O sucesso de um teste de imunodiagnóstico está na sua capacidade de identificação dos múltiplos estágios da doença, incluindo formas multibacilares, casos pediátricos e pacientes com co-infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Sartain *et al.*, 2006). Duas regiões específicas da região de diferenciação 1 (RD1) de MTB tem sido descritas: o antígeno alvo precocemente secretado 6 (ESAT-6) e a proteína de filtrado de cultura 10 (CFP 10) (Pathan *et al.*, 2001; Dominguez *et al.*, 2008). Esses antígenos induzem a secreção de IFN- γ por células T peptídeos-específicas (Pathan *et al.*, 2001; Mantegani *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2008).

Estudos realizados na última década (Andersen *et al.*, 2000, Wood *et al.*, 2001, Lalvani *et al.*, 2003) resultaram no desenvolvimento de dois ensaios comerciais baseados na detecção de IFN- γ , o QuantiFERON-TB assay (Cellestis Limited) e o T-SPOT.TB assay (Oxford Immunotec). Ambos os testes medem a resposta mediada por células através da medida de IFN- γ produzidos por células T em resposta a antígenos de TB, usando métodos como ELISA (Quantiferon) e ELISPOT (T-SPOT.TB).

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - *Mycobacterium tuberculosis* – Características Gerais

Mycobacterium tuberculosis é o agente causador da Tuberculose. Pertence ao gênero *Mycobacterium*, ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae*. É um bacilo não formador de esporos, sem flagelos, não produtor de toxinas, aeróbio estrito e intracelular facultativo (Haas & Dês Prez, 1995). As Micobactérias englobam mais de 80 espécies, sendo dois os principais patógenos humanos: *M. leprae* e *M. tuberculosis*. Os demais, são espécies ambientais (Requejo, 2000).

A principal característica morfológica que destaca as micobactérias de outros procariotos é a estrutura particular do envelope celular. Micobactérias reagem fracamente à coloração de Gram e não possuem o lipopolissacarídeo endotóxico, característico das bactérias Gram-negativas. A característica mais proeminente da parede celular das micobactérias é o ácido micólico, também conhecido como fator Corda. Contém entre 70 e 90 átomos de carbono, e constitui mais de 50% da massa do envelope celular. As moléculas interagem através de forças hidrofóbicas e formam um envelope lipídico ao redor da bactéria. Este envelope é responsável por algumas características: torna a bactéria álcool-ácido resistente na coloração de Ziehl-Neelsen; é responsável pela resistência endógena das micobactérias a drogas conhecidas, agindo como “barreira lipídica”; e leva à formação de grumos quando as bactérias são cultivadas em meio líquido. Além disso, o envelope torna a bactéria resistente frente a procedimentos brandos de lise celular, dificultando assim a obtenção de frações celulares que contêm proteínas nativas e ácidos nucleicos intactos. Uma outra molécula, característica da parede celular das micobactérias mas não covalentemente associada, é a lipoarabinomanana (LAM) (Trabulsi,

Microbiologia, cap56, 4^oed). O ANEXO 1 mostra esquema da estrutura do envelope celular

2.2 - *Mycobacterium tuberculosis*, Transmissão e Resposta Imunológica

A transmissão da tuberculose ocorre quando um indivíduo com TB pulmonar elimina gotículas na tosse ou espirro, e o indivíduo saudável aspira o núcleo de Wells (núcleo das gotículas). Estes atingem os bronquíolos e alvéolos onde são fagocitados pelos macrófagos (primeira fase); a partir daí, alguns fenômenos ocorrem: os macrófagos alveolares conseguem destruir os bacilos, o que depende da capacidade microbicida do hospedeiro e também dos fatores de virulência das bactérias fagocitadas; algumas micobactérias podem escapar da destruição inicial e se multiplicar, conduzindo ao rompimento dos macrófagos. Em seguida, monócitos do sangue e outras células inflamatórias migram para o pulmão (segunda fase). Os monócitos transformam-se em macrófagos que ingerem novamente a bactéria mas não a destroem. Nessa fase, as bactérias se multiplicam logaritmicamente, formando pequenas lesões tissulares, e monócitos se acumulam nos vasos adjacentes. Duas a três semanas depois da infecção, a imunidade mediada por células se desenvolve. Linfócitos T antígeno-específicos proliferam no interior das lesões e ativam macrófagos para matar as bactérias; a partir dessa fase, o crescimento logarítmico das micobactérias pára (terceira fase). A necrose sólida central nessas lesões primárias inibe o crescimento extracelular das bactérias e, como resultado, a infecção pode ficar estacionária ou dormente (van Crevel, Ottenhoff & van der Meer, 2002).

A infecção pode ainda progredir com disseminação logo após a infecção primária, bem como meses ou anos depois (TB pós-primária) quando ocorrer baixa imunológica (van Crevel, Ottenhoff & van der Meer, 2002; Ducati et al, 2006).

A infecção pode se instalar em qualquer parte do corpo, levando inclusive à infecção generalizada, com disseminação do microrganismo por todo o organismo hospedeiro (TB miliar). Esta representa a manifestação mais séria da doença. Entretanto, a manifestação mais comum de TB é a infecção pulmonar que varia de infiltração moderada à doença crônica, cavitária e severamente destrutiva. As diferentes manifestações da infecção por *M. tuberculosis* refletem o equilíbrio entre o bacilo e os mecanismos de defesa do hospedeiro (van Crevel, Ottenhoff & van der Meer, 2002).

Podem ainda ocorrer, episódios de reincidência da doença devido à reativação endógena ou à reinfecção exógena (Bandera *et al.*, 2001). Essa possibilidade de reinfecção exógena em pessoas previamente infectadas com *M. tuberculosis*, tem sido debatida por décadas, entretanto, esse fenômeno raramente ocorre devido à imunidade conferida pela infecção inicial. A extensão com que essa reinfecção ocorre depende da prevalência da doença na área: quanto maior a prevalência, maior a possibilidade de reinfecção (Fine & Small, 1999).

2.3 - Epidemiologia da Tuberculose

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 9,27 milhões de novos casos de tuberculose (139 casos por 100.000 habitantes) e 1,16 milhões de episódios subseqüentes ocorreram em 2007 comparado com 9,24 milhões em 2006. Desses 9,27 milhões de casos 1,37 milhões (14.8%) são indivíduos HIV positivos. Número que dobra a estimativa de 0.7 milhões de casos em 2006 publicados em 2008 (www.who.int/tb/en, acessado em 12 de Junho de 2009).

Entre os 22 países onde ocorrem 80% dos casos mundiais, o Brasil ocupa o 14º lugar. Em 2007 a estimativa da incidência de TB no país foi de 26 por 100.000

habitantes, totalizando 49.354 novos casos no ano. Sendo 13.019 indivíduos HIV positivos (www.who.int/tb, acessado em 08 de Junho de 2009).

2.4 – Diagnóstico da Tuberculose

O resurgimento global da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, agravada pela co-infecção por HIV (Rangaka *et al.*, 2007) e pelo aparecimento de cepas multidrogas-resistentes, realça a necessidade de medidas diagnósticas e de prevenção mais eficazes. Em países desenvolvidos, o crescimento do número de imigrantes provenientes de áreas endêmicas também demonstra a necessidade de vigilância contínua para detecção e tratamento da LTBI e TB ativa (Pai, 2005; Montegani *et al.*, 2006; Richeldi, 2006, Dosanjh *et al.*, 2008). Desta forma, agências de controle da tuberculose, têm renovado seu interesse em desenvolver novas ferramentas para o diagnóstico da TB (Pai, Kalantri & Dheda, 2006).

A – Diagnóstico Clínico

O Centro para Controle de Doenças (CDC), Atlanta, USA, utiliza os seguintes critérios para definir caso clínico de TB: Teste Tuberculínico cutâneo (TST) positivo; outros sinais e sintomas compatíveis com TB (raio-x anormal ou sintomatologia clínica como colapso lombar, efusão pleural) e tratamento com duas ou mais drogas anti-TB. A definição laboratorial inclui: isolamento do MTB a partir de amostra clínica do paciente; demonstração de MTB por Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAA) e Bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) positivo quando a cultura não pode ser obtida. Publicações recentes do National Institute for Health and Clinical Excellence, levam em conta ainda fatores epidemiológicos, soropositividade, dieta pobre, fumantes e histórico de contato com pacientes (Davies & Pai, 2008).

B – Diagnóstico Radiológico

Quando há suspeita clínica de tuberculose, baseada na história do paciente, o raio-X é, usualmente, a próxima etapa no diagnóstico da doença. Com o incremento de co-infecções por HIV, torna-se mais difícil a avaliação do raio-x pois sintomas comuns na radiografia para TB estão ausentes em imunocomprometidos (Davies & Pai, 2008). A vantagem da radiografia é o tempo em relação ao resultado da cultura ou escarro. Entretanto, é uma técnica não específica e somente a identificação do bacilo a partir de espécime isolada do paciente pode confirmar a presença de TB (Davies & Pai, 2008). Por esta razão, a OMS propôs que os casos escarro- negativo não exceda 50% do total de casos provenientes do centro de diagnóstico. Recomenda-se que todas as pessoas com raio-x sugestivo para tuberculose, tenham amostra de escarro submetida à exame microbiológico (Davies & Pai, 2008).

C – Diagnóstico Bacteriológico

Os dois métodos mais utilizados para o diagnóstico de TB ativa são a demonstração da presença do bacilo álcool-ácido resistente no espécime clínico através da coloração de Ziehl-Neelsen e a cultura para micobactéria em meio específico. Embora a pesquisa de BAAR no escarro apresente boa sensibilidade em pacientes que produzem escarro e que têm doença pulmonar avançada, isto não ocorre nos pacientes com doença pulmonar limitada, com dificuldade de expectorar ou que não têm expectoração espontânea (Daniel & Debanne, 1987; Sant'Anna *et al.*, 2005, Davies & Pai, 2008, Sztajn bok, *et al.*, 2009). Além disso, sua sensibilidade é comprometida devido à necessidade de grandes quantidades do bacilo na amostra (10.000 bacilos por ml) para que ocorra a detecção. Entretanto, a sensibilidade pode ser aumentada concentrando-se o espécime através de processamento adequados

de centrifugação e exame microscópico por imunofluorescência (Chan, Heifets & Iseman, 2000; Davies & Pai, 2008).

Os protocolos de cultura para micobactérias apresentam limitações como o tempo de espera do resultado, normalmente entre 28 e 60 dias, e a taxa de até 20% de casos falso-negativos (Laszlo, 1999). Mais recentemente, várias técnicas utilizando meio líquido têm levado à melhoria do teste diminuindo o tempo para a identificação do microrganismo. Outros problemas relacionados com a técnica são: necessidade de laboratórios especializados; probabilidade de contaminação das culturas com micobactérias não tuberculosas (MNT) e a contaminação cruzada com espécies do laboratório, o que gera resultados falso-positivos (Chan, Heifets & Iseman, 2000). Além disso, nos casos suspeitos de TB pulmonar, quando o paciente não consegue expectorar, técnicas invasivas, como a broncofibroscopia, fazem-se necessárias para obtenção do espécime clínico a ser avaliado (Light, 1997; Pathan *et al.*, 2001).

D – Diagnóstico Molecular

Com o progresso das técnicas moleculares, métodos mais sensíveis e rápidos para detecção de MTB foram desenvolvidos. Alguns desses métodos foram avaliados com especificidade e sensibilidade superiores a 90% (Ducati *et al.*, 2006). Ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos e ao desenvolvimento de novos ensaios de imunodiagnóstico que utilizem antígenos semi-purificados e clonados, específicos para as micobactérias pertencentes ao complexo tuberculose. Os métodos de amplificação de ácidos nucleicos permitem a detecção do material genético do *M. tuberculosis* (revisado por Woods, 2001; Soini & Musser, 2001; Ducati *et al.*, 2006) diretamente a partir do espécime clínico do paciente, podendo ser usados para complementar, mas não

para substituir, técnicas convencionais (Davies & Pai, 2008). Entretanto, embora rápidas, sensíveis e específicas, estas tecnologias são caras e não são aplicáveis em campo (Houghton *et al.*, 2002) e, portanto, não servem para uso rotineiro na saúde pública em países em desenvolvimento (Ducati *et al.*, 2006).

E – Diagnóstico Imunológico

E.1 – Tuberculose ativa

Testes sorológicos têm sido usados há alguns anos, entretanto, não são recomendados para o diagnóstico de TB. Em países de baixa renda, um número indeterminado destes testes é comercializado. Na teoria, testes sorológicos são vistos como alternativa potencial no incremento do diagnóstico da TB por serem rápidos e simplificados em relação à microscopia e cultura, particularmente para detecção em pacientes com amostras de escarro negativas ou com TB extrapulmonar (EPTB) (Davies & Pai, 2008). Dois trabalhos recentes (Steingart *et al.*, 2007; Davies & Pai, 2008) avaliaram a validade de testes sorológicos para TB. Estes estudos sugerem que até o momento os dados publicados de testes sorológicos comercializados para tuberculose pulmonar (PTB) e TB extra pulmonar resultaram em incertezas quanto à sensibilidade e especificidade dos ensaios baseados na produção de interferon – IGRAs (Davies & Pai, 2008). Para PTB, os dados foram insuficientes para determinar a acurácia da maioria dos testes comerciais em pacientes com escarro negativo. Para EPTB, não há estudos de testes comerciais de qualidade suficiente para detectar evolução em pacientes com co-infecção por HIV ou em crianças e até o momento, estes testes têm pouca ou nenhuma validade no diagnóstico de TB ativa (Rangaka *et al.*, 2007; Steingard *et al.*, 2007; Davies & Pai, 2008).

E.2 – Infecção latente

E.2.1 – Teste Tuberculínico cutâneo

Quanto ao diagnóstico da tuberculose latente, o teste tuberculínico cutâneo tem sido utilizado por décadas. Foi introduzido em 1890 (Huebner *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2002) na tentativa de medir a imunidade mediada por células através de uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia ao estímulo com derivado purificado proteico -'purified protein derivative'-PPD- (Pai, 2005; Ducati *et al.*, 2006) e, até recentemente, era o único teste para se diagnosticar LTBI (Pai, 2005). É o método de vigilância epidemiológica utilizado no mundo todo e pode ser usado para detectar contato recente ou passado com o MTB (Ducati *et al.*, 2006). O PPD é uma mistura bruta de antígenos que pode ser encontrada em *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG e outras várias micobactérias não tuberculosas (Huebner *et al.*, 1993; Andersen *et al.*, 2000; Tissot *et al.*, 2005; Ducati *et al.*, 2006). Como resultado, o teste tem baixa especificidade em populações vacinadas com Bacilo Calmette-Guerin (BCG) ou onde a exposição à MNTs é alta, além de ter sua sensibilidade provavelmente diminuída em pacientes imunodeprimidos (Huebner *et al.*, 1993; ATS, 2000; Andersen *et al.*, 2002; Jasmer *et al.*, 2002; Richeldi, 2006). A aplicação e leitura do teste não é fácil devido a variabilidade em relação aos leitores, à necessidade de pessoal e ao fato de os pacientes terem de retornar para leitura do resultado (Pai *et al.*, 2004; Tissot *et al.*, 2005). Apesar dessas limitações, o teste continua sendo utilizado na detecção de LTBI pois resultados demonstram que o tratamento da LTBI reduz o risco de desenvolvimento da doença ativa em até 60% (Jasmer *et al.*, 2002; ATS, 2000). A maior vantagem do teste é o baixo custo do material e o fato de não requerer nenhuma infraestrutura laboratorial (Pai *et al.*, 2004).

E.2.2 – Ensaio baseado na produção de Interferon-gama (Interferon-gama release assays – IGRAs)

Como alternativa ao TST, um novo ensaio para detecção da resposta mediada por células T “in vitro” tem sido desenvolvido: os Interferon-gama release assays - IFN γ assays (Lein *et al.*, 1997, Dockrell *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2000; Lalvani *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2004; Dosanjh *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009).

A resposta imunológica à infecção com antígenos de MTB é predominantemente uma resposta imunológica mediada por células (CMI). Como parte dessa resposta, células T são sensibilizadas para antígenos do MTB. Ambas as células T efetoras ativadas (CD4 e CD8) produzem uma citocina (IFN γ) quando estimuladas por esses antígenos (Janeway & Travers, Immunobiology 2nd Ed, 1996). O uso de antígenos (Ags) selecionados para o complexo MTB (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*) aumenta a especificidade pela redução da reação cruzada com vacinação por BCG e com outras MNTs (Chapman *et al.*, 2002; Ewer *et al.*, 2003; Ravn *et al.*, 2008).

Os IGRAs são baseados no princípio de que células T de indivíduos sensibilizados com antígenos de *M. tuberculosis*, produzem interferon-gama quando reencontrarem antígenos micobacterianos (Andersen *et al.*, 2000, Richeld, 2006; Menzies *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2007; Dosanjh *et al.*, 2008). Um nível alto para produção de IFN γ indica tuberculose infecção. Estudos iniciais focaram no uso do PPD como antígeno estimulatório, e, atualmente, baseiam-se em antígenos específicos para *M. tuberculosis*, como o antígeno precocemente secretado ESAT 6 e a proteína de filtrado de cultura 10 (CFP 10) (Andersen *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2004, Ravn *et al.*, 2008), codificados por genes localizados dentro da região de diferenciação um (RD 1) do genoma de MTB, o que aumenta a especificidade e

evita reações cruzadas com vacinação com BCG e contato com MNTs (com exceção de *M. kansasii*, *M. marinum* e *M. szulgai*) (Sorensen *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2005; Beamer *et al.*, 2008).

Os testes comerciais avaliados nos últimos anos, QuantiFERON-TB assay (Cellestis Limited) e o T-SPOT.TB assay (Oxford Immunotec), medem a resposta mediada por células através da mensuração de IFN- γ produzidos por células T em resposta a antígenos de TB, usando métodos como ELISA (quantiferon) e ELISPOT (T-SPOT.TB). O primeiro mede a concentração de IFN- γ em sangue total em resposta a antígenos de MTB e o segundo, mede o número de células produtoras de interferon-gama em sangue total periférico (Fig. 2- ANEXO 7) (Pai *et al.*, 2004; Menzies *et al.*, 2007; Adetifa *et al.*, 2007; Davies & Pai, 2008; Connell *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009).

Em relação ao TST, os IGRAs possuem as vantagens de requererem apenas uma visita do paciente, serem testes “ex vivo”, o que reduz o risco de efeitos adversos e elimina o potencial estimulatório quando o teste é repetido. Entretanto, esses testes têm alto custo de material, necessitam de laboratório equipado e coleta de sangue com manipulação subsequente cuidadosa da amostra para manter a viabilidade dos linfócitos (Menzies *et al.*, 2007).

Acredita-se que a resposta das células T está inversamente correlacionada com a progressão da doença, verificando-se baixa resposta linfoproliferativa e inexistência de reação cutânea ao PPD em pacientes com tuberculose pulmonar avançada (Orme I M *et al.*, 1993; Gong J H *et al.*; 1996). Alguns autores, entretanto, acreditam que a frequência de células T decai durante o tratamento, refletindo a queda da carga bacilar (Lalvani A, 2004). Se esta hipótese estiver correta, a medida desta resposta pode ser usada para monitorar o efeito do tratamento para LTBI ou

TB ativa e como marcador alternativo de cura ou predição de recidiva (Chee, C B E *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009)

Resultados do estudo de Lawn e colaboradores (Lawn *et al.*, 2007) demonstram a utilidade do teste como possível ferramenta para detecção de TB em pacientes com HIV. Resultados de dois estudos demonstraram papel do teste ELISPOT RD1 também no monitoramento da eficácia do tratamento (Pathan *et al.*, 2001; Carrara *et al.*, 2004). Entretanto, ambos os estudos são limitados devido à baixa quantidade de amostras, grupos heterogêneos de pacientes em termos de sítios da doença e falta de critérios clínicos e microbiológicos cuidadosos usados para determinar o critério de resposta ao tratamento. Estudos adicionais são necessários para definitivamente determinar o ensaio como um marcador na eficácia do tratamento contra TB (Pathan *et al.*, 2001; Carrara *et al.*, 2004) e também seu uso para detecção de TB em grupos específicos de pacientes como indivíduos HIV positivos (Lawn *et al.*, 2007).

O T-SPOT.TB é uma variante simplificada da técnica do “enzyme_linked immunospot” (ELISPOT). Segundo informações do fabricante, dois painéis de antígenos (Ags) separados, simulam no poço de uma placa para ensaio, características das proteínas ESAT-6 e CFP-10 que são usados para aperfeiçoar a sensibilidade do teste. O ensaio é desenhado para detecção de células-T efectoras que secretam a citocina em resposta a estímulo por Ags específicos para MTB (Chapman *et al.*, 2003; Lalvani *et al.*, 2001). O ensaio é apropriado para uso com todos os pacientes com risco de tuberculose infecção latente ou suspeita de estar com TB doença (Méier *et al.*, 2001; Zellweger *et al.*, 2005).

Os IGRAs não detectam diretamente a presença de MTB na amostra e sim resposta imunológica celular à recente ou passada sensibilização por antígenos de

MTB não diferenciando assim, TB ativa de LTBI (Pai, 2005; Davies & Pai, 2008).

Neste aspecto, os IGRAs são similares ao TST (Pai, 2005).

F – Comparação entre TST e IGRAs (Pai 2005; Mazurek *et al.*, 2007)

Características	TST	IGRAs
Sensibilidade estimada (em pacientes com TB ativa)	75-90%	80-90%
Especificidade estimada	70-95%	95-100%
Reatividade cruzada com vacinação com BCG	Sim	Pouco provável
Reatividade cruzada com MNT	Sim	Pouco provável
Associação entre positividade e risco de desenvolvimento de TB ativa	Moderada a alta	Sem evidências (embora pequenos estudos já venham demonstrando alta associação)
Correlação com exposição à MTB	Sim	Sim (correlacionando melhor que o TST)
Benefícios de tratar pacientes com testes positivos	Cerca de 60% de redução de desenvolvimento de TB ativa	Sem evidências
Reprodutibilidade	Moderada	Poucas evidências sugestivas de ser alta
“Boosting”	Sim	Não (teste “ex vivo”)
Reações adversas	Raras (ulcerações)	Raras (venopunções)
Custo	Baixo	Moderado a alto
Visita do paciente	Duas	Uma
Infra-estrutura laboratorial	Não	Sim
Tempo de obtenção do resultado	2-3 dias	1-2 dias
Profissional treinado	Sim	Sim

O TST, de acordo com os dados acima, tem sensibilidade e especificidade moderada a alta variando de acordo com a população em estudo. A especificidade tende a variar mais que a sensibilidade. Embora impreciso o teste tem baixo custo e o tratamento de indivíduos PPD reator reduz cerca de 60% o risco de desenvolvimento de TB ativa (Pai, 2005).

Devido à inexistência de um método ouro para diagnóstico da LTBI, não é possível avaliar a sensibilidade e especificidade dos IGRAs. O que tem sido demonstrado nos estudos é a comparação entre TST e IGRAs (Pai, 2005)

2.5 – Marcadores Imunológicos

Biomarcadores são características mensuráveis que indicam processos biológicos normais e patogênicos ou respostas farmacológicas por intervenção terapêutica. Em ensaios clínicos os biomarcadores oferecem a possibilidade de um desfecho alternativo que possa substituir os desfechos clínicos. A maior parte dos biomarcadores representa um evento que está diretamente envolvido na patogênese ou proteção e qualquer mudança durante o tratamento pode ser relatada pela farmacologia e farmacocinética da intervenção (Wallis *et al.*, 2009).

Os biomarcadores podem ser classificados de várias maneiras por ensaios estáticos, através da medida de níveis analisáveis em amostras clínicas, ou por ensaios dinâmicos ou funcionais a partir da medida de processos, como resposta a estímulos “in vivo” ou “in vitro”. Alguns marcadores são específicos para determinadas doenças e não são confundidos com doenças concomitantes ou terapias e podem ser úteis como testes diagnósticos. Finalmente, podem originar do hospedeiro ou do patógeno (Wallis *et al.*, 2009).

Vários usos têm sido propostos para biomarcadores na tuberculose. Durante o desenvolvimento de drogas, para auxiliar na seleção do alvo, identificação do

modelo, seleção de dose apropriada e esquema de dosagem, seleção de combinação de drogas com aditiva ou sinérgica interação, uso no desenvolvimento de novas vacinas e como marcadores alternativos para acompanhar a evolução do tratamento predizendo falências e/ou recidivas.

A produção de IFN- γ em resposta a antígenos específicos (Jacobsen *et al.*, 2006); Neopterin; molécula solúvel de adesão intercelular - sICAM1; receptor ativador de uroquinase plasminogênica solúvel – suPAR; proteína C reativa- CRP (Wallis *et al.*, 2009; Walzil *et al.*, 2008); sIL2R; sTNFR; fragmentos de RNA Ag85B em amostras de escarro (Wallis *et al.*, 2009); receptor 1 de peptídeo formil - FPR1 e grupo de diferenciação 64 - CD64 (Jacobsen *et al.*, 2006), são alguns dos biomarcadores estudados como alternativos para uso em diagnóstico e tratamento da tuberculose.

2.6 – Resposta imunológica no estudo de vacinas

A vacina atualmente utilizada na proteção contra tuberculose, BCG, produzida a partir de *Mycobacterium bovis*, protege somente contra as formas severas da doença na infância, mas não confere proteção contra a forma mais prevalente da doença que é a TB pulmonar em adultos. Portanto, está clara a necessidade do desenvolvimento de uma vacina mais eficiente (Kaufmann, 2006).

A seleção de Ags para inclusão em novas vacinas depende da identificação dos alvos de proteção da imunidade “in vivo”, embora pouco seja conhecido sobre os antígenos alvos da imunidade protetora em humanos. Em roedores, antígenos secretados são os alvos predominantes da imunidade protetora (Pathan *et al.*, 2001) e a vacinação com esses antígenos pode conferir proteção (Horwits *et al.*, 1995; Pathan *et al.*, 2001).

O ESAT 6, um antígeno altamente específico para o complexo MTB é o alvo principal de células T CD4 secretoras de IFN- γ em modelos murinos e a imunização com essa proteína induz imunidade protetora contra a TB (Olsen *et al.*, 2000; Pathan, 2001). Em humanos, observações demonstraram que ESAT 6 é identificada em amostras de grande proporção de pacientes com TB ativa. A proteína está ausente em BCG (Andersen *et al.*, 2000), o que têm chamado a atenção para seu uso também como um reagente diagnóstico (Pathan *et al.*, 2001).

2.7 – Resposta ao Tratamento

A adesão ao tratamento contra tuberculose é limitada por fatores clínicos, sociais, financeiros e comportamentais. A duração do tratamento, por exemplo, é uma das causas de falência e recidivas já que muitos abandonam o tratamento quando se sentem melhor (Burman *et al.*, 1997). O tratamento da TB tem se complicado em função do crescimento no número de cepas multidrogas resistentes e da co-infecção pelo HIV (McDonald *et al.*, 1982; Cohn *et al.*, 1990; Churchyard *et al.*, 2000). Dessa forma, o desenvolvimento de regimes alternativos que reduzam o tempo de tratamento é prioridade no controle da tuberculose. Igualmente, é de grande importância o desenvolvimento de novas drogas que possam ser usadas contra cepas multirresistentes (Kennedy *et al.*, 1996). O uso da terapia diretamente observada (DOT) é uma estratégia que tem aumentado a adesão do paciente ao tratamento e reduzido a emergência de microrganismos resistentes. Neste modelo, cada dose do medicamento é diretamente administrada pelo profissional de saúde que observa e anota a ingestão das drogas (Burman *et al.*, 1997).

Tratamentos efetivos têm sido avaliados por mais de 50 anos. Com o início da quimioterapia, tornou-se evidente que o uso de uma única droga no tratamento da tuberculose resultou na seleção de clones resistentes a drogas e na emergência de

doença resistente. A quimioterapia combinada mostrou-se eficiente na cura da doença ativa e prevenção da emergência de resistência. Entre 1952 e 1982, uma série de estudos definiu o modelo de tratamento corrente contra TB, padronizado com o uso de quatro drogas: Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Pirazinamida (PZA) e Etambutol (EMB). As drogas Isoniazida e Rifampicina são os agentes mais ativos e a base da terapia (McDonald *et al.*, 1982; Cohn *et al.*, 1990).

INH demonstra considerável atividade bactericida contra microrganismos em divisão ativa e RIF, apesar da moderada atividade bactericida, possui potente atividade esterilizante sobre organismos semidormentes com multiplicação reduzida. Um regime de INH e RIF por 9 meses cura praticamente 100% dos casos droga-susceptíveis, com taxa de recidiva menor que 5% (McDonald *et al.*, 1982; Cohn *et al.*, 1990).

A adição de EMB possibilita a redução do risco de emergência de doença resistente no decorrer do tratamento, mas não reduz a duração da terapia. A PZA não possui atividade bactericida significativa, mas é uma droga fortemente esterilizante. A adição de PZA nos primeiros dois meses de um regime de seis meses de INH e RIF leva a um índice de cura similar ao obtido com nove meses com apenas duas drogas (McDonald *et al.*, 1982; Cohn *et al.*, 1990).

Nos últimos 30 anos apenas uma droga, Rifapentina, foi aprovada para uso no tratamento contra tuberculose. Estudos atuais substituem o EMB por Moxifloxacino (MOX), uma fluoroquinolona com atividade antimicrobiana, incluindo organismos gram-positivos e negativos, que inibe a topoisomerase bacteriana necessária para a replicação (Miyazaki *et al.*, 1999; Malathum *et al.*, 1998; Dombek *et al.*, 2001). Estas substituições têm como objetivo reduzir o período da terapia contra TB (Kennedy *et al.*, 1996).

2.8 – História Natural da LTBI

A LTBI é uma síndrome clínica causada pela exposição ao *M. tuberculosis*, seguida do estabelecimento da infecção e resposta imunológica do hospedeiro para controlar o crescimento bacilar, forçando um estado de quiescência no tecido infectado. Este estado é caracterizado pela redução do metabolismo bacteriano em consequência à ação da resposta imunológica celular, que pode, até certo ponto, conter, mas não eliminar a infecção. Não é uma doença infecciosa como a TB ativa, não representando desta forma, problema de saúde pública (Ducati *et al.*, 2006). Por outro lado, a infecção pode progredir para TB ativa (Jasmer *et al.*, 2002; Ducati *et al.*, 2006) até mesmo várias décadas após o contato com o bacilo, por comprometimento do sistema imunológico, como co-infecção por HIV, desnutrição, idade, uso de drogas, câncer, diabetes, insuficiência renal crônica e terapia com drogas imunossupressoras (Ducati *et al.*, 2006) o que sugere tratamento dos indivíduos TST positivos como forma de prevenção ao desenvolvimento da doença (Pai, 2005; Ducati *et al.*, 2006; Pai, Kalantri & Dheda, 2006).

A sobrevivência intracelular da bactéria é baseada na capacidade de sobreviver com à acidificação do fagossomo em macrófagos infectados e à capacidade de prevenir a fusão fagossomo-lisossomo. Na maioria dos pacientes imunocompetentes há o recrutamento de células T e macrófagos e estabelecimento de resposta imunológica secundária, resultando no controle da infecção (Ducati *et al.*, 2006).

3 – JUSTIFICATIVA

A infecção com MTB, na maioria dos indivíduos, é contida pela resposta imunológica e a infecção permanece latente, entretanto há o risco de progressão da forma latente para TB ativa (Ewer *et al.*, 2006; Pai, Kalantri & Dheda, 2006). A ampla faixa de fenômenos clínicos resultantes da infecção por MTB, como controle do bacilo com sintomas mínimos, resolução espontânea pelo hospedeiro, baixa carga bacilar ou desenvolvimento de TB ativa com sintomas severos, oferece a oportunidade de investigar a relação entre a resposta imunológica e o declínio do conteúdo de bacilos “in vivo” (Pathan *et al.*, 2001).

Com o avanço da Biologia Molecular e entendimento do genoma micobacteriano, novas alternativas de diagnóstico têm sido desenvolvidas, como ensaios “in vitro” que medem a produção de IFN- γ por células T específicas sensibilizadas com antígenos de MTB, chamados IGRAs (Pai, Kalantri & Dheda, 2006).

Estudos realizados na última década (Andersen *et al.*, 2000, Wood *et al.*, 2001, Lalvani *et al.*, 2003) resultaram no desenvolvimento de dois ensaios comerciais baseados na detecção de IFN- γ , o QuantiFERON-TB assay (Cellestis Limited) e o T-SPOT.TB assay (Oxford Immunotec). Ambos os testes medem a resposta mediada por células através da medida de IFN- γ produzidos por células T em resposta a antígenos de TB, usando métodos como ELISA (Quantiferon) e ELISPOT (T-SPOT.TB).

A resposta imunológica aos antígenos de MTB pode mudar durante o tratamento da doença o que pode servir como um marcador alternativo para monitorar a resposta ao tratamento. Poucos estudos foram desenvolvidos para esclarecer a eficiência dos IGRAs no acompanhamento de resposta ao tratamento.

Resultados de dois estudos sugerem papel do teste ELISPOT RD1 também no monitoramento da eficácia do tratamento (Pathan *et al.*, 2001; Carrara *et al.*, 2004). Entretanto, estudos adicionais envolvendo grupos específicos de pacientes são necessários para realmente determinar a relação entre tratamento e resposta imunológica e conseqüentemente, a utilidade dos IGRAs como marcador de sucesso do tratamento anti-tuberculose (Pathan *et al.*, 2001; Carrara *et al.*, 2004).

4 – DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

A cultura micobacteriana é usada para avaliar a resposta ao tratamento contra tuberculose, mas sua utilidade clínica é limitada pelo longo tempo requerido para obtenção dos resultados (devido à taxa de crescimento lenta do *M. tuberculosis* em cultura) e pela dificuldade na obtenção de amostra clínica em caso de TB extrapulmonar. Recentemente, novos ensaios para diagnóstico de TB têm sido desenvolvidos baseados na enumeração de células T secretoras de IFN- γ em resposta a antígenos específicos de *M. tuberculosis* da região RD 1 do complexo MTB (Lalvani *et al.*, 2001; Lalvani *et al.*, 2001; Pathan *et al.*, 2001) a partir de amostra de sangue periférico, utilizando-se a técnica de ELISPOT (“enzyme linked immunospot”). Resultados de dois estudos demonstram o papel do teste RD1 ELISPOT no monitoramento da eficácia do tratamento contra TB (Pathan *et al.*, 2001; Carrara *et al.*, 2004). Entretanto ambos os estudos foram limitados pelo pequeno número de amostras estudadas, grupos heterogêneos de pacientes em termos de sítio da doença e falta de cuidados clínicos e microbiológicos. Estudos adicionais são necessários para determinar definitivamente o papel do teste RD1 ELISPOT como um marcador alternativo da eficácia do tratamento contra tuberculose.

5 – HIPÓTESE DO ESTUDO

Atualmente, a maioria dos autores considera que o tratamento contra tuberculose favorece a resposta imunológica e, conseqüentemente, a produção de células T específicas.

Nossa hipótese de trabalho, em anteposição ao pensamento majoritário, considera que *o tratamento da tuberculose ocasionando uma diminuição da carga bacilar resulta na diminuição da freqüência de células T específicas para antígenos de MTB.*

Conseqüentemente, um teste com capacidade de medir a produção de células T produtoras de IFN- γ em resposta a antígenos específicos para *M. tuberculosis*, poderia servir como um marcador alternativo para monitorar a eficácia do tratamento contra TB, na medida em que identificasse o declínio das células formadoras de “spots” (SFCs) a partir de amostras de sangue periférico de pacientes com TB em tratamento específico.

6 - OBJETIVOS

6.1-Objetivo geral

Comparar a frequência de células T RD1-específicas em pacientes com cultura positiva para *M. tuberculosis* “versus” pacientes com cultura negativa na oitava semana de tratamento em três diferentes tempos: tempo zero (linha de base = antes do início do tratamento); semana 16 (16ª semana de tratamento) e semana 24 (24ª semana de tratamento). O resultado da cultura na oitava semana foi utilizado como um marcador alternativo ao padrão ouro aceito de permanente cura da TB sem reincidência (critério clínico e bacteriológico, sem recidiva por pelo menos dois anos de ‘follow-up’) para viabilizar o estudo.

6.2-Objetivos específicos

1. Determinar a sensibilidade do ensaio T-SPOT.*TB* entre todos os pacientes com cultura confirmada para TB;
2. Determinar a sensibilidade do ensaio T-SPOT.*TB* entre todos os pacientes com cultura confirmada para TB e com co-infecção por HIV;
3. Comparar a frequência de células T RD1 específicas, em cada tempo, em pacientes com falência de tratamento;
4. Comparar a frequência de células T RD1 específicas, em cada tempo, em pacientes com recidiva “versus” pacientes sem recidiva;
5. Determinar as diferenças na frequência de células T RD1 específicas e mudanças nessa frequência no tempo final para pacientes com cultura positiva “versus” cultura negativa na oitava semana de tratamento;

6. Determinar as diferenças na frequência de células T RD1 específicas e mudanças nessa frequência no tempo final em indivíduos em regime de tratamento;
7. Determinar a associação entre contagem de SFCs e severidade da TB doença no tempo zero;
8. Comparar os resultados obtidos por contagem visual (lupa) e automatizada dos “spots”.

7 – MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo coorte horizontal de um novo teste diagnóstico, o T-SPOT.*TB*, para TB. Todos os pacientes incluídos no estudo para tratamento com Moxifloxacino (estudo paralelo para avaliar e comparar a atividade antimicrobiana de dois regimes diários de tratamento contra TB administrados durante 8 semanas em pacientes com TB pulmonar, por DOT) foram incluídos no estudo T-SPOT.*TB*.

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – HUCFF – UFRJ sob o número 789/06 em 18/09/2006 (ANEXO 2).

7.1 – Seleção e inclusão de pacientes

O estudo foi conduzido no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, Brasil.

Foram incluídos pacientes com TB confirmada que procuraram o ambulatório de TB ou pacientes internados no setor de TB do hospital. Todos os pacientes incluídos no estudo MOXI foram também incluídos no estudo T-SPOT.*TB*.

- **Crítérios de inclusão:** Envolvimento no estudo “Phase 2 Randomized Trial of Moxifloxacin- containing Regimen for Treatment of Smear Positive Pulmonary Tuberculosis in Adults with and without HIV Infection”.

- **Crítérios de exclusão:** Recusar o termo de consentimento (TCLE-ANEXO 3), história prévia de tuberculose ou tratamento contra tuberculose e gravidez.

7.2 – Desenvolvimento do estudo

Após consentimento informado, sangue venoso periférico foi coletado dos pacientes em três diferentes tempos (ANEXO 5)

- Linha de base (t=0, definido como o intervalo de tempo de 14 dias ou menos antes do início do tratamento para TB ou dentro de 7 dias ou menos após início de tratamento)
- Ao completar 16 semanas de tratamento (+/- 14 dias)
- Ao completar 24 semanas de tratamento (+/- 14 dias)

No tempo zero o sangue foi coletado em três tubos CPT (BD Vacutainer CPT Tubes), na quantidade de 8 mL por tubo, num total de 24 mL, e, em cada um dos outros dois tempos, a coleta foi feita em dois tubos CPTs, na quantidade de 8mL por tubo totalizando 16mL. O sangue foi transportado no intervalo de até 8 horas para o laboratório. Para cada 2 tubos de cada tempo, “peripheral blood mononuclear cels” (PBMCs) foram isolados por centrifugação, lavados duas vezes, suspensos em solução de congelamento e estocados em nitrogênio líquido, de acordo com protocolo para criopreservação da Oxford Immunotec. Para o tempo zero de cada paciente, um tubo CPT foi usado para isolamento e estimulação das células antes do congelamento: PBMCs foram isolados por centrifugação, lavados duas vezes, suspensos em meio enriquecido e imediatamente testadas no T-SPOT.*TB*. Para cada paciente, individualmente, o ensaio T-SPOT.*TB* das amostras congeladas foi feito usando uma mesma placa do “Kit” em ordem definida para evitar erros sistemáticos na preparação das amostras. O ensaio com o “kit” foi feito seguindo às instruções do fabricante. Para leitura dos resultados, os “spots” foram contados com ajuda de uma lupa ao fim de cada teste e ao microscópio quando toda a placa já havia sido utilizada, para não queimar, com a luz do microscópio, os poços ainda não utilizados. Em adição, as placas foram guardadas para enumeração subsequente usando leitor automático.

7.3 – Coletas de dados e monitoramento

A - Formulários usados

ESTUDO MOXI:

- Formulários para consentimento livre e esclarecido em português (TCLE – ANEXO 3);
- Formulários qualificados para inclusão;
- Formulários para coleta de dados

T-SPOT.TB

- Formulários de laboratório (ANEXO 4) que documentaram recebimento de espécimes e tratamento, processamento das amostras, realização dos ensaios e resultados;
- Formulários de laboratório que documentaram manipulação e estoque de reagentes e garantia de qualidade das atividades (ANEXO 4).

B - Formulários para complementação e submissão dos dados

Todos os formulários foram completados e os dados inseridos de acordo com as instruções no manual de operações de administração de dados. Os nomes foram obtidos apenas uma vez, e esta informação foi colocada em um formulário diferente do formulário para resultado do teste e estes foram arquivados separadamente.

As iniciais do responsável por completar os formulários foram colocadas no fim da primeira página de cada formulário. Todos os formulários foram revistos antes da entrada dos dados quanto à precisão, consistência e complementação da localização pelo responsável pelo estudo.

C – Gravação dos dados e arquivamento

Todos os dados coletados e gravados nos formulários foram arquivados em uma área segura. Todas as informações da localização foram colocadas em salas

separadas de todos os demais documentos do estudo e em áreas seguras, sem acesso de indivíduos não relacionados ao estudo. Acesso aos dados do estudo e arquivos de dados foi limitado à equipe do estudo, incluindo os responsáveis visitantes da Johns Hopkins University e UFRJ.

D – Gerenciamento

Cada participante do estudo de tratamento com Moxifloxacino foi identificado com um único número de identificação no estudo. Este número foi usado para o estudo T-SPOT.TB. Este número consta em cada formulário e espécime clínico para facilitar a ligação dos dados. Para diminuir erros de transcrição e assegurar que cada dado coletado e cada espécime estariam corretamente relacionados, etiquetas pré anotadas com o ID e nome dos participantes foram geradas para rotular cada formulário e espécime.

Pastas foram usadas para arquivar as datas de complementação e das visitas clínicas para coleta de espécimes. Em adição, um arquivo do estudo foi mantido para cada paciente contendo todos os formulários, resultados do laboratório e outras informações pertinentes ao estudo. Todas as pastas de arquivos e registros foram colocadas em cabines exclusivas e em local seguro quando não usadas e acessíveis somente para equipe clínica.

Um sistema de dupla entrada foi usado para computar os instrumentos do estudo. Os formulários tiveram seu recebimento registrado em cadernos de correspondência e no livro de laboratório antes de terem seus dados transferidos para o computador. A verificação dos arquivos foi feita para erros lógicos e de extensão. Os dados dos arquivos foram corrigidos e enviados a Johns Hopkins University onde foi feita checagem mais elaborada de erros e correção adicional. O número de identificação (PID), dados coletados, volume de espécimes e localização

nos “freezers” foram gravados nos formulários do laboratório e no computador para todas as amostras. Os arquivos de computador desses formulários foram usados para criar listagem de espécimes e sua localização em cada caixa de estocagem.

Após dois anos completos do estudo, indivíduos excluídos do estudo tiveram as fichas com seus dados excluídos do banco de dados.

E - Monitoramento

Uma equipe da Johns Hopkins University monitorou regularmente o andamento do estudo. Visitas trimestrais com revisão de treinamento, procedimentos, consentimento, formulários, entrada de dados, administração de dados e documentação, foram feitas. Uma auditoria de todos os pacientes incluídos no estudo foi feita após a inclusão dos 25 primeiros pacientes. Posteriormente, 10% de amostras aleatórias de todos os pacientes incluídos a partir da data da primeira visita foram monitorados e assim sucessivamente a cada visita (ANEXO 6).

7.4 - Inclusões

Termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os indivíduos incluídos no estudo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (IRBs) da Johns Hopkins University School of Medicine e do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ). Todos os responsáveis chave pelo projeto foram treinados nos aspectos éticos da pesquisa clínica.

7.5 - Biosegurança

Precauções universais foram usadas para todo material proveniente dos pacientes de acordo com padrões brasileiros e internacionais.

7.6 - Administração

1- Johns Hopkins University:

- a- Recrutamento de pesquisadores e equipe para estudo.
- b- Desenvolvimento de protocolos de estudo e formulários em colaboração com Oxford Immunotec.
- c- Treinamento pelos responsáveis pelo estudo em protocolos requeridos e condução de visitas para monitoramento da concordância com os protocolos de estudo, qualidade dos dados e complementação dos registros.
- d- Análise de dados do estudo e produção de relatórios.
- e- Inclusão de revisão e aprovação de quadros éticos relevantes / IRBs.

2- Co-pesquisadores do Rio de Janeiro

- a- Recrutamento de responsáveis experientes para desenvolver os procedimentos do estudo.
- b- Auxílio no desenvolvimento dos protocolos do estudo, análise dos dados do estudo e desenvolvimento dos relatórios.
- c- Avaliação da concordância do número de inclusões de amostras necessárias até o fim da duração do estudo.
- d- Assegurar quadro ético local.

3- Oxford Immunotec

- a- Auxílio no desenvolvimento dos protocolos de estudo.
- b- Auxílio no treinamento dos responsáveis.
- c- Fornecimento de material para o teste T-SPOT. *TB*.
- d- Contagem dos “spots” usando leitor automático de placas.

7.7 - Informações sobre reagentes e preparo

Todos os reagentes usados foram fornecidos no kit (ANEXO 10 – figura 8a)

- 1 - Microplaca: uma placa de 96 poços no formato de tiras pronta para uso;
- 2 - Painel A de antígenos de *M. tuberculosis* pronto para uso;
- 3 - Painel B de antígenos de *M. tuberculosis* pronto para uso;
- 4 - Controle Positivo pronto para uso;
- 5 - O reagente conjugado era preparado apenas no momento do uso, na diluição de 1:200;
- 6 - Solução de substrato era guardada à temperatura ambiente e estava pronta para uso;
- 7 – A solução para congelamento das amostras, consistindo de mistura estéril de DMSO a 10% e soro fetal bovino, era aquecida à temperatura de 37°C no momento do uso.

7.8 – Coleta e processamento das amostras

A triagem dos pacientes foi feita no ambulatório de tuberculose pelas enfermeiras do estudo MOXI. Os pacientes responderam ao termo de consentimento livre e esclarecido e, quando aceitaram as condições de participação no estudo, receberam um número de identificação provisório (“screening number”) pelo qual eram identificados até receber o número de identificação definitivo (PID).

Número de identificação, data da coleta e quantidade de tubos coletados eram preenchidos no formulário a ser encaminhado junto com as amostras para o laboratório.

A – Período Zero - Linha de base (t=0)

Coleta de amostra

Na primeira visita, antes de iniciar o tratamento, e após aceitar a participação, foram coletados 3 tubos do tipo CPT (BD vacutainer CPT tubes - ANEXO 9, figura 5a) de 8mL cada de sangue periférico (ANEXO 5) que foram enviados ao Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa, no intervalo máximo de 8 horas após a coleta. A coleta foi feita pelas enfermeiras do estudo MOXI que preencheram a ficha de submissão (Ficha azul – ANEXO 2) que era encaminhada ao laboratório junto com as amostras dos pacientes. Ao chegar ao laboratório o responsável assinava o caderno de correspondência devidamente preenchido com os dados da coleta (número de identificação, hora da coleta e quantidade de tubos) e a ficha de submissão que veio junto com as amostras.

Isolamento de PBMCs

1 - Os tubos foram centrifugados a 1500 RCF por 30 minutos (de acordo com recomendações do fabricante). Enquanto isso, o meio para lavagem (AIMV) era colocado a 37°C e os demais reagentes para trabalho colocados à temperatura ambiente.

$$RPM = \sqrt{\frac{(RCF) \times (100.000)}{(1.12) \times (r)}}$$

2 - A nuvem (que contem os PBMCs) formada acima do gel foi retirada com pipeta de 1000µL e transferida para tubo do tipo falcon de 15mL (ANEXO 9, fig. 5a).

3 - Foram adicionados à amostra 5mL de AIMV e esta foi homogeneizada delicadamente com a pipeta de 1000µL (ANEXO 9, fig. 6a e 6b).

4 - O tubo foi centrifugado a 300 RCF por 7 minutos a 20°C.

5 - O sobrenadante formado após centrifugação foi desprezado vertendo-se cuidadosamente o tubo.

6 - O sedimento foi ressuspendido em 5mL de AIMV e centrifugado a 20°C por 7 minutos a 300 RCF (ANEXO 9, fig. 6c).

7 - O sobrenadante foi desprezado como descrito anteriormente

8 - Os sedimentos dos dois tubos foram suspensos em Solução de Congelamento (1mL), transferidos para tubos de congelamento de 2mL, colocados em uma caixa de congelamento gradual contendo álcool etílico, "Mr. Frosty", e levados para o "freezer" -80°C onde permaneceram por um período máximo de 30 dias após o qual foram transferidos para nitrogênio líquido no laboratório DIP 3º andar do HUCFF.

9 - O sedimento do terceiro tubo foi ressuspendido em 500µL de AIMV.

Contagem de células (ANEXO 10, figs.7a, b e c)

1 - Da suspensão de 500µL foram retirados 10µL aos quais foram acrescentados 40µL de Azul de Tripano.

2 - A contagem das células foi feita usando-se um hemocitômetro.

3 - O número de células por mL foi determinado pela fórmula:

de células x fator de diluição (5×10^4). Para cada poço da microplaca eram necessárias 2.5×10^5 células viáveis que foram obtidas pela fórmula: $2.5 \times 10^5 \times 0.5/\# \text{células/mL}$

Procedimento T-SPOT.TB TB assay

1 - Adição de 50µL de meio AIMV no poço destinado ao controle negativo

2 - Adição de 50µL de PA no segundo poço

3 - Adição de 50µL de PB no terceiro poço

- 4 - Adição de 50µL de Controle Positivo no poço destinado ao controle positivo
- 5 - Para cada reagente foram adicionados 100µL da suspensão corrigida para 2.5×10^5 células viáveis (ANEXO 10, fig.8A)
- 6 - A placa foi colocada na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 16-20 horas (ANEXO 10, fig.8b)
- 7 - A placa foi lavada 4 vezes com 100µL de PBS (usando uma pipeta multicanal) (ANEXO 11, fig.9a)
- 8 - Adição de 50 µL de conjugado em cada poço (ANEXO 11, fig.9)
- 9 – Incubação da placa a 4°C por uma hora.
- 10 – Lavagem da placa 4 vezes com 100µL de PBS (usando uma pipeta multicanal) (ANEXO 11, fig.9a)
- 11 - Adição de 50 µL de substrato em cada poço (ANEXO 11, fig.9c)
- 12 - Incubação da placa por 7 minutos à temperatura ambiente.
- 13 - Lavagem da placa em água e secagem à temperatura ambiente e no escuro (ANEXO 11, fig.9d)
- 14 - Os “spots” formados foram contados com ajuda de uma lupa (ANEXO 11, fig.10; ANEXO 12, FIGS. 1, 2 E 3)
- 15 - A placa foi guardada embrulhada em papel alumínio até ser encaminhada à Oxford Immunotec para contagem em contador automático.

Congelamento das amostras

- 1 - Após lavagem em meio AIMV, as células foram ressuspensas em 1mL de FM previamente aquecido à 37°C;
- 2 - A suspensão foi transferida para tubo de estocagem em nitrogênio líquido;
- 3 - Cada tubo foi colocado na ‘Mr. Frosty’;

4 - A caixa foi colocada no “freezer” -80°C no período de 24 horas;

5- Após 24 horas os tubos foram transferidos para uma caixa de congelamento da Nalgene e permaneceram no “freezer” -80 por um período máximo de 30 dias;

5 - Após 30 dias elas foram transferidas para o Nitrogênio líquido;

6 - Os dados de todos os tubos (posição na caixa e no container) foram anotados em uma planilha do laboratório e uma tabela de controle de temperatura para cada local de estoque foi rigorosamente mantida.

B - SEMANAS 16 E 24

Descongelamento das amostras

1 - Remoção dos tubos do N₂ líquido e transferência imediata para banho-maria a 37°C.

2 - Agitação dos tubos por aproximadamente um minuto (até que 90% das células estivessem descongeladas).

3 - Retirada com a P1000 do conteúdo e transferência para tubo de 50mL com 5mL de AIMV a 37°C e homogeneização delicada.

4 - Centrifugação por 7 minutos a 300 RCF a 20°C.

5 - O sobrenadante formado após centrifugação foi desprezado vertendo-se cuidadosamente o tubo.

6 - O sedimento foi ressuspenso em 5mL de AIMV e centrifugado a 20°C por 7 minutos a 300 RCF.

7 - O sobrenadante foi desprezado como descrito anteriormente

8 – O sedimento foi ressuspenso em 500µL de AIMV.

Contagem de células

1 - Da suspensão de 500 μL foram retirados 10 μL aos quais foram acrescentados 40 μL de Azul de Tripano.

2 – A contagem das células foi feita usando um hemocitômetro.

3 - O número de células por mL foi determinado pela fórmula:

de células x fator de diluição de 5×10^4 . Para cada poço da microplaca foram necessárias 2.5×10^5 células viáveis que foram calculadas pela fórmula: $2.5 \times 10^5 \times 0.5/\# \text{células/mL}$.

Ensaio T-SPOT.TB TB

→Nessa etapa, um tubo de cada um dos três tempos de amostra de um mesmo paciente, foi ensaiado numa mesma placa para evitar diferenças nas condições de trabalho. Conseqüentemente, as amostras congeladas só foram ensaiadas após finalização de tratamento do paciente quando as amostras dos três tempos já estavam congeladas.

1 – Adição de 50 μL de meio AIMV no poço destinado ao controle negativo.

2 - Adição de 50 μL de PA no segundo poço.

3 - Adição de 50 μL de PB no terceiro poço.

4 - Adição de 50 μL de Controle Positivo no poço destinado ao controle positivo.

5 - Para cada reagente foram adicionados 100 μL da suspensão corrigida para 2.5×10^5 células viáveis.

6 - A placa foi para estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 16-20 horas.

7 - A placa foi lavada quatro vezes com 100 μL de PBS (usando uma pipeta multicanal).

8 - Adição de 50 μL de conjugado em cada poço.

9 - A placa foi incubada a 4°C por uma hora.

- 10 - A placa foi lavada 4 vezes com 100µL de PBS (usando uma pipeta multicanal)
- 11 - Adição de 50 µL de substrato em cada poço.
- 12 – A placa foi incubada por 7 minutos à temperatura ambiente.
- 13 - Lavagem em água e secagem à temperatura ambiente e no escuro.
- 14 - Os “spots” formados foram contados com ajuda de uma lupa.
- 15 - A placa foi guardada embrulhada em papel alumínio até ser encaminhada à Oxford Immunotec para contagem em contador automático.

7.9 – Interpretação dos resultados

O teste foi considerado reativo se um ou ambos os painéis A e/ou B respondesse de acordo com os critérios abaixo:

- Controle negativo com 0-5 “spots”, uma amostra foi considerada reativa se: (# de “spots” contados no painel) - (# de “spots” contados no controle negativo) ≥ 6
- Controle negativo com número de “spots” ≥ 6 , uma amostra foi considerada reativa se: (# de “spots” contados no painel) $\geq 2x$ (# de “spots” contados no controle negativo)

Os resultados foram anotados no formulário (ANEXO 2) com as iniciais do técnico responsável pelo procedimento.

7.10 – Análise estatística

Para determinar se houve ou não mudança na contagem dos “spots” durante o intervalo de tratamento contra tuberculose, os resultados do ELISPOT dos períodos 0, 16^a semana e 24^a semana foram compilados. Para comparar a contagem entre aqueles indivíduos com cultura de escarro positiva e negativa após

8 semanas de tratamento, e para comparar a contagem entre aqueles com doença cavitária ou não, foi feita uma análise de dados longitudinal. Para padronizar a dependência resultante de medidas repetidas, e determinar que a contagem de SFCs representasse dados de contagem dispersos, os dados foram analisados usando um modelo marginal com aproximação binominal negativa com métodos de equação de estimativa generalizada (GEE). Foi escolhida estrutura de correlação independente com rigoroso padrão de erros para o modelo GEE, assim como comparações estatísticas quantitativas de ajustes que mostrou que a estrutura de correlação escolhida promoveu o melhor ajuste. Um modelo de regressão binominal negativa foi utilizado para analisar diferenças na contagem entre os grupos com 24 semanas de tratamento. Para avaliar a diferença no declínio da contagem de “spots” no decorrer do tempo, nos diferentes grupos, o teste “Wilcoxon rank-sum” foi utilizado. Análise estatística foi feita usando o software estatístico STATA (StataCorp, College Station, Texas).

Para comparação entre leitura automatizada e leitura visual com ajuda de uma lupa, foi realizado o Teste T de Student.

8 – RESULTADOS

Durante o período do estudo, 73 indivíduos foram incluídos. Dos 73, 15 foram excluídos da análise porque 11 não tiveram amostra do tempo zero (linha de base) ensaiadas e 4 tiveram somente amostras do tempo zero ensaiadas. Os 58 pacientes restantes que tiveram pelo menos 2 períodos ensaiados, incluindo obrigatoriamente o período T0, foram incluídos na análise. A tabela 1 mostra as características da população do estudo.

TABELA 1. Características demográficas e clínico-radiológicas dos pacientes incluídos no estudo

Características	Total (n=58)
Média de idade (SD)	33,4 (10,8)
Homens (%)	36 (62,1)
Peso em Kg no tempo zero (SD)	55,7 (9,1)
Doença cavitária [†] (%)	41 (70,7)
Diabetes mellitus (%)	10 (17,2)
Recebendo terapia HRZM (%)	31 (54,4)
HIV-positivo (%)	1 (1,7)**

Os resultados são apresentados como média da idade e peso em anos e seu respectivo desvio padrão. As variáveis categóricas são apresentadas como frequência (número de pacientes e respectivos percentuais).

*Doença cavitária no raio-x do tempo zero. **CD4=426 células/mL. SD, desvio padrão. HRZM, tratamento com isoniazida+rifampicina+pirazinamida+moxifloxacino

8.1 – Sensibilidade do Teste em pacientes com cultura confirmada para TB

A sensibilidade do teste *T-SPOT.TB*, medida pela reatividade no tempo zero de amostras antes do congelamento foi de 88,3% (95% CI 77-100%) enquanto que para amostras do mesmo tempo, congeladas, foi de 72,4% (95% CI 59-83%). A

tabela 2 (página 60) mostra o resultado qualitativo do teste T-SPOT.*TB* frente aos diferentes antígenos no tempo zero.

8.2 – Sensibilidade do teste entre os pacientes com co-infecção com HIV

Somente um indivíduo era HIV infectado e apresentava contagem de CD4 de 426 cels/mm³, portanto ainda com razoável manutenção da funcionalidade da resposta imunológica. Este paciente foi mantido entre os pacientes estudados. A medida da contagem de SFCs para ESAT-6 e CFP-10 deste paciente foi 14 e 99 no tempo 0; 4 e 77 na semana 16 e 8 e 63 na semana 24, resultando em um teste qualitativamente reativo em todos os tempos.

8.3 – Frequência de células T RD1 específicas em pacientes com falência de tratamento.

Não houve indivíduos com falência de tratamento e não se pode avaliar o comportamento do teste neste importante cenário clínico.

8.4 - Frequência de células T RD1 específicas em pacientes com recidiva e sem recidiva.

Até o momento desta análise, um ano após encerramento do tratamento, não há informação de procura espontânea do paciente referindo sintomatologia com confirmação clínico - laboratorial de recidiva de TB. Este aspecto será revisto meticulosamente, por busca ativa, ainda este ano.

8.5 – Contagem de SFC entre pacientes que tiveram cultura positiva “versus” negativa na oitava semana de tratamento

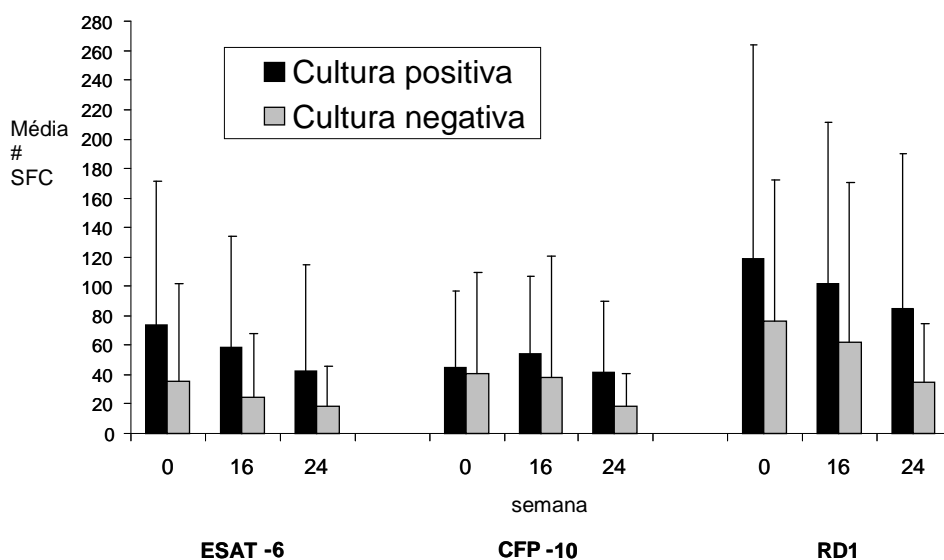
A contagem de “spots” entre indivíduos que mantiveram resultado positivo para cultura após 8 semanas de tratamento e indivíduos que tiveram resultado negativo para cultura após 8 semanas de tratamento foi comparada. Quarenta e oito (82,8%) dos 58 indivíduos tiveram resultado negativo para cultura após as 8 semanas de tratamento e 10 (17,2%) dos 58 mantiveram resultado positivo para cultura mesmo após 8 semanas de tratamento. A média da contagem de “spots” está representada na figura B (página 59). Comparado com indivíduos com resultado negativo para cultura, os indivíduos cultura positiva tiveram média alta de contagem de “spots” em todos os 3 tempos para ambos ESAT-6 e CFP-10. Combinando os três tempos, a média de contagem para ESAT-6 foi na proporção de 32,6 “spots” a mais para o grupo com cultura positiva comparado com grupo com cultura negativa (95% CI-7,4 para 66,2). A média de contagem para CFP-10 foi na proporção de 16,6 “spots” a mais para o grupo com cultura positiva comparado com o grupo com cultura negativa, mas esta diferença não teve significância estatística (95% CI-3,43 para 37,1). A média de contagem para RD1 foi à proporção de 49,2 “spots” a mais para o grupo com cultura positiva comparado com o grupo com cultura negativa (95% CI-10,6 para 97,3). Ao completar 24 semanas de terapia, o grupo com cultura positiva teve contagem para ESAT-6, CFP-10 e RD1 de 24,0 (95% CI-8,11 para 81,6), 25,3 (95% CI-0,43 para 58,0) e 49,2 (95% CI-1,95 para 133,6) “spots” a mais que no grupo com cultura negativa, mas esta diferença não teve significância estatística.

A média de declínio de contagem para o antígeno ESAT-6 após 24 semanas de tratamento foi 33,1 no grupo com cultura positiva após 8 semanas de tratamento

e 19,8 no grupo com cultura negativa ($p=0,37$). A média de declínio de contagem para o antígeno CFP-10 após 24 semanas de tratamento foi 3,9 no grupo com cultura positiva após 8 semanas de tratamento e 10,1 no grupo com cultura negativa ($p=0,65$). A média de declínio de contagem para os antígenos de RD1 após 24 semanas de tratamento foi 37,0 no grupo com cultura positiva após oito semanas de tratamento e 29,8 no grupo com cultura negativa ($p=0,82$) (Figura A, página 58).

Usando resultados qualitativos (tabela 2), comparado com indivíduos com cultura negativa, a porcentagem de resultados classificados como reativos nos tempos 0, 16 e 24 dos indivíduos com cultura positiva foi levemente maior, mas estes dados não tiveram significância estatística. Como mostrado na figura C (página 61) o perfil de resposta aos antígenos RD1 demonstrou variabilidade interna e entre os indivíduos.

Figura A. Média da contagem de “spots” em resposta aos diferentes Ags.

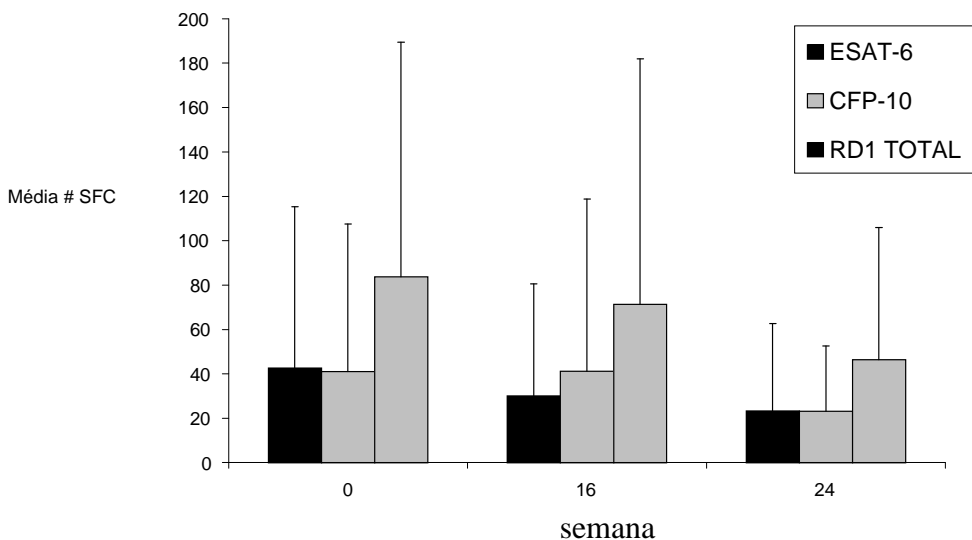


Média da contagem de “spots” par antígenos ESAT-6, CFP-10 e RD1 nos períodos 0 (linha de base), 16 e 24 para indivíduos com cultura positiva para *M. tuberculosis* ao completar 8 semanas de tratamento contra TB (barras escuras, $n=10$) e para indivíduos com cultura negativa após mesmo período de tratamento (barras claras, $n=48$).

8.6 - Contagem de SFC durante o tratamento contra TB

Como mostrado na figura B (página 59), a média da contagem de SFC declinou após 24 semanas para ESAT-6, CFP-10 e RD1 (ESAT-6 + CFP-10). Para ESAT-6 e CFP-10, a média da contagem de SFC foi similar nos tempos 0 (42,7 “versus” 41,2, respectivamente) e 24ª semana (23,3 “versus” 23,2, respectivamente, $p=0,43$). Entretanto, na 16ª semana de tratamento, a média da contagem de SFC foi levemente menor para ESAT-6 que para CFP-10 (30,31 “versus” 41,3, respectivamente), refletindo um atraso temporário no declínio da média da contagem de CFP-10. A média (SD) de declínio de SFC após 24 semanas de tratamento foi 22,2 (62,9) para ESAT-6, 8,9 (41,2) para CFP-10 e 31,2 (90,4) para RD1 (SFC de ESAT-6 e CFP-10).

Figura B. Média da contagem de “spots” nos diferentes tempos estudados



Média da contagem de “spots” para antígenos ESAT-6, CFP-10, RD1 (CFP e ESAT) nos períodos 0 (linha de base), 16ª semana e 24ª semana para todos os indivíduos incluídos ($n=58$).

A tabela 2 (página 60) mostra o percentual de indivíduos incluídos no estudo que tiveram resultado reativo para ESAT-6, CFP-10 e RD1 nos três tempos de coleta

durante o tratamento (semana 0, 16 e 24). Usando resultados qualitativos, não houve inclinação significativa no decorrer do tempo e não houve diferenças entre porcentagem de indivíduos positivos para ESAT-6 “versus” CFP-10 em nenhum dos tempos. De 42 indivíduos que tiveram amostras do tempo zero reativas no teste, 40 foram retestados no tempo 24; destes, 4 (10%) tiveram resultado não reativo no teste T-SPOT.TB na semana 24.

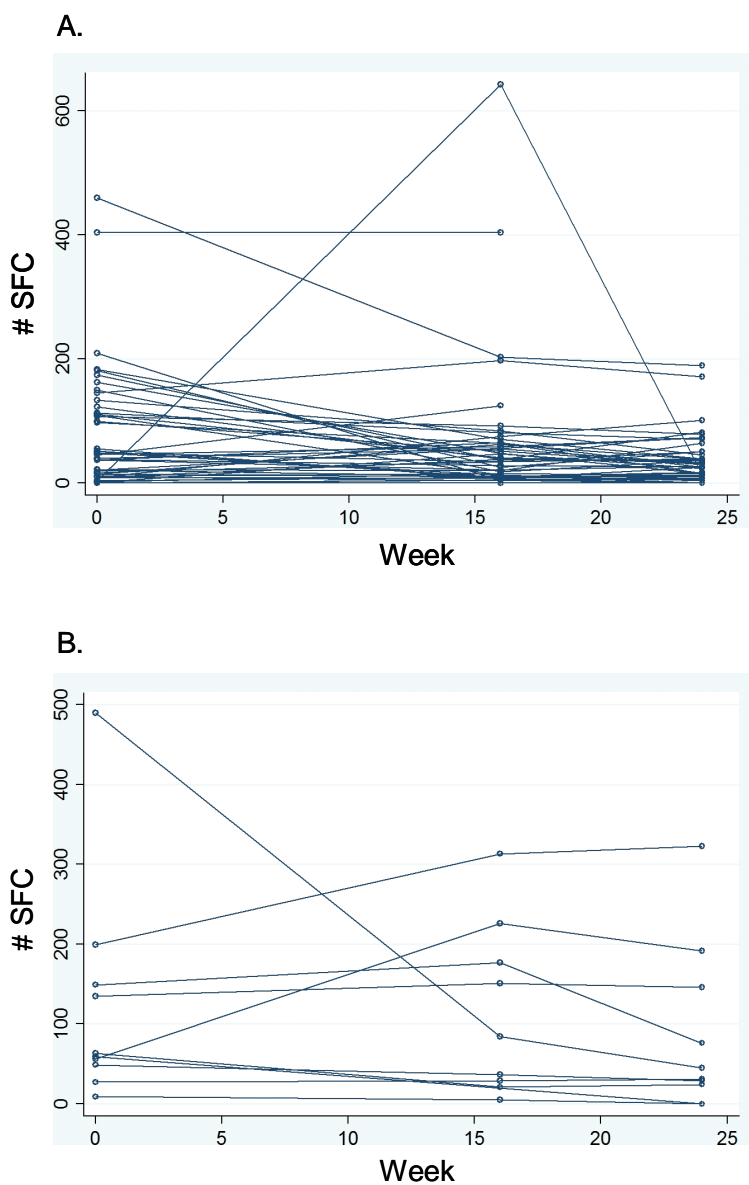
Tabela 2. Resultado qualitativo do teste T-SPOT.TB.

		Tempo 0	16 ^a semana	24 ^a semana
ESAT-6	Todos incluídos	56,9	58,9	53,7
	Cultura positiva	60,0	77,8	60,0
	Cultura negativa	56,3	55,3	52,3
CFP-10	Todos incluídos	55,2	58,9	59,3
	Cultura positiva	60,0	77,8	60,0
	Cultura negativa	54,2	55,3	59,1
RD1	Todos incluídos	72,4	78,6	75,9
	Cultura positiva	70,0	88,9	70,0
	Cultura negativa	72,9	76,6	77,3

Resultado qualitativo do teste T-SPOT.TB: % de indivíduos que tiveram teste reativo, dividido de acordo com antígeno estimulatório e por resultado de cultura após completar 8 semanas de tratamento.

A figura C mostra a alta variabilidade entre os pacientes nos resultados quantitativos, assim como a falta de reversão para negativo dos resultados qualitativos de pacientes ao fim do tratamento, o que talvez limite a utilidade do teste como um marcador alternativo de resposta ao tratamento.

Figura C - Perfil da resposta celular individual pela formação de “spots” para RD1 após 24 semanas de tratamento para TB



Perfil da resposta celular individual pela formação de “spots” para RD1 após 24 semanas de tratamento para TB para indivíduos com cultura negativa para *M. tuberculosis* ao completar 8 semanas de tratamento (PAINEL A, n=48) e para indivíduos com cultura positiva ao completar 8 semanas de tratamento (PAINEL B, n=10).

SFC, spot forming cells (células formadoras de “spots”)

8.7 - Associação entre contagem de SFCs e gravidade clínico-radiológica da TB no tempo zero, antes do início do tratamento.

Para determinar se a contagem de SFCs era ou não mais alta em TB grave, foi avaliada a associação entre a contagem de SFCs e dois marcadores de gravidade da doença no tempo zero – doença cavitária pulmonar e índice de massa corporal (BMI) baixo. Para ESAT-6, a contagem de SFCs daqueles com doença foi, em média, 2,08 vezes maior que a contagem de SFCs daqueles sem doença cavitária (95% CI para IRR 1,06-4,10, $p=0,034$). Para CFP-10, a contagem de SFCs não diferiu entre os dois grupos ($p=0,64$). Não houve associação entre índice de massa corporal no tempo zero e contagem de ESAT-6 ou CFP-10 ($p=0,48$ e $0,48$ respectivamente).

8.8 – Comparação entre 2 modalidades de leitura dos “spots”.

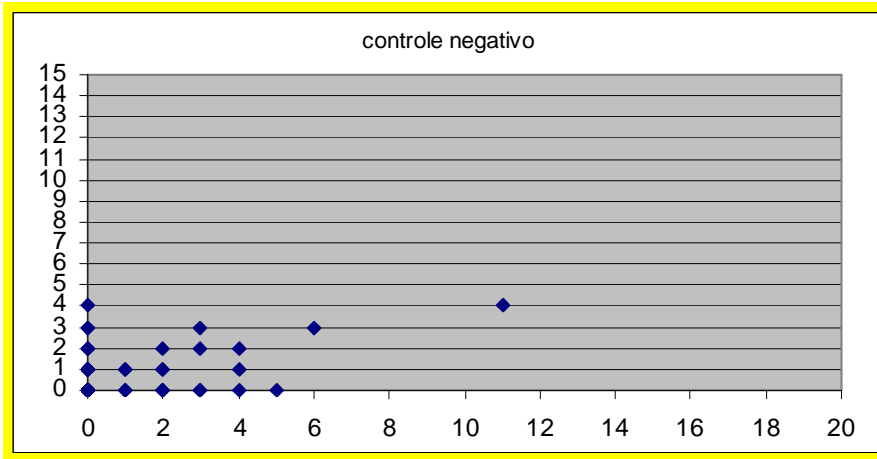
Foi realizada comparação entre 2 modalidades de leitura dos “spots”. Leitura realizada por técnico treinado utilizando lente de aumento (4X) com confirmação por microscopia e leitura automatizada através de um sistema de leitura de densidade ótica e software de registro e análise de dados de imagem.

Os resultados, figuras D.1, D.2, D.3 e D.4, demonstram que para o controle negativo, não houve diferença entre a contagem visual dos “spots” (com ajuda de uma lupa) e automática .

Para os painéis de antígenos A e B, assim como para o controle positivo a contagem do número de “spots” por leitura visual foi maior que a contagem automática.

Esses resultados sugerem que o leitor automático identifique “spots” muito próximos como único, não os diferenciando ao medir a densidade ótica.

Figura D.1- Comparação entre leitura visual (eixo x) e leitura automática (eixo Y) dos “spots” dos controles negativos

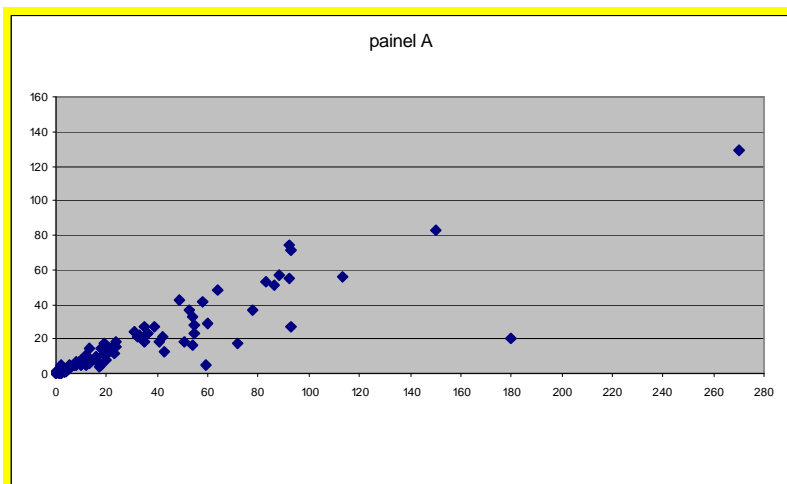


O processo automático não demonstra diferença em média do leitor

Leitor = 457,59

Automático = 451,35

Figura D.2- Comparação entre leitura visual (eixo x) e leitura automática (eixo Y) dos “spots” nos poços com painel A de Antígenos

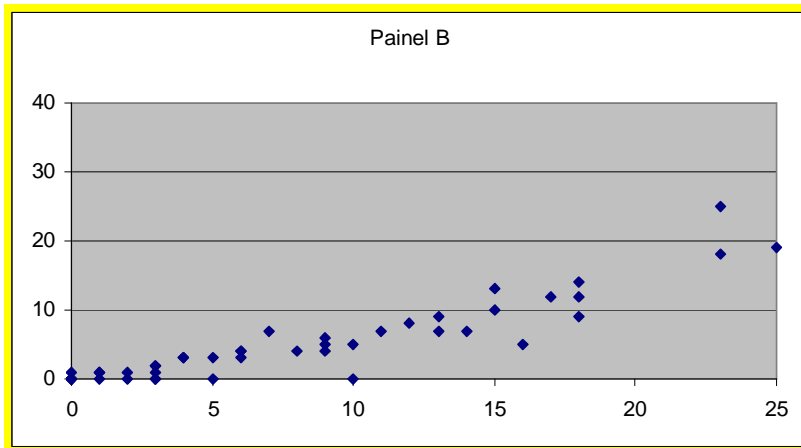


A média do leitor é significativamente maior que a automática.

Leitor = 255,72

Automático = 148,67

Figura D.3- Comparação entre leitura visual (eixo x) e leitura automática (eixo Y) dos “spots” nos poços com painel B de Antígenos

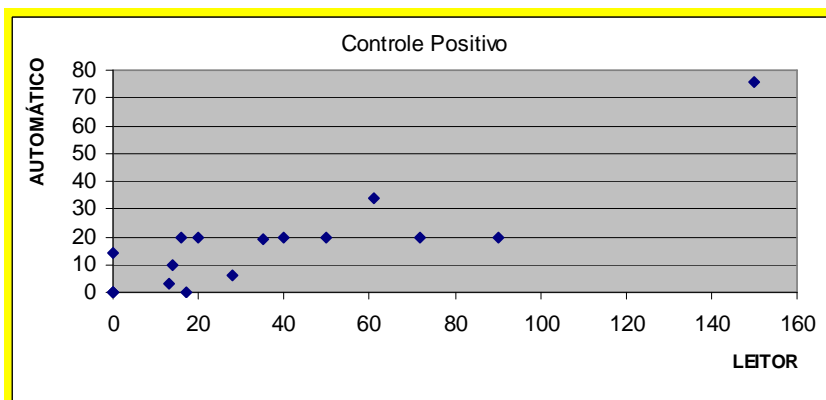


A média do leitor é significativamente maior que a automática.

Leitor = 261,11

Automático = 124,00

Figura D.4- Comparação entre leitura visual (eixo x) e leitura automática (eixo Y) dos “spots” nos controles positivos



A média do leitor é significativamente maior que a automática.

Leitor = 111,60

Automático = 35,94

* Para esta análise, foram excluídos os poços considerados incontáveis (>1000)

9 – DISCUSSÃO

O presente estudo gerou informações sobre alterações na proporção de células T produtoras de IFN- γ em resposta a antígenos específicos da região de diferenciação 1 (RD1) de MTB no decurso do tratamento anti-TB. O tratamento foi monitorado pelo esquema de administração DOT.

Existe grande controvérsia sobre a natureza exata da resposta imunológica ao MTB e sua correlação com o controle da multiplicação bacteriana pelo hospedeiro humano. Pressupõe-se que a TB ativa ocorra por imunossupressão e que o tratamento da TB pode levar a uma melhora na função imune e um aumento na produção de células T (Hirsch *et al.*, 1999). Os dados deste estudo apóiam uma hipótese alternativa de que o tratamento leva a uma diminuição da carga bacilar e, em função disso, ocorre diminuição da frequência de células T antígeno-específicas. Com relação a este ponto, o estudo é consistente com os dados dos estudos de Pathan *et al.*, Ewer *et al.* e Chee *et al.* (Pathan *et al.*, 2001; Ewer, 2006; Chee *et al.*, 2007). Pathan e colaboradores, especificamente, usaram o ensaio ELISPOT RD1 para avaliar a cinética da resposta de células T em pacientes submetidos a tratamento. Os autores observaram um declínio na proporção de 38% na contagem de “spots” após um período médio de 18,6 semanas. Ewer e colaboradores usaram o teste para avaliar a resposta em indivíduos presumivelmente recentemente infectados por MTB em uma determinada escola associada à explosão de TB. Os autores descobriram que estudantes TST positivos tratados por três meses com Isoniazida e Rifampicina tiveram uma redução anual de 68% na frequência de células T RD1 específicas, mas não foi observada mudança na frequência dessas células em indivíduos não tratados. Chee e colaboradores, recentemente demonstraram que entre indivíduos submetidos ao tratamento para LTBI ocorreu

efeito significativo na resposta ao CFP-10, mas não para ESAT-6 como medido pelo ensaio T-SPOT.TB.

Nossos resultados indicam que, a média na contagem de “spots” em resposta a ESAT-6 e CFP-10 declinou com a progressão do tratamento, entretanto o declínio foi menor para ESAT-6 que para CFP-10. Estes achados, apoiados pelos de Pathan, Ewer *et al.* e Chee *et al.*, são consistentes com papel de células T RD1 específicas na contenção de MTB. Ficou claro que o perfil de resposta individual foi discrepante, indicando que o teste teria utilidade limitada na avaliação da resposta individual ao tratamento anti-TB.

A média da contagem de “spots” para ESAT-6, CFP-10 isoladamente e em conjunto foi maior no grupo com cultura positiva após 8 semanas de tratamento em comparação ao grupo com cultura negativa na oitava semana de tratamento. Para ESAT-6, as diferenças foram aparentemente comparáveis no tempo zero. Esses resultados são consistentes com a hipótese de que a contagem de “spots” reflita diretamente a carga bacilar e aumenta a possibilidade de que resultados quantitativos e/ou mudanças no resultado quantitativo possam ser usados como marcador preditivo do progresso de infecção latente para TB ativa. Em relação a este ponto, Richeldi *et al.*, relatou que o resultado do ELISPOT em recém nascidos expostos a MTB tornou-se positivo após 6 meses e que, aproximadamente, dobrou após 24 meses quando a criança desenvolveu sinais e sintomas sugestivos de tuberculose (Richeldi *et al.*, 2007). Quando foi considerada na análise a variável forma TB cavitária “versus” TB não cavitária, houve uma associação entre a contagem de ESAT-6 e presença de cavitação pulmonar. Para CFP-10 não houve diferença entre os dois grupos. É interessante lembrar que as formas cavitárias são consideradas formas de apresentação da doença com alta carga bacilar. Quanto ao

índice de massa corporal, não houve associação com a contagem de ESAT-6 ou CFP-10.

Resultados de estudos "in vivo" com modelo bovino de TB, indicam que a mudança na produção de IFN- γ ESAT-6 específica em resposta a *M. bovis* é preditivo de doença clinicamente grave (Voldermeier, 2002).

Resultados do nosso estudo mostraram que 10% dos indivíduos com teste T-SPOT.TB reativo no tempo zero, tiveram teste não reativo após 24 semanas. Esta mudança indica que após sucesso do tratamento a contagem de SFC retornou a zero após 24 semanas. Nestes casos, o teste talvez possa ter utilidade em prever falência no tratamento ou identificar reincidência da doença. Não houve indivíduos com falência de tratamento e não se pode avaliar o comportamento do teste neste importante cenário clínico. Até o momento, não foram relatados episódios de recidiva. Busca ativa dos dados destes pacientes precisa ser feita para realmente comprovar a ausência de recidiva.

Os dados deste estudo possuem grande relevância uma vez que, o estudo foi feito em local em que o processo de tratamento da TB (DOT- observação direta), monitoramento do escarro e o acompanhamento dos pacientes foi padronizado e rigoroso. O responsável pelo ensaio do teste T-SPOT.TB não teve informações sobre o status dos pacientes, reduzindo potenciais vieses e, finalmente, cada amostra de cada indivíduo incluído no estudo foi testada e retestada posteriormente, simultaneamente, em uma mesma placa, nas mesmas condições experimentais, para reduzir o impacto de diferenças desconhecidas que possam ocorrer durante o procedimento.

Por outro lado, o estudo tem algumas limitações. O processo de descongelamento talvez possa ter diminuído a viabilidade celular. Isto pode

contribuir para a leve queda na sensibilidade quando comparados resultados de amostras do tempo zero testadas antes e após o congelamento. Nós não podemos excluir a possibilidade de que as amostras congeladas por um período maior antes do teste (amostras do tempo zero) possam ter sido mais afetadas pela estocagem e deram resultados falsamente baixos; isto pode ter diminuído a capacidade do teste para detectar um declínio na resposta do ensaio durante o tratamento. Entretanto, algum impacto do processo de congelamento na reatividade celular foi uniformizado pelo congelamento de todos os tempos de coleta, mantendo a mesma condição para cada ponto do tempo de coleta. Desta forma, não houve impacto no resultado das mudanças de contagem dos “spots”. Em segundo lugar, o resultado do teste foi comparado com um marcador alternativo que é a cultura de escarro na oitava semana e não com um padrão ouro aceito de permanente cura da TB sem reincidência (critério clínico e bacteriológico, sem recidiva por pelo menos dois anos de ‘follow-up’). Assim foi feito levando-se em conta a conveniência operacional. A contagem dos “spots” mostrou-se maior quando feita através da contagem por leitura visual do que quando feita por leitor automático. Como a leitura automática é feita por medida da densidade ótica, a leitura de vários “spots” muito próximos pode gerar um único valor.

Enquanto durante todo o tempo a contagem de SFCs declinou ao longo do curso do tratamento, o perfil de resposta individual dos pacientes (acompanhamento da contagem de SFC nos três tempos) foi altamente variável em nosso estudo indicando que a utilidade do teste na avaliação ou predição da resposta ao tratamento em pacientes, individualmente mostra-se pobre.

A inclusão de apenas um paciente HIV positivo, impediu a análise da eficiência do teste para esse tipo de co-infecção. Novos estudos, em diferentes

contextos e diferentes grupos de pacientes, como HIV positivos e crianças, são necessários, para definir a utilidade dos ensaios baseados na produção de interferon-gama para rotina clínica e como um marcador alternativo da resposta ao tratamento anti-TB.

10 – CONCLUSÃO

Com o tratamento, células T específicas secretoras de IFN- γ diminuíram com o passar do tempo. Pacientes com cultura positiva na oitava semana de tratamento tiveram contagem maior de “spots” em resposta a ESAT-6 e RD1 em comparação com os pacientes com cultura negativa na oitava semana, o que estaria refletindo a carga bacilar e daria suporte à hipótese de que essa mudança pode ser usada para prever progressão de infecção latente para tuberculose ativa. Após 24 semanas de tratamento com terapia diretamente observada (DOT) pacientes com cultura positiva e pacientes com cultura negativa na oitava semana não tiveram diferenças estatisticamente significativas na contagem de “spots”. Dez por cento dos pacientes reativos no tempo zero foram não reativos ao fim do tratamento. Além disso, houve correlação entre contagem de “spots” maior para ESAT-6 e cavitação por raio-x no tempo zero que é considerada forma de apresentação da doença com alta carga bacilar.

Houve diferenças importantes no perfil de resposta individual aos antígenos indicando que o teste talvez tenha utilidade limitada na avaliação da resposta individual ao tratamento.

Estudos adicionais de longa duração com grupos específicos de pacientes e manutenção de contato são necessários para determinar a utilidade do T-SPOT.*TB* como teste para monitoramento da resposta individual ao tratamento e como um marcador alternativo da eficácia do tratamento em estudos de avaliação do tratamento contra TB.

11 – PERSPECTIVAS

1. Busca ativa de dados dos pacientes incluídos no estudo para saber se houve procura espontânea do paciente referindo sintomatologia com confirmação clínica - laboratorial de recidiva de TB;
2. Analisar o desempenho do teste em grupos específicos de pacientes e diferentes contextos clínicos, como co-infecção por HIV e crianças. Neste contexto, um estudo já foi iniciado pelo grupo em colaboração com o IPPMG, para avaliação do kit em crianças submetidas à imunossupressão;
3. Analisar dados estatísticos da contagem por leitura visual e automática dos “spots”.

11 - REFERÊNCIAS

Andersen P, Munk M E, Pollock J M, Doherty T M. **Specific immune-based diagnosis of tuberculosis.** Lancet 2000; 356: 1099-1104

Adetifa IM, Lugos MD, Hammond A, Jeffries D, Donkor S, Adegbola RA, Hill PC. **Comparison of two interferon gamma release assays in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease in The Gambia.** BMC Infectious Disease 2007, 7:122 doi:10.1186/1471-2334-7-122.

American Thoracic Society. **Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children.** Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1376-1395.

Bandera A, Gori L, Catozzi A D, Marchetti G, Molteni C, Ferrario G, Codecasa L, Penati V, Matteelli A, Franzetti. **Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis.** J Clin Microbiol 2001; 39: 2213-2218.

Barners PF. **Diagnosing latent tuberculosis infection: turning glitter to gold.** Am J Respir Crit care Med 2004; 170: 5-6.

Beamer G L, Flaherty D K, Vesosky B, Turner J. **Peripheral blood gamma interferon release assay predict lung responses and *Mycobacterium tuberculosis* disease outcome in mice.** Clinical and Vaccine Immunology 2008, 474-483

Burman W J, Cohn D L, Rietmeijer C A, Judson F N, Sbarbaro J A, Reves R R. **Noncompliance with directly observed therapy for tuberculosis.** Epidemiology and effect on the outcome of treatment. Chest 1997; 111(5):1168-1173.

Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N, Amicosante M, Girardi E, Goletti D. **Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy.** Clin Infect Dis 2004; 38: 754-756.

Chan ED, Heifets L, Iseman M D. **Imunologic diagnosis of tuberculosis: a review.** Tuberc Lung Dis 2000; 80, 131-140.

Chee C B E, KhinMar K W, Gan S H, Barkham T M S, Pushparani, Wang Y T. **Latent tuberculosis infection treatment and T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens.** Am J Respir Crit Care Med 2007; 175:282-287.

Churchyard G J, Corbett E L, Kleinschmidt I, Mulder D, deCock K M. **Drug resistant tuberculosis in South African gold miners: incidence and associated factors.** Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4(5):433-440.

Cohn D L, Catlin B J, Peterson K L, Judson F N, Sbarbaro J A. **A 62-dose, 6-month therapy for pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: A twice-weekly, directly observed, and cost-effective regimen.** Ann Intern Med 1990; 112:407-415

Chapman A. L. N., Munkanta M, Katalin A. Wilkinson, Pathan A A, Ewer K, Ayles H, Reece W H, Mwinga A, Godfrey-Faussett P, Lalvani A. **Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells.** AIDS 2002; 16 (17): 2285-2293.

Connell TG, Ritz N, Paxton GA, Buttery JP, Curtis N, Ranganathan SC. **A three-way comparison of tuberculin skin testing QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children.** PLoS ONE 2008, 3(7):e2624. doi:10.1371/journal.pone.0002624.

Daniel T M, Debanne S M. **The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay.** Am Rev Respir Dis 1987; 135: 1137-1151.

Davies P D O, Pai M. **The diagnosis and misdiagnosis of tuberculosis.** Int J Tuberc Lung Dis 2008; 12(11):1226-1234.

Dombeck M, Duch D, Dennett S, Bell L. **Evaluating the implications of long-term safety and efficacy on the use of fluoroquinolones in the treatment of pulmonary tuberculosis.** RTI Health Solutions, Research Triangle Park, N C, USA, April 17, 2001.

Dockrell H M, Weir R E. **Whole blood cytokine assays-a new generation of diagnostic tests for tuberculosis?** Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2: 441-442.

Dominguez J, Souza-Galvão M, Ruiz-Manzano J, Iatorre I, Prat C, Iacoma A, Milà C, Jiménez M A, Blanco S, Maldonado J, Altet N, Ausina V. **T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active tuberculosis patients at the beginning, during, and after antituberculosis treatment.** Diag Microb And Infec Disease 2008. Doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.09.010.

Dosanji DP, Hinks TS, Innes JA, Deeks JJ, Pasvol G, Hackforth S, Varia H, Millington KA, Gunatheesan R, Guyot-Revol V, Lalvani A. **Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis.** *Ann Intern Med* 2008. 148:325-336.

Ducati R G, Ruffino-Neto A, Basso L A, Santos D S. **The resumption of consumption – A review on tuberculosis.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(7): 697-714.

Ewer K, Deeks j, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, Monk P, Lalvani A. **Comparasion of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak.** *Lancet* 2003; 361:1168-1173.

Ewer K, Millington K A, Deeks J J, Alvarez L, Bryant G, Lalvani A. **Dynamic Antigen-specific T-cell responses after point-source exposure to *Mycobacterium tuberculosis*.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:831-839.

Fine P E M, Small P M. **Exogenous reinfection in Tuberculosis.** *N Engl J Med* 1999; 341: 1226-1227.

Goletti D, Stefania C, Butera O, Amicosante M, Ernst M, Sauzullo I, Vullo V, Cirillo D, borroni E, markova R, drenska R, Dominguez J. **Accuracy of immunodiagnostic tests for active tuberculosis using single and combined results: a multicenter TBNET-study.** *PLoS ONE* 2008; 3(10):e 3417
doi:10.1371/journal.pone.0003417.

Gong JH, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y, Barnes PF. **Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th 1 responses and CTLA-4 expression.** *Infect Immun* 1996; 64: 913-918.

Haas D W, Dez Pres R M. *Mycobacterium tuberculosis*. Mandell, G.L., Benett, J.E. & Dolin (orgs). **Principles and pratice of infections disease.** 4nd ed. Nova York: Churchill Livingstone. 1995; P2213-2243.

Hill PC, Brookes RH, Fox A, Jackson-Sillah D, Jeffries DJ, Lugos MD, Donkor SA, Adetifa IM, de Jong BC, Aiken AM, Adegbola RA, McAdam KP. **Longitudinal Assessment of an ELISPOT test for *Mycobacterium tuberculosis* infection.** *PLoS Med*4(6):e192. doi:10.137/journal.pmed.0040192.

Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, Wallis RS, Edmonds K, Okwera A, Mugerwa R, Peters P, Ellner JJ. **Depressed T-cell**

interferon- γ responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. J Infect Dis 1999; 180 (6):2069-2073.

Houghton R, Lodes M J, Dillon D C, Reynolds L D, Day C H, McNeill P D, Hendrickson R C, Skeiki Y A, Sampaio D P, Badaro R, Lyashchenko K P, Reed S G. **Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis.** Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 883-891.

Horwitz M A, Lee B W, Dillon B J, Harth G. **Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; Feb 28;92(5):1530-1534.

Huebener R F, Schein M F, Bass J B. **The tuberculin skin test.** Clin Infect Dis 1993; 17: 968-975.

Jacobsen M, Reipsilber D, Gutschmidt A, Neher A, Feldmann K, Mollenkopf H J, Ziegler A, Kaufmann S H E. **Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*.** J Mol Med 2007; 85:613-621.

Janeway & Travers, Immunobiology 2nd Ed, 1996.

Jasmer R M, Nahid P, Hopewell P C. Clinical Practice. **Latent tuberculosis infection.** N Engl J Med 2002; 347: 1860-1866

Kameswaran M, Shetty K, Ray M K, Jaleel M A, Kadival G V. **Evaluation of an in-house developed radioassay kit for antibody detection in cases of pulmonary tuberculosis and tuberculosis meningitis.** Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 987-993.

Kang U A, Lee H W, Yoon H I, Cho B, Han S K, Shin Y, Yim J. **Discrepancy between the Tuberculin skin test and Whole-blood Interferon γ assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country.** JAMA 2005. 293:2756-2761.

Kaufmann S H E. **Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis.** Nature Reviews/immunology 2006; 6: 699-704.

Kennedy N, Berger L, Curram J, Fox R, Gutmann J, Kisyombe GM, Ngowi FI, Ramsay AR, Saruni AO, Sam N, Tillotson G, Uiso LO, Yates M, Gillespie SH.

Randomized controlled trial of a drug regimen that includes ciprofloxacin for the treatment of pulmonary tuberculosis. Clin Infect Dis 1996; 22(5):827-833.

Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. **Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen specific T cells.** Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:824-828.

Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. **Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells.** Lancet 2001; 357: 2017-2021

Lalvani A. **Spotting latent infection: the path to better tuberculosis control.** Thorax 2003; 58: 916-918.

Laszlo A. **Tuberculosis: 7 Laboratory aspects of diagnosis.** CMAJ 1999; 160: 1725-1729.

Lawn SD, Bangani N, Vogt M, Bekker LG, Badri M, Ntobongwana M, Dockrell HM, Wilkinson RJ, Wood R. **Utility of interferon- γ ELISPOT assay in highly tuberculosis-exposed patients with advanced HIV infection in South Africa.** BMC Infectious Disease 2007;7:99 doi:10.1186/1471-2334-7-99.

Lee E, Holzman R S. **Evolution and current use of the tuberculin skin test.** Clin Infect Dis 2002 ; 34:365-370.

Lein A D, von Reyn C F. **In vitro cellular and cytokines responses to mycobacterial antigens: application to diagnosis of tuberculosis infection and assessment of response to mycobacterial vaccines.** Am J Med Sci 1997; 313: 364-371.

Light R W. **Diagnostic principles in pleural disease.** Eur Respir J 1997; 10: 476-481.

Menzies D, Pai M, Comstock G. **Meta-analysis: New tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research.** Annals of Internal Medicine 2007; 146: 340-354.

Malathum K, Singh K V, murray B E. **In vitro activity of moxifloxacin against gram-positive bacteria (abstract E204).** 38th International conference on

Antimicrobial Agents and Chemotherapy; September 24, 1998; San Diego, CA, USA.

Mantegani P, Piana F, Codecasa L, Galli L, Scarpellini P, Lazzarin A, Cirillo D, Fortis C. **Comparison of an in-house and commercial RD1-based ELISPOT-IFN- γ Assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection.** Clin. Med. Res. 2006; 4(4):266-272.

Mazurek G H, Weis S E, Moonan P K, Daley C L, Bernardo J, Iardizabal A A, Revers R R, Toney S R, Daniels L J, IoBue P. **Prospective comparison of the tuberculin skin test and 2 whole-blood interferon- γ release assays in persons with suspected tuberculosis.** Clin. Inf. Dis. 45:837-845.

McDonald R J, Memon M D, Reichman L B. **Successful supervised ambulatory management of tuberculosis treatment failures.** Ann Intern Med 1982; 96: 297- 302.

Miyazaki E, Miyazaki M, Chen J M, Chaisson R E, Bishai W R. **Moxifloxacin (BAY12-8039), a new 8-methoxyquinolone, is active in a mouse model of tuberculosis.** Antimicrob Agents Chemther 1999; 43(1):85-89.

Olsen A W, Hansen P R, Holm A, Andersen P. **Efficient protection against *Mycobacterium tuberculosis* by vaccination with a single subdominant epitope from the ESAT-6 antigen.** Eur J Immunol 2000; 30:1724-1732.

Orme IM, Andersen P, Boom WH. **T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*.** J Infect Dis 1993; 167:1481-1497.

Pai M, Riley L W, Colford J M. **Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review.** Lancet 2004; 4:761-776.

Pai M. **Alternatives to the tuberculin skin test: interferon- γ assays in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection.** Indian J Medical Microb 2005; 23(3):151-158.

Pai M, Zwerling A, Menzies D. **Systematic Review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update.** Ann Intern Med 2008; 149:177-184.

Pai M, Kalantri S, Dheda K. **New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. latent tuberculosis.** Expert Rev Mol Diagn 2006; 6(3):413-422.

Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G, Hill AV, Lalvani A. **Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN- γ -secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment.** J Immunol 2001; 167:5217-5225.

Rangaka MX, Diwakar L, Seldon R, van Cutsem G, Meintjes GA, Morroni C, Mouton P, Shey MS, Maartens G, Wilkinson KA, Wilkinson RJ. **Clinical, Immunological, and Epidemiological importance of antituberculosis T Cell responses in HIV-infected Africans.** CID 2007; 44:1639-1646.

Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, Kok-Jensen A, Andersen P, Weldingh K. **Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 e CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis.** CDLI 2005; doi:10.1128/CDLI.12.4.491-496.

Requejo H I Z. **Diagnóstico laboratorial da tuberculose e outras micobactérias.** Laes & Haes 2000; Ano 22 n°128.

Richeldi L. **An update on the diagnosis of tuberculosis infection.** Am J Respir Crit Care Med 2006; 174:736-742.

Ribeiro S B, Dooley K, Hackman J, Loreda C, Efron A, Chaison R E, Conde M B, Boechat N, Dorman E S. **T-SPOT. TB responses during treatment of pulmonary tuberculosis.** BMC Inf Dis. 2009;doi:10.1186/1471-2334-9-23

Richeldi L, Ewer K, Losi M, Bergamini B, millington K A, Fabbri L M, Lalvani A. **T cell-based diagnosis of neonatal multidrug –resistant latent tuberculosis infection.** Pediatrics, 2007; 119(1):e1-5.

Sant'Anna C C, Orfaliais C T S, March M F P, Conde M B. **Evaluation of a proposed diagnostic scoring system for pulmonary tuberculosis in Brazilian children.** Int J Tuberc Lung Dis 10(4):463-465.

Sartain M J, Slaydent R A, Singh K K, Laals S, Belisle J T. **Disease state differentiation and identification of tuberculosis biomarkers via native antigen array profiling.** Mol. Cel. Proteomics 2006; 5:2102-2113.

Soini H E, Musser J M. **Molecular diagnosis of mycobacteria.** Clin Chem 2001; 47: 809-814.

Sorensen A L, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen A B. **Purification and characterization of low –molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis***. *Infect Immun* 1995; 63: 1710-1717.

Sztajnbok F R, Boechat N L, Sztajnbok D C N, Ribeiro S B, Oliveira S K F, Sant'Anna C C. **The challenge of pediatric tuberculosis in face of new diagnostic techniques**. *Jornal de Pediatria* 2009; 85 (3);183-193.

Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M. **A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis**. *Thorax* 2007; 62:911-918.

Tissot F, Zanetti G, Francioli P, Zellweger JP, Zysset F **Influence of bacille calmette-guerin vaccination on size of tuberculin skin test reaction: to what size?** *Clin Infect Dis* 2005; 40(2):211-217.

Trabulsi L R, Alterthum F. *Microbiologia*. 4ª edição-revista e atualizada. São Paulo, Atheneu, 2005. 409-413.

van Crevel R, Ottenhoff T H, van der Meer J W. **Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis***. *Clin Microbiol Rev* 2002;15: 294-309.

Voldermeier H M, Chambers M A, Cockle P J, Whelan A O, Simmons J, Hewinson R G. **Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis**. *Infect Immun* 2002; 70:3026-3032.

Wallis R S, Doherty T M, Onyebujah P, Vahedi M, Laang H, Olesen O, Parida S, Zumia A. **Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse**. *Lancet Infect dis* 2009; 9:162-172.

Walzl G, Ronacher K, Siawaya J F D, Dockrell. **Biomarkers for TB treatment response: Challenges and futures strategies**. *Journal of infection* 2008; 57:103-109.

Wood P R, Jones S L. **BOVIGAN: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis**. *Tuberculosis (Edinb)* 2001; 81: 147-55.

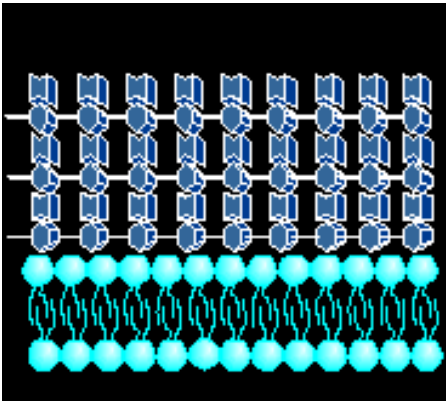
WOODS,G.L. 2001. **Molecular techniques in mycobacterial detection.** Arch Pathol Lab Med 125, 122-126

WHO (World Health Organization) 1993. **Tuberculosis Notification Update,** Geneva, December 1993 Tuberculosis Program.

Zellweger J P, Zellweger A, Ansermet S, de Senarclens B, Wrighton-Smith P. **New T cell based test correlates better with tuberculosis exposure than tuberculin skin test.** Int J Tuberc Lung Disease 2005; 9:1242-1247.

12 –ANEXOS

ANEXO 1 - Parede do *Mycobacterium tuberculosis*



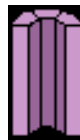
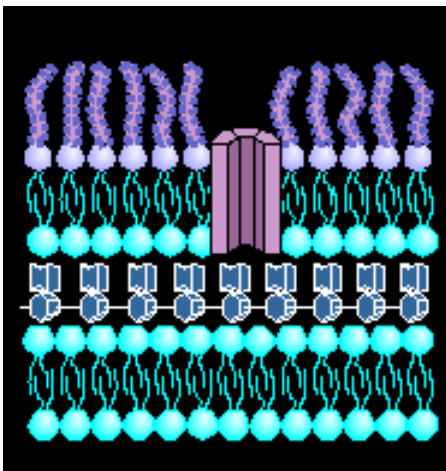
Peptidoglicana



Bicamada lipídica

← **Organismos Gram-positivos:**

A membrana celular da bicamada lipídica é coberta por uma camada porosa de peptidoglicana, permeável à maioria dos agentes antimicrobianos.



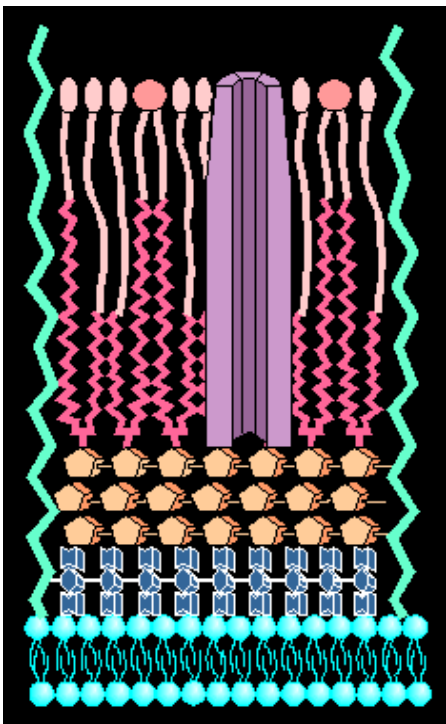
Porinas



Lipídio + LPS

← **Organismos Gram-negativos:**

As células são envoltas por duas membranas. A membrana externa serve como eficiente barreira de permeabilidade, já que contém lipopolissacarídios (LPS) e porinas.



← **Micobactérias:**

As micobactérias sintetizam uma camada externa grossa, rica em micolato, que serve como barreira altamente eficiente.



Micolato



LAM



Acil lipídios



Arabinogalactana

ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

CEP - MEMO - n.º. 789/06

Rio de Janeiro, 02 de outubro de 2006.

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Prof. Marcus Barreto Conde

Assunto: Parecer sobre relatório parcial + solicitação de continuação do projeto por mais 1 (um) ano).

Referência: Projeto n.º 124/02 - CEP.

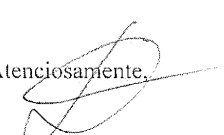
Título: "Estudo clínico randomizado fase 2 de um esquema terapêutico contendo moxifloxacina para o tratamento de tuberculose pulmonar com baciloscopia de escarro positiva em adultos com e sem infecção pelo HIV".

Sr.(a) Pesquisador(a),

Informo a V. Sa., que em reunião deste CEP realizada em 18/09/2006, foi apreciado e considerado "**APROVADO**", o parecer sobre relatório parcial + solicitação de continuação do projeto por mais 1 (um) ano, referente ao projeto de pesquisa acima referenciado.

Informo ainda, que a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), orienta que o pesquisador ou patrocinador deve enviar à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a referida emenda junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao projeto original.

Atenciosamente,


Prof. Luiz Carlos Duarte de Miranda
Coordenador do CEP

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

The Johns Hopkins Medical Institutions
(The Johns Hopkins Hospital
The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

Identificação do indivíduo
incluído na pesquisa

APPROVED
AS MODIFIED
01 de dez 2004
WIRB®
Olympia, WA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA SUJEITOS DE PESQUISA

TÍTULO: Estudo clínico randomizado fase 2 de um esquema terapêutico contendo moxifloxacina para o tratamento de tuberculose pulmonar com baciloscopia de escarro positiva em adultos com e sem infecção pelo HIV (versão 5.0, 6 de agosto de 2004).

PROTOCOLO NÚMERO: WIRB® 20021248

PATROCINADOR: FDA Office of Orphan Products Development
5600 Fishers Lane
Rockville, MD, USA 20857

INVESTIGADOR: Richard E. Chaisson, M.D.
Johns Hopkins University
Center for TB Research
1503 East Jefferson Street
Baltimore, MD, USA, 21231-1002
(410) 955-1755; (410) 955-0740 fax

LOCALIDADE: Programa de Controle da Tuberculose Hospitalar (PCTH)
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ.
Av. Brigadeiro Trompowski s/n, Ilha do Fundão
Rio de Janeiro, RJ, Brasil CEP 21941-590

SUB-INVESTIGADORES: Dr. Afrânio L. Kritski
Dr. Marcus B. Conde
Dra. Fernanda Mello



Este termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Por favor, peça ao médico ou a algum outro componente do grupo do estudo que explique qualquer palavra ou informação que você não tenha entendido claramente. Você pode também levar para casa uma cópia não-assinada deste consentimento livre e esclarecido para pensar ou discutir com sua família ou amigos antes de tomar sua decisão.

PROPOSTA DO ESTUDO

Este é um estudo clínico. Estudos clínicos somente incluem indivíduos que escolham por tomar parte dele. Por favor, use o tempo que necessitar para tomar sua decisão. Você pode discutir isto com sua família e amigos.

The Johns Hopkins Medical Institutions
(The Johns Hopkins Hospital
The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

APPROVED
AS MODIFIED
01 de dez 2004
WIRB®
Olympia, WA

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa porque você está necessitando ser tratado para tuberculose (TB). A Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins (*Johns Hopkins University School of Medicine*) e o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho estão conduzindo este estudo neste hospital.

O objetivo deste estudo é descobrir se uma combinação experimental de drogas terapêuticas para a TB funciona melhor do que as drogas comumente usadas para o seu tratamento. O estudo irá também ver quais, se houver algum, efeitos colaterais são causados pela ingestão desta combinação experimental de drogas. Adicionalmente, este estudo irá avaliar um teste laboratorial em investigação para TB. Está sendo chamado em investigação um teste laboratorial cuja comercialização ainda não foi autorizada pela Administração de Alimentos e Fármacos dos Estados Unidos (*U.S. Food and Drug Administration*).

DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Remédios podem curar a doença TB. Normalmente, pessoas portadoras de tuberculose recebem um tratamento padrão que combina três ou quatro drogas e que inclui isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Neste estudo, metade dos pacientes com TB irá tomar o tratamento padrão e a outra metade irá utilizar uma combinação experimental de quatro drogas. Esta combinação de quatro drogas inclui as mesmas drogas (isoniazida, rifampicina, pirazinamida) e usa a droga moxifloxacina em vez de etambutol.

Moxifloxacina tem sido usada para tratar outros tipos de infecção. Testes têm mostrado que ela funciona e é segura para estas infecções. Moxifloxacina não foi testada para curar a tuberculose e não está aprovada para este uso. É isto que este estudo tem o objetivo de fazer.

PROCEDIMENTOS

Recrutamento

Se você ingressar neste estudo, será designado para um dos grupos de tratamento aleatoriamente (como se fosse jogada uma moeda para alto). Você terá a mesma chance de ser designado para cada um dos grupos com cada uma das combinações de medicamentos. Nem você e nem o médico do estudo vão escolher para qual grupo você será designado. Entretanto, esta informação estará à disposição do médico do estudo caso ela seja necessária em uma emergência.

Os grupos de tratamento para os quais você poderá ser designado são:

Tratamento com isoniazida, rifampicina, pirazinamida, moxifloxacina e um comprimido de placebo todos os dias durante 2 meses, seguido de rifampicina e isoniazida 2 vezes por semana durante 4 meses,

OU

The Johns Hopkins Medical Institutions
(The Johns Hopkins Hospital
The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

APPROVED
AS MODIFIED
01 de dez 2004
WIRB®
Olympia, WA

Tratamento com isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e um comprimido de placebo todos os dias durante 2 meses, seguido de rifampicina e isoniazida 2 vezes por semana durante 4 meses.

Comprimidos de placebo são pílulas que não contêm nenhum tipo de medicação. São comprimidos que são incluídos em combinações terapêuticas de forma que nem o médico do estudo e nem você possam saber em que grupo de tratamento você está.

Se você for selecionado para participar, serão feitas perguntas referentes a você e a sua saúde, tanto de fatos atuais como de fatos passados, como por exemplo, se você teve tuberculose previamente e qual tratamento foi feito, seu nível de instrução, seu trabalho, consumo de bebidas alcoólicas, outras doenças que você tenha tido e outros medicamentos que você possa estar tomando. Algumas destas questões podem ser íntimas e você terá o direito de não responder a qualquer uma delas. Estas questões irão ajudar o médico do estudo a decidir se você é elegível para tomar parte do estudo. Estas questões poderão também explicar diferenças no efeito do tratamento ao final do estudo.

Você será submetido a um exame físico. Cerca de 30 mililitros cúbicos de sangue serão retirados da sua veia. Nós vamos usar este exame de sangue para verificar suas funções hepática, renal e suas células sanguíneas. Se você for capaz de engravidar, será feito um teste de gravidez no sangue coletado.

Todas as pessoas que participarão deste estudo deverão fazer um exame de HIV. Nós garantimos confidencialidade e aconselhamento. Os resultados positivos para HIV e para TB deverão ser comunicados à Secretaria de Saúde. Esta é uma obrigação legal dos profissionais da área de saúde.

Será solicitado que você forneça amostras de escarro (catarro produzido pela tosse e proveniente dos pulmões). Você fará uma radiografia de tórax para verificar seus pulmões e eletrocardiograma para verificar seu ritmo cardíaco.

Tratamento

A fase de tratamento do estudo é o tempo em que você está tomando os remédios. Durante as primeiras oito semanas, um profissional da área de saúde irá encontrar com você cada dia da semana para lhe dar remédio e assistir você tomá-lo. Após as primeiras oito semanas e durante mais quatro meses, um profissional da área de saúde irá encontrar com você duas vezes por semana para lhe dar os remédios do estudo e assistir você tomá-los.

Um profissional da área de saúde irá também encontrar com você toda semana nas primeiras oito semanas, e depois uma vez no mês quatro de tratamento e uma vez no mês seis de tratamento para perguntar a você sobre sintomas de TB e sobre qualquer efeito colateral dos remédios do estudo. Será perguntado a você sobre qualquer outro remédio que você tenha tomado e qualquer outra doença que você tenha tido desde a última consulta.

The Johns Hopkins Medical Institutions
(The Johns Hopkins Hospital
The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

APPROVED
AS MODIFIED
01 de dez 2004
WIRB®
Olympia, WA

O médico do estudo irá examinar você para ter certeza de que o tratamento está progredindo bem e que os remédios do estudo não estão lhe prejudicando. A cada semana do estudo, você deverá fornecer novas amostras de escarro para exames para TB. Você também deverá fornecer uma amostra de escarro na última consulta, quando completar o tratamento após seis meses.

Nas semanas quatro e oito do estudo, cerca de 10 mililitros cúbicos de sangue serão colhidos de sua veia para verificar suas funções hepática, renal e suas células sanguíneas. No primeiro dia, e depois nas semanas dois, quatro, seis e oito, você fará um eletrocardiograma para verificar o seu ritmo cardíaco. Na semana oito do estudo, você fará uma radiografia de tórax para verificar seus pulmões.

Se você tiver sintomas ou problemas, terá cerca de 10 mililitros cúbicos de sangue coletados para verificar sua função hepática e células sanguíneas. Nas semanas 16 e 24 do estudo cerca de 16 mililitros cúbicos de sangue serão coletados para um teste de TB usando um teste laboratorial em investigação. Este teste será realizado logo após a coleta do sangue no laboratório Multidisciplinar do HUCFF/UFRJ. Se em qualquer momento você desenvolver sintomas de TB, fará uma radiografia de tórax e um exame de escarro. O tratamento com as drogas do estudo será interrompido se você tiver algum efeito colateral ou se o estudo terminar antes do tempo planejado. Mesmo que os remédios do estudo sejam suspensos, nós iremos continuar lhe acompanhando no estudo.

Acompanhamento

Esta parte do estudo começa quando você concluir a fase de tomada de remédios do estudo e continua durante os 12 meses seguintes. Você será visto duas vezes. A primeira seis meses depois de terminar o tratamento para TB, já a segunda no final da fase de acompanhamento, 12 meses depois de concluir o tratamento para TB. Será perguntado a você sobre a presença de sinais ou sintomas de TB ativa, e poderá ser solicitado que você forneça uma amostra de escarro para exame. Se você tiver TB novamente, será tratado e acompanhado pelo PCTH até ficar curado. Se você tiver sinais ou sintomas de TB no intervalo das visitas, poderá vir para ser visto e examinado no PCTH.

RISCOS POTENCIAIS

Os possíveis efeitos colaterais dos remédios do estudo são:

A **Moxifloxacina** pode causar náuseas, diarreia, dor abdominal e vômitos. Ela também pode causar vertigem, dor de cabeça, nervosismo, confusão, tremor, episódios de aumento ou diminuição da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca e palpitação. A Moxifloxacina pode causar problemas com o seu ritmo cardíaco, particularmente se você está tomando outros remédios que tenham ação no coração. É por isso que será realizado o eletrocardiograma. Se você estiver tomando algum dos seguintes medicamentos, não deverá usar moxifloxacina e não deverá participar do estudo: amiodarona, sotalol, quinidina, procainamida, cisaprina, eritromicina, perfernazina, amitriptilina, fenotizina ou antidepressivos tricíclicos.

The Johns Hopkins Medical Institutions
(The Johns Hopkins Hospital
The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

APPROVED
AS MODIFIED
01 de dez 2004
WIRB®
Olympia, WA

A **Isoniazida** pode afetar os nervos das suas mãos, ocasionando formigamento ou perda da sensibilidade. Entretanto, não é provável que isso ocorra na dose que você tomará. Você irá tomar vitamina B6 com a isoniazida para diminuir o risco de problemas nos nervos. Embora não seja freqüente (ocorre em menos de 1% dos casos), o mais sério efeito colateral da isoniazida é o dano hepático (ou seja, hepatite) e icterícia (os olhos e/ou a pele ficam amarelos). Os sintomas destas condições são náusea, perda de apetite, dor no lado direito do abdômen e urina escura. Se qualquer destes sintomas ocorrer, você deve parar de usar os remédios imediatamente e entrar em contato conosco para que possamos lhe examinar. A rifampicina e a pirazinamida também podem causar este efeito, porém o risco deste efeito colateral é ainda menor do que o com a isoniazida.

A **Rifampicina** pode fazer com que suas lágrimas, suor, saliva, fezes e urina fiquem de cor alaranjada. Lentes de contato podem ficar com esta cor para sempre devido à cor alaranjada de suas lágrimas.

A **Rifampicina**, a **isoniazida** e a **moxifloxacina** podem fazer o número total de plaquetas no sangue diminuir. Plaquetas são as células sanguíneas que ajudam na coagulação do sangue. Se o número de plaquetas estiver muito baixo, pode haver problemas de sangramento e manchas roxas na sua pele. Este efeito colateral é raro (menos de 1% dos casos), mas é potencialmente sério, e você precisa chamar o médico ou a enfermeira do estudo imediatamente caso este problema ocorra.

A **isoniazida** e a **rifampicina** podem causar coceira, exantema, febre, mal estar no estômago, azia, perda do apetite, náusea, vômitos ou diarreia. A isoniazida e a rifampicina podem causar dor de cabeça, tonteados, fraqueza, dor nas juntas, anemia e baixa na contagem de glóbulos brancos, o que pode levar a infecção.

A **Isoniazida** pode também causar diminuição do nível sanguíneo de vitaminas, aumento do açúcar sanguíneo, vertigem, alteração da consciência, distúrbios visuais, perda da memória e psicose. A **Rifampicina** pode fazer você se sentir como se estivesse gripado, além de poder fazer aparecer sangue na urina e prejudicar o funcionamento dos seus rins.

A **Pirazinamida** pode causar exantema, dor nas juntas, náuseas e hepatite.

O **Etambutol** pode causar exantema, náuseas, vômitos e diarreia. O mais sério efeito colateral do etambutol é o dano à retina dos olhos. Se você notar alguma alteração em sua capacidade de ver cores, o remédio deve ser interrompido imediatamente.

A **isoniazida** e a **rifampicina** podem fazer que outros remédios que você esteja tomando não funcionem direito. Outros remédios podem fazer que a moxifloxacina não funcione direito (ex. antiácidos, ferro e zinco). Por favor, fale com uma das enfermeiras ou com o médico do estudo antes de começar a usar outros remédios durante o tempo em que você estiver usando **isoniazida**

The Johns Hopkins Medical Institutions
(The Johns Hopkins Hospital
The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

APPROVED
AS MODIFIED
01 de dez 2004
WIRB®
Olympia, WA

ou **rifampicina**. Isto inclui até mesmo aqueles remédios corriqueiros como antiácidos e Tylenol®.

Podem existir outros efeitos adversos destes remédios que nós não conhecemos ainda.

Se você tiver algum efeito colateral, você *deve* informar logo o médico ou a enfermeira do estudo. Se isto ocorrer, você será avaliado e será informado sobre o que fazer. No caso de efeitos colaterais sérios, você poderá ter amostras de sangue coletadas e fazer um eletrocardiograma. Pode ser que seja suspenso o remédio do estudo. Seu médico do estudo é quem decidirá se você deverá re-começar ou não com os remédios do estudo.

Existem alguns pequenos riscos na coleta do sangue. Eles incluem uma dor passageira pela picada da agulha, manchas roxas, sangramentos, delírio e, raramente, infecção no local da punção da veia.

Você poderá considerar que algumas das perguntas do estudo abordam questões muito pessoais. Você não terá que responder a estas questões se não quiser. O risco de outro procedimento, se existente, seria a exposição aos Raios X, caso sejam feitas mais radiografias do que as que são realizadas normalmente como parte do acompanhamento do tratamento-padrão para TB.

A sua tuberculose pode não melhorar ou pode até piorar enquanto você estiver participando neste estudo.

Somente as pessoas incluídas neste estudo podem tomar os remédios de estudo. Eles devem ser mantidos fora do alcance de crianças e de pessoas que não estão capacitadas a ler ou entender o que está escrito nos rótulos.

INFORMAÇÃO PARA MULHERES

A isoniazida e o etambutol parecem não causar defeitos de nascimento. Entretanto, nós não sabemos o quão seguras são a moxifloxacina, a rifampicina ou a pirazinamida para mulheres grávidas ou que estão amamentando. No entanto, você não poderá participar do estudo se estiver grávida, planejando engravidar antes de terminar o tratamento, ou se está amamentando. Você será submetida a um teste de gravidez antes de iniciar o tratamento caso seja capaz de engravidar.

Além disto, a **rifampicina** pode fazer com que pílulas anticoncepcionais, injeções e implantes de hormônios não funcionem na prevenção da gravidez. Assim, durante este estudo, você deve usar somente outros métodos de controle de natalidade (tais como preservativos, diafragmas, esponjas, cápsulas cervicais e dispositivos intra-uterinos).

Se você engravidar, você *deve* falar com a enfermeira ou com o médico do estudo imediatamente. Se isto ocorrer, os remédios do estudo serão suspensos. Seu médico do estudo irá então decidir qual será o tratamento mais adequado para você e para o bebê que ainda não nasceu.

The Johns Hopkins Medical Institutions
(The Johns Hopkins Hospital
The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

APPROVED
AS MODIFIED
01 de dez 2004
WIRB®
Olympia, WA

NOVOS ACHADOS

Você será informado sobre qualquer novo desenvolvimento que possa influenciar sua decisão de participar do estudo.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

Você receberá tratamento para sua TB enquanto estiver participando deste estudo. Sua participação nesta pesquisa irá nos ajudar a aprender mais sobre como tratar a TB; entretanto, não podemos garantir que a sua tuberculose será curada.

CUSTOS

Não existem custos para você participar deste estudo. Você não terá que pagar por nenhum dos remédios ou exames para participar deste estudo.

PAGAMENTO POR PARTICIPAÇÃO

Você não será pago por sua participação neste estudo; entretanto, você receberá um tíquete refeição para pagar o seu café da manhã e um vale transporte para que você venha ao hospital para receber os seus remédios para tuberculose.

TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Se você escolher não participar deste estudo, existem alternativas para o tratamento:

O Ministério da Saúde do Brasil e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Center of Diseases Control and Prevention, CDC*) recomendam a combinação-padrão de remédios durante seis meses como o melhor esquema de tratamento disponível. Você não precisa participar deste estudo para receber este tratamento-padrão para a sua TB.

CONFIDENCIALIDADE

Nós consultaremos o seu prontuário médico para obter informações para o estudo. Uma vez que este estudo envolve remédios regulamentados pela Administração de Alimentos e Drogas (*Food and Drug Administration, FDA*), a FDA também poderá consultar seu prontuário médico. Manteremos todas as informações do seu prontuário tão privativas quanto nos for permitido por lei.

The Johns Hopkins Medical Institutions
(The Johns Hopkins Hospital
The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

APPROVED
AS MODIFIED
01 de dez 2004
WIRB®
Olympia, WA

As informações deste estudo poderão ser fornecidas para agências governamentais em outros países onde os remédios do estudo puderem estar sendo considerados para aprovação. Prontuários médicos que identifiquem você e o termo de consentimento livre e esclarecido assinado por você poderão ser avaliados e/ou copiados para fins de pesquisa ou de regulamentação por:

- Autoridades brasileiras da área de saúde;
- FDA;
- Agências do Departamento de Saúde e Serviços Humanos (*Department of Health and Human Services -DHHS*);
- Agências governamentais de outros países;
- Universidade Johns Hopkins;
- *Western Institutional Review Board*® (WIRB®);
- Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUCFF/UFRJ.

Confidencialidade absoluta não pode ser garantida por causa da necessidade do fornecimento de informações para estas partes. Os resultados deste estudo poderão ser apresentados em Congressos e em revistas científicas. Sua identidade não será revelada nestas publicações ou apresentações.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA/ABANDONO DO ESTUDO

A participação neste estudo é voluntária. Se você optar por não tomar parte do estudo, isto não modificará os cuidados terapêuticos neste local. Se você escolher participar do estudo, poderá abandoná-lo a qualquer momento sem que isto afete o tratamento médico que receberia normalmente neste local. Seu médico do estudo também poderá retirar você do estudo se ele achar que isto é o melhor para a sua saúde. Seu médico do estudo discutirá isto com você.

Sua participação neste estudo poderá ser interrompida a qualquer momento pelo médico do estudo ou pelo patrocinador sem o seu consentimento.

COMPENSAÇÃO POR FERIMENTOS

Se você for lesionado ao participar deste estudo, ou julgar que não está sendo tratado adequadamente, por favor, contate o Dr. Marcus Conde. Os serviços médicos do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho estarão à sua disposição em caso de lesão. Você não está abrindo mão de nenhum dos seus direitos por estar participando deste estudo.

FONTE DO FINANCIAMENTO

O FDA (EUA) irá financiar este estudo/pesquisa.

The Johns Hopkins Medical Institutions
(The Johns Hopkins Hospital
The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

APPROVED
AS MODIFIED
01 de dez 2004
WIRB®
Olympia, WA

PERGUNTAS

Se você tem alguma pergunta adicional referente à sua participação no estudo, ou se em qualquer momento sentir que está sendo vítima de uma lesão relacionada à pesquisa ou reação aos remédios da pesquisa, contate:

Dr. Marcus Conde, ao telefone 2562-2426

Se você tem alguma pergunta sobre os seus direitos como sujeito de pesquisa, pode contatar:

Western Institutional Review Board® (WIRB®)
3535 Seventh Avenue, SW
Olympia, Washington USA 98502
Telefone: 1-800-562-4789

A WIRB® é um grupo de pessoas que faz revisões independentes de projetos de pesquisa.

Não assine este termo de consentimento livre e esclarecido a menos que tenha tido a chance de tirar dúvidas e tenha recebido respostas satisfatórias a todas as suas perguntas.

Se você concordar em participar deste estudo, irá receber uma cópia assinada e datada deste termo de consentimento livre e esclarecido.

CONSENTIMENTO

Li as informações deste termo de consentimento livre e esclarecido (ou elas foram lidas para mim). Todas as minhas dúvidas foram tiradas de forma satisfatória. Concordo em participar deste estudo.

Autorizo a liberação do meu prontuário médico (incluindo o resultado do meu teste de HIV) para o patrocinador, para as Autoridades Brasileiras da Área de Saúde, para o FDA, para as Agências do *DHHS*, para Agências Governamentais de outros países, para a Universidade Johns Hopkins, para o WIRB® e para o CEP do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

The Johns Hopkins Medical Institutions
 (The Johns Hopkins Hospital
 The Johns Hopkins Bayview Medical Center)

APPROVED
 AS MODIFIED
 01 de dez 2004
 WIRB®
 Olympia, WA

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, não estou abrindo mão de nenhum dos direitos legais aos quais eu teria como sujeito de um estudo clínico.

 Nome do participante em letra de fôrma

 Assinatura do participante

 data

 Assinatura da pessoa que conduziu a discussão sobre o
 termo de consentimento livre e esclarecido

 data

----- Usar somente se se aplicar -----

Se este termo de consentimento livre e esclarecido for lido para o participante porque ele não está capacitado para ler, uma testemunha imparcial que não seja afiliada ao estudo ou ao investigador deve estar presente para o consentimento e assinatura do seguinte texto:

Confirmo que as informações do termo de consentimento livre e esclarecido e quaisquer outras informações escritas foram cuidadosamente explicadas e aparentemente entendidas pelo indivíduo que participará da pesquisa. O indivíduo que participará da pesquisa concordou livremente em participar desta pesquisa.

 Assinatura da testemunha imparcial

 data

wirb/fda-orphan/site-trans/11-10-2003/cm
 mod. 12-03-2003/cm
 site-trans mod. 09-14-2004/cm
 site-trans mod. 12-21-2004/cm

ANEXO 4 – FORMULÁRIOS**T-SPOT.TB-TB**

Laboratory SUBMISSION Form

Screening #	_____
PID	_____
Visit Date	____/____/____
	MM DD YY
Week Number	0 16 24

CLINIC USE

Blood draw: Date ____/____/____ Time (24 hr) ____:____

MM DD YY

Number of tubes 0 1 2 3

*Minimum # of 8 ml tubes in week 0 is 2; in weeks 16 & 24 minimum # is 1 tube.

Comments _____

Initials _____ #____

LABORATORY USE

Receipt in lab: Date ____/____/____ Time (24 hr) ____:____

MM DD YY

Number of tubes 0 1 2 3

Number of vials for freezing: 0 1 2 3

Date vials put into -20°C: ____/____/____

Date vials put into -80°C: ____/____/____

Date vials transferred to liquid N₂ ____/____/____ Rack: ____ Box: ____

Comments _____

Formulário para inclusão de pacientes. A primeira parte (clinical use) era preenchida e assinada pelas enfermeiras do estudo Moxi. A ficha era encaminhada para o laboratório juntamente com as amostras. A segunda parte (laboratory use) era preenchida pelo responsável pelo processamento das amostras no laboratório. A ficha inclui número do paciente; quantidade de amostras coletadas, assinatura dos responsáveis em cada etapa, data de congelamento.

T-SPOT.TB-TB

Laboratory RESULTS Form

Screening # _____
 PID _____ - ____
 Visit Date ____ / ____ / ____
 MM D D Y Y
 Week Number 0 16 24

Type of cells: ___ fresh₁ ___ frozen₂
 Adequate number of cells: ___ yes₁ ___ no₂
 If NO, then number of cells per well: ___ x 10⁵
 T-SPOT.TB-TB Lot #: _____ Exp. Date: ___ / ___ / ___

CLINICAL SITE USE

Assay Date: ___ / ___ / ___ Operator initials: _____
 M M D D Y Y

Strip# : ___

	Location (e.g. A1)	# "spots"
Nil Control:	_____	_____
PHA:	_____	_____
Panel A:	_____	_____
Panel B:	_____	_____

Comments: _____

OXFORD IMMUNOTEC USE

Assay Date: ___ / ___ / ___ Operator initials: _____
 M M D D Y Y

Strip# : ___

	Location (e.g. A1)	# "spots"
Nil Control:	_____	_____
PHA:	_____	_____
Panel A:	_____	_____
Panel B:	_____	_____

Comments: _____

Formulário para anotação dos resultados após ensaio do kit T-SPOT.TB TB. Dividido em duas partes. A primeira (clinical site use) para preenchimento pelo responsável pelo teste. A segunda (Oxford Immunotech) preenchida pelos responsáveis em conferir o resultado, por contagem automática, na Oxford Immunotech. Strip#=número da tira do kit na qual cada amostra foi colocada; Nil Control=controle negativo usado no kit; PHA=controle positivo; Panel A=primeiro painel de antígenos usado no kit; Panel B=segundo painel de antígenos. # "spots"=número de SFCs contadas em cada poço.

T-SPOT.TB-TB

Laboratory RESULTS Form

Frozen cells

Number total of cells: _____/ml x 10⁶

Number of viable cells: _____/ml x 10⁶

Adequate number of cells: _____ yes₁ _____ no₂

If NO, then number of cells per well: _____ x 10⁵

T-SPOT.TB-TB Lot #: _____ Exp. Date: ____ / ____ / ____

Screening #	_____
PID	_____ - ____
Visit Date	____ / ____ / ____
	MM DD YY
Week Number	0 16 24

CLINICAL SITE USE

Assay Date: ____ / ____ / ____ Operator initials: _____
M M D D Y Y

Strip# : ____

	Location (e.g. A1)	# "spots"
Nil Control:	_____	_____
PHA:	_____	_____
Panel A:	_____	_____
Panel B:	_____	_____

Comments: _____

OXFORD IMMUNOTECH USE

Assay Date: ____ / ____ / ____ Operator initials: _____
M M D D Y Y

Strip# : ____

	Location (e.g. A1)	# "spots"
Nil Control:	_____	_____
PHA:	_____	_____
Panel A:	_____	_____
Panel B:	_____	_____

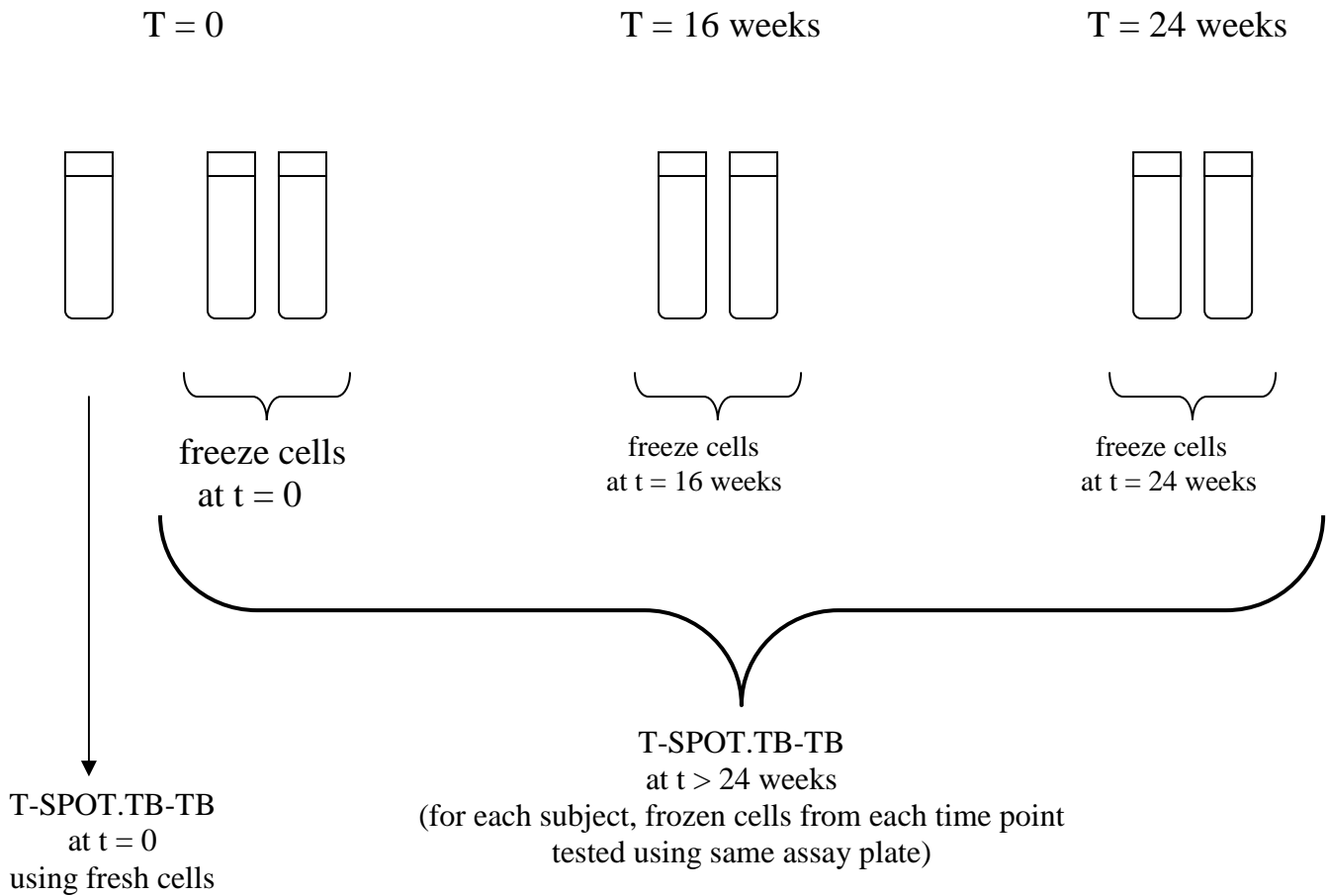
Comments: _____

Formulário para resultados do ensaio das amostras congeladas ao final do tratamento. A primeira (clinical site use) para preenchimento pelo responsável pelo teste. A segunda (Oxford Immunotech) preenchida pelos responsáveis em conferir o resultado, por contagem automática, na Oxford Immunotech. Strip#=número da tira do kit na qual cada amostra foi colocada; Nil Control=controle negativo usado no kit; PHA=controle positivo; Panel A=primeiro painel de antígenos usado no kit; Panel B=segundo painel de antígenos. #"spots"=número de SFCs contadas em cada poço.

ANEXO 5 – ESQUEMA DE COLETA

T-SPOT.TB-TB

Laboratory Scheme



Esquema para coleta do sangue periférico nos três tempos do estudo: Tempo zero – coleta de três tubos; ensaio da amostra de um tubo e congelamento das amostras dos outros dois tubos. Sema 16 e semana 24 – coleta de 2 tubos apenas para congelamento. As amostras dos três tempos de cada paciente foram congeladas para serem testadas simultaneamente, em uma mesma placa, ao fim do tratamento.

ANEXO 6 – FORMULÁRIO PARA MONITORAMENTO DO ESTUDO

Monitoring Log



Study:	Site:	Investigator:
---------------	--------------	----------------------

Site attendance by Oxford Immunotec staff:

Date	Visit By	Purpose of Visit	Signature

Formulário assinado por auditores da Oxford Immunotech a cada auditoria. Formulário semelhante era utilizado pela equipe da Johns Hopkins em cada visita trimestral de monitoramento (revisão de treinamento, procedimentos, formulários, entrada de dados e documentação)

ANEXO 7 – FIGURA 2 – ESQUEMA DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS - OXFORD IMMUNOTECH

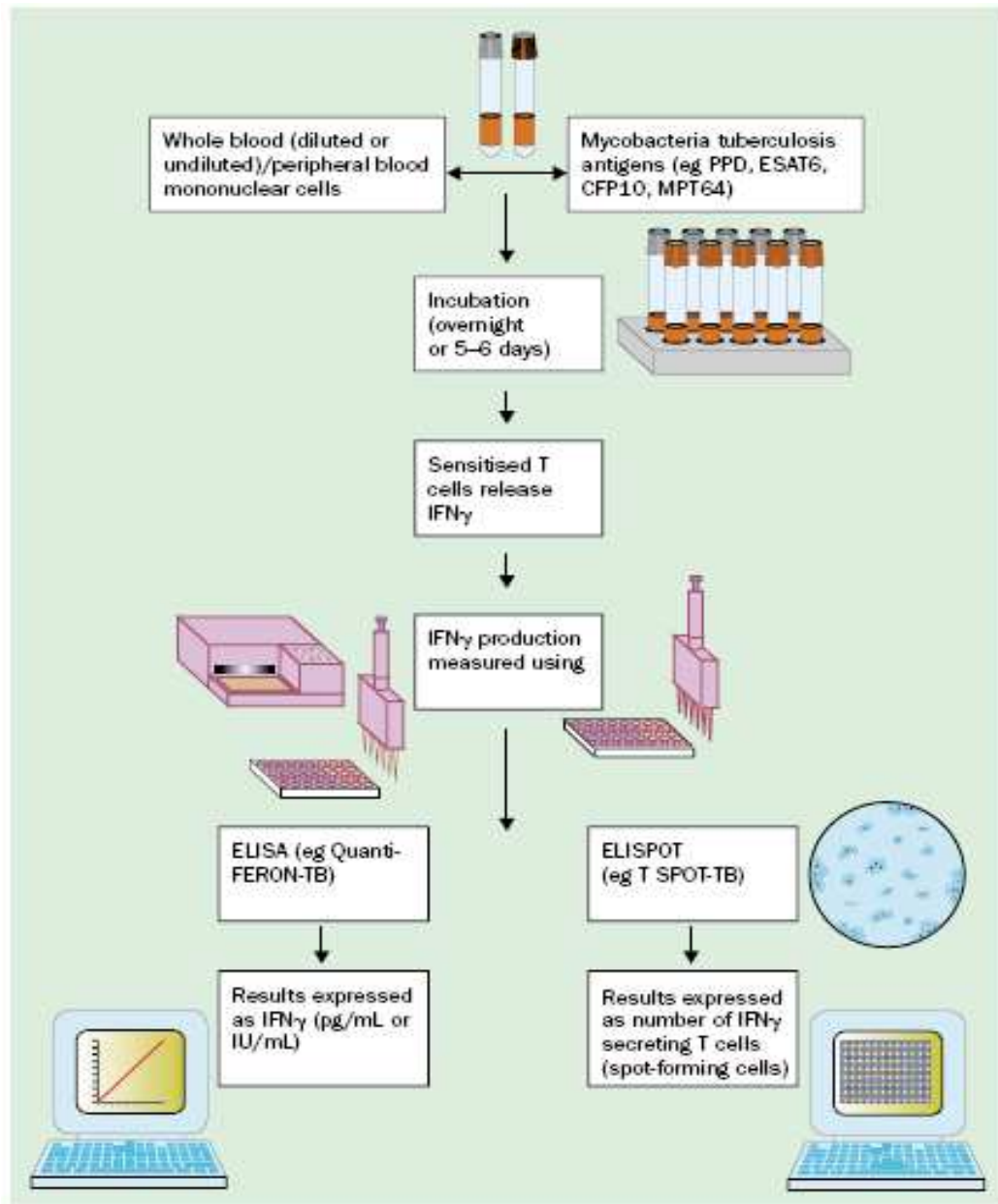
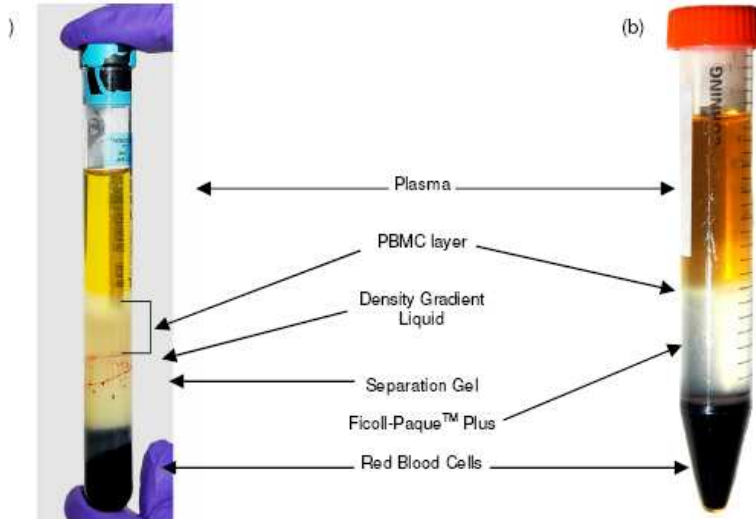


Figure 2. Overview of the interferon- γ (IFN- γ) assay technology.

Esquema de processamento dos dois testes comerciais para medida de interferon-gama QuantiFERON e T-SPOT.TB. A etapa de leitura dos dois testes é diferente. O QuantiFERON mede a concentração de IFN- γ e necessita de leitor de ELISA, enquanto o T-SPOT.TB mede o número de células produzindo IFN- γ e a leitura é visual, por Lupa ou Microscópio.

ANEXO 8

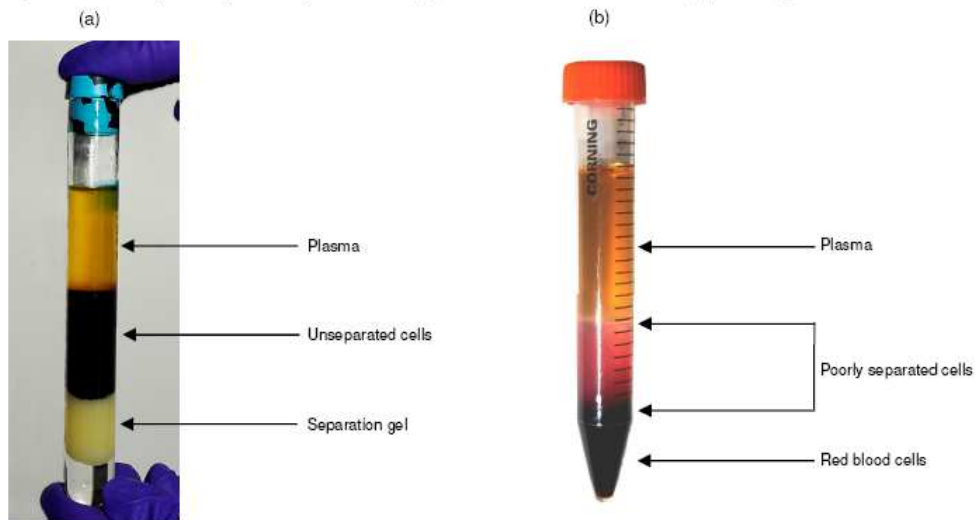
Figura 3 – Tubos para separação celular



a) Tubo CPT usado por nós para coleta das amostras. Após centrifugação há formação de nuvem onde estão os PBMCs que serão utilizados no teste. Esta nuvem é retirada e transferida para outro tubo para iniciar o processamento. B) Alternativa ao CPT: separação de PBMCs utilizando Ficoll-Paque.

Figura 4 - Tubos com amostra antes da separação celular

Figure 4: Examples of poor separation in (a) BD Vacutainer CPT and (b) Ficoll gradient.

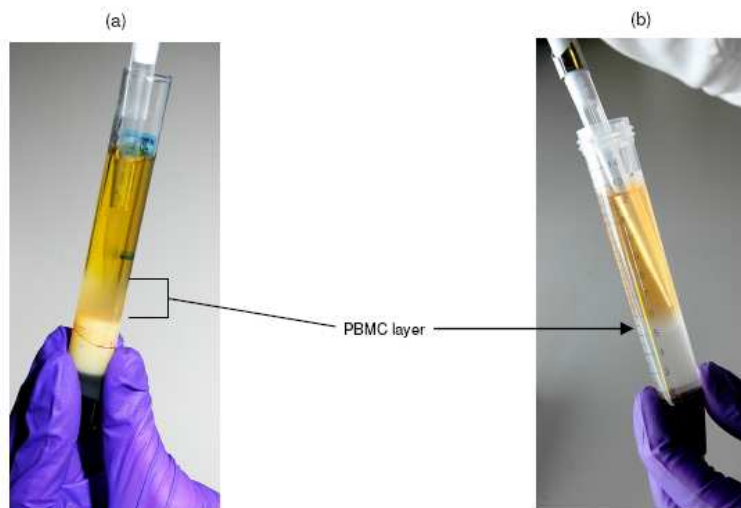


Diferença, antes da centrifugação e separação, entre os tubos CPT e o tubo com Ficoll. As amostras são coletadas diretamente no CPT; já no tubo com Ficoll, as amostras têm que ser coletadas em tubo com anticoagulante e depois, transferidas para tubo com ficoll. Adição de mais uma etapa no processamento.

ANEXO 9

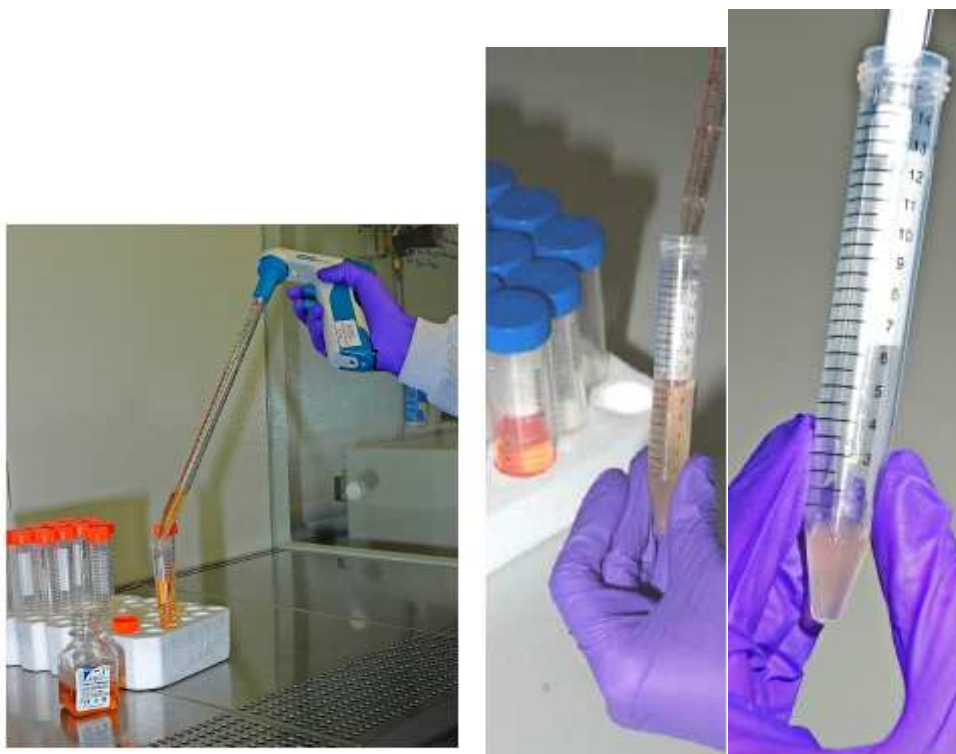
Figura 5 – Método para remoção dos PBMCs

Figure 5: Method recommended for removal of PBMC layer from (a) BD Vacutainer CPT and (b) Ficoll gradient.



Retirada da nuvem com os PBMCs para iniciar o processamento. (a) tubo CPT; (b) tubo com Ficoll.

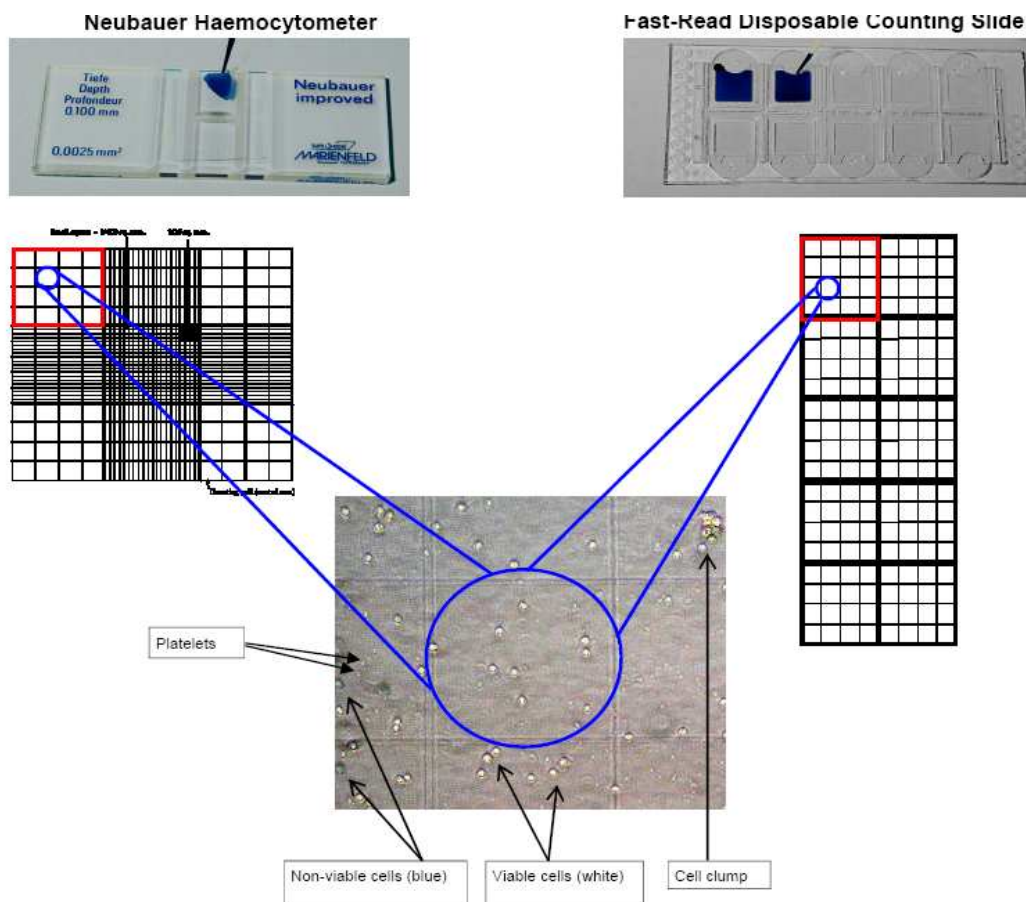
Figura 6 – Etapas do processamento das amostras



Lavagem dos PBMCs por adição de meio AIMV e centrifugação. São feitas duas lavagens. Após primeira lavagem descarta-se sobrenadante e adiciona-se novamente meio. Centrifuga-se novamente, retira-se o sobrenadante e adiciona-se meio AIMV para prosseguir com processamento ou meio de congelamento para congelar.

ANEXO 10

Figura 7 – Contagem das células



A contagem das células neste estudo foi feita utilizando-se Câmara de Neubauer. Foram adicionados 10 μ L de suspensão celular em 40 μ L de Azul de Tripiano. Esta suspensão foi adicionada na Câmara e foram contadas as células nos quadrantes como demonstrado acima.

Figura 8 – Procedimento de ensaio do kit



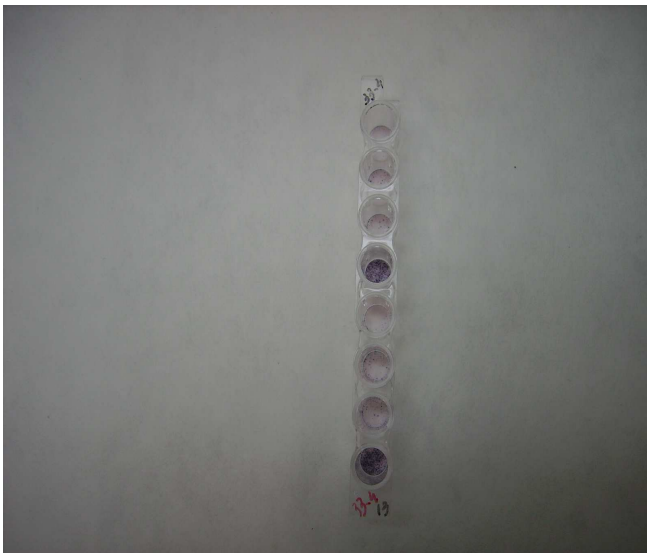
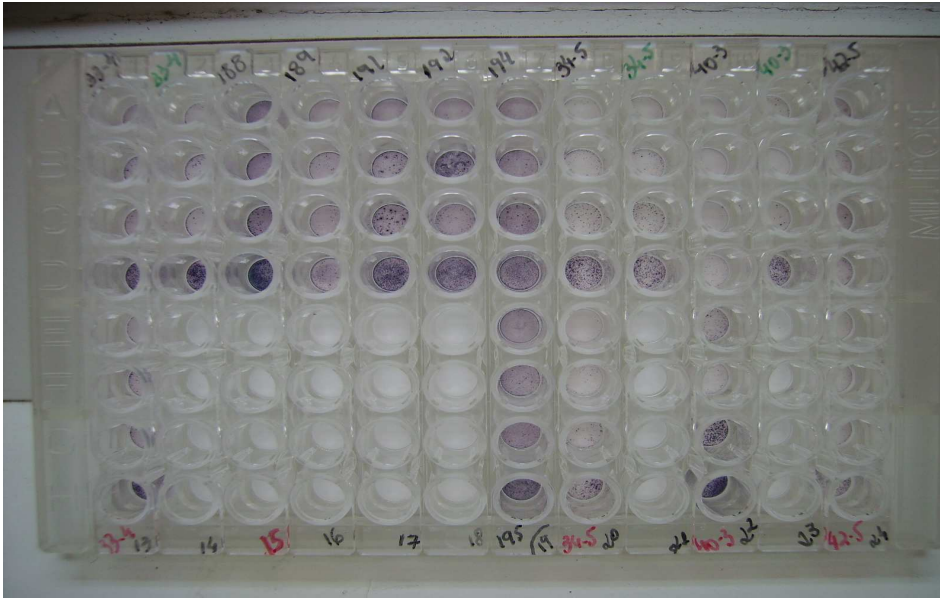
(a) Reagentes disponíveis no kit que são adicionados à placa juntamente com a amostra. (b) estufa de CO₂ a 5%, 37°C utilizada para incubação da amostra por período de 16 à 20 horas. Para padronização, estabelecemos um período de 18 horas.

ANEXO 11-Figura 9 – Continuação do teste após incubação overnight



De cima para baixo: lavagem da placa após incubação, adição de conjugado e substrato, lavagem em água corrente e visualização dos “spots” ao fim do ensaio.

ANEXO 12 -Figura 10 - FOTO DOS “SPOTS”



Primeira figura-foto da placa com todas as tiras e as duas últimas figuras, tiras individuais com ensaio de 2 amostras em cada tira (para cada amostra são utilizados 4 poços da tira). De cima para baixo: primeiro poço-controle negativo; segundo poço-painel de Ags A, terceiro poço-painel de Ags B, quarto poço-controle positivo.

ANEXO 13 – POSTER IDSA

TITLE: IFN- γ Secretion by Antigen-Specific T Cells as a Surrogate Marker for Treatment Efficacy in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis (TB)

AUTHORS: Kelly Dooley^{1*}, Samantha Ribeiro^{2*}, Judith Hackman¹, Marcus Conde², Susan Dorman¹, Neio Boechat² (*contributed equally)

AFFILIATIONS: ¹Johns Hopkins University, ²Federal University of Rio de Janeiro

ABSTRACT TEXT**Cenário:**

The TSPOT-TB test detects IFN- γ -producing T-cells that recognize certain *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) antigens. Performance of this test as a marker of treatment efficacy in patients with active TB has not been fully evaluated. We evaluated: (1) the frequency of *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific CD4 T cells at 0, 16, and 24 weeks of treatment, comparing patients with positive sputum cultures for MTB at 8 weeks (Cx+) “versus” patients with negative cultures at 8 weeks (Cx-); (2) the rate of decline of IFN-gamma-secreting CD4 cells (SFCs) with treatment; and (3) the frequency of positive tests after 6 months of directly observed therapy (DOT).

Methods:

This study was nested in a double-blind randomized treatment trial for smear positive pulmonary TB in Brazil. Subjects received DOT with isoniazid, rifampin, pyrazinamide and either moxifloxacin or ethambutol. Sputum was cultured at linha de base and at 8 weeks of treatment. The TSPOT-TB assay was used to enumerate ESAT-6 and CFP-10 peptide-specific T cells. Student's t-test, logistic regression, and log-transformed linear regression techniques were used.

Results:

Of 58 patients with pulmonary TB, 45 had a positive TSPOT-TB test, for an overall sensitivity of 77.6% (95% CI 64.7 to 87.5%). Forty-eight (83%) of patients had negative sputum cultures after 8 weeks of treatment, while 10 (17% had positive 8-week cultures). Cx+ patients tended to be older, were more likely to be in treatment arm B, and were more likely to be diabetic. The groups did not differ by weight, gender, or frequency of cavitory disease. Cx+ patients had an average of 61 SFCs after 24 weeks of treatment, compared with 28 SFCs in the Cx- group ($p=0.024$). After adjusting for diabetes status, the Cx+ group was 3.99 times more likely to have a positive TSpot test at the end of 24 weeks of treatment than the Cx- group, but this result did not reach statistical significance ($p=0.29$). After 24 weeks of treatment, 85% of patients still had a positive TSpot test. The rate of decline of SFCs was approximately 1 SFC per week, with no differences between the two groups ($p=0.57$).

Conclusions

For pulmonary TB patients, SFC counts were higher at the end of 6 months of treatment for those with positive sputum cultures at 8 weeks as compared to those with negative sputum cultures at 8 weeks.

Research article

Open Access

T-SPOT.TB responses during treatment of pulmonary tuberculosis

Samantha Ribeiro^{†1}, Kelly Dooley^{†2}, Judith Hackman², Carla Loreda¹, Anne Efron², Richard E Chaisson², Marcus B Conde¹, Neio Boechat^{†1} and Susan E Dorman^{*†2}

Address: ¹Instituto de Doenças do Torax/Hospital Clementino Fraga Filho/Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil and ²Center for Tuberculosis Research, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

Email: Samantha Ribeiro - sbrmicroimuno@yahoo.com.br; Kelly Dooley - kdooley1@jhmi.edu; Judith Hackman - hackmanj@jhmi.edu; Carla Loreda - loredoc@hucff.ufrj.br; Anne Efron - aefron@jhmi.edu; Richard E Chaisson - rchais@jhmi.edu; Marcus B Conde - marcusconde@hucff.ufrj.br; Neio Boechat - n_boechat@yahoo.com; Susan E Dorman* - dsusan1@jhmi.edu

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 28 February 2009

Received: 15 September 2008

BMC Infectious Diseases 2009, 9:23 doi:10.1186/1471-2334-9-23

Accepted: 28 February 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/23>

© 2009 Ribeiro et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens could serve as surrogate markers of treatment response.

Methods: Using the T-SPOT.TB assay and frozen peripheral blood mononuclear cells, we enumerated ESAT-6- and CFP-10-specific IFN- γ -producing T cells over time in pulmonary TB patients receiving directly observed treatment. T cell responses (measured as "spot forming cells" or "SFCs") were assessed prior to treatment and at 16 and 24 weeks of treatment.

Results: 58 patients were evaluated, of whom 57 were HIV seronegative. Mean (SD) ESAT-6, CFP-10, and summed RDI specific SFCs declined from 42.7 (72.7), 41.2 (66.4), and 83.8 (105.7) at baseline to 23.3 (39.4, $p = 0.01$), 23.2 (29.4, $p = 0.18$), and 46.5 (59.5, $p = 0.02$) at completion of 24 weeks of treatment, respectively. Only 10% of individuals with a baseline reactive test reverted to negative at treatment week 24. For the group that was culture positive at completion of 8 weeks of treatment compared to the culture negative group, the incidence rate ratio (IRR) of ESAT-6, CFP-10, and summed RDI specific SFC counts were, respectively, 2.23 ($p = 0.048$), 1.51 ($p = 0.20$), and 1.83 ($p = 0.047$). Patients with cavitory disease had mean ESAT-6 specific SFC counts that were higher than those without cavitory disease (IRR 2.08, $p = 0.034$).

Conclusion: IFN- γ -producing RDI-specific T cells, as measured in the T-SPOT.TB assay, may be directly related to bacterial load in patients undergoing treatment for pulmonary TB. However, high inter-subject variability in quantitative results coupled with failure of reversion to negative of qualitative results in most subjects at treatment completion may limit the utility of this assay as a surrogate marker for treatment efficacy.

Background

Progress in understanding the genome of *Mycobacterium tuberculosis* and human host responses has led to the

rational development of diagnostic tests for tuberculosis (TB).[1] Early secretory antigenic target-6 (ESAT-6) and culture filtrate protein 10 (CFP-10) are secreted antigens

encoded by region of difference-1 (RD1) of *M. tuberculosis*. These antigens elicit IFN- γ secretion by peptide-specific T cells.[1,2] Diagnostic tests have been developed to measure response T cell responses to these antigens.[3] T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Ltd, Abingdon, Oxon, UK) is an ex vivo enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay that uses overlapping peptide panels to stimulate IFN- γ secretion by ESAT-6 and CFP-10-specific T cells.

Among individuals with active TB, the T-SPOT.TB test and similar ELISPOT tests have reported sensitivities of 83–97%. [1,4–10] In addition, compared with the tuberculin skin test, the T-SPOT.TB and similar ELISPOT tests have been shown to correlate more closely with extent of *M. tuberculosis* exposure in contacts of TB patients. [11–13]

However, the role of T-SPOT.TB in monitoring response to TB treatment is less well-established. A blood test that correlated well with severity of disease or treatment response might be useful as a surrogate marker in clinical trials of new TB treatments, to predict TB treatment failure and/or relapse, and to monitor treatment response in conditions such as extrapulmonary TB or childhood TB in which sputum is uninformative or not readily obtainable. In order to assess the potential utility of T-SPOT.TB for monitoring treatment efficacy, we evaluated the relationship between frequency of antigen-specific IFN γ -secreting T cells and treatment response in patients with pulmonary TB receiving directly observed therapy (DOT) in the context of a phase II TB treatment study. We also evaluated the relationship between SFC counts and markers of TB disease severity at baseline.

Methods

Setting and design

We performed a longitudinal cohort study of a diagnostic test, nested in a Phase II, single-center, double-blind TB treatment trial in Rio de Janeiro, Brazil [14]. The aims of the treatment trial were to evaluate and compare the antimicrobial activity of two daily TB treatment regimens administered during the first 8 weeks of treatment in patients with pulmonary TB. The control treatment arm was comprised of isoniazid, rifampin, pyrazinamide, and ethambutol (HRZE), and the experimental arm was comprised of isoniazid, rifampin, pyrazinamide, and moxifloxacin (HRZM). All drugs were given by directly observed therapy (DOT) five days per week. For the treatment trial, the primary endpoint was sputum culture status (positive or negative for *M. tuberculosis*) at completion of 8 weeks of treatment. All participants in the treatment trial were eligible for participation in the T-SPOT.TB diagnostic study. Blood for the T-SPOT.TB assay was collected just prior to initiation of TB therapy (week 0, baseline) and at 16 and 24 weeks of treatment. The treatment and diagnostic studies were approved by the ethics review

boards of the Johns Hopkins University School of Medicine and the Hospital Universitario Clementino Fraga Filho in Rio de Janeiro, Brazil.

Participants

Subjects were adults with smear positive, culture-confirmed pulmonary TB that was susceptible to all of the treatment drugs. Additional inclusion criteria were documented HIV status (positive or negative), no history of prior TB treatment, and Karnofsky performance status score 70 or greater. Subjects were excluded if they had only extrapulmonary TB, were being treated with HIV-1 protease inhibitors, were pregnant or breastfeeding, had AST > 3 times normal, total bilirubin > 2.5 times normal, creatinine > 2 times normal, hemoglobin < 7.0 g/dL, potassium < 3.5 mEq/L, or platelet count < 50,000/mm³. Upon initiation of the T-SPOT.TB substudy, all subjects enrolled into the parent treatment trial were co-enrolled in the TSPOT-TB study until completion of the treatment trial.

Study evaluations

Enumeration of RD1-specific T cells

Whole venous blood was drawn into 8 ml CPT tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) at weeks 0, 16, and 24 of TB treatment. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by centrifugation, washed twice, resuspended in Recovery™ cell culture freezing media (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), and frozen in liquid nitrogen until T-SPOT.TB testing. Just prior to testing, samples were thawed; twice, AIM V medium (Gibco, Invitrogen) was added and the samples were centrifuged. The PBMC pellet was resuspended in AIM V medium, and T-SPOT.TB assays using 8-well strips were performed according to the manufacturer's instructions.[15] For an individual study subject, all frozen samples were thawed and tested at one time, such that the final specimen (the 24 week specimen) was frozen for a minimum of 30 days. The assay included nil control, ESAT-6-derived peptide (Panel A), CFP-10-derived peptide (Panel B), and positive control wells. SFCs were enumerated on-site using a hand-held magnifying glass. As per the manufacturer's instructions, for ESAT-6 and for CFP-10, a test was scored as qualitatively reactive if either: (1) for nil control of 0–5 SFCs, the antigen well SFC count minus the nil control SFC count was ≥ 6 ; or (2) for nil control of > 5 SFCs, the antigen SFC count was ≥ 2 times the nil control SFC count. Overall, a T-SPOT.TB test was considered reactive if either ESAT-6 or CFP-10 was reactive, or considered nonreactive if both ESAT-6 and CFP-10 were nonreactive. The number of ESAT-6-specific SFCs was calculated by subtracting the nil control SFC count from the Panel A SFC count; the number of CFP-10-specific SFCs was calculated by subtracting the nil control SFC count from the Panel B SFC count. The resulting ESAT-6 and CFP-10 values were sum-

mated to give the total RD1 SFC count. Those wells with too-numerous-to-count SFCs were assigned a value of 400 which approximates the upper limit of quantification. The technologist performing the TSPOT-TB assays was not aware of patients' clinical or microbiological status.

Mycobacterial culture

For each subject, sputa were collected weekly through week 8, then monthly. Specimens were digested and decontaminated using the Nalc-NaOH method, and resuspended in 2.0 mL of phosphate buffer. Two 0.2 ml portions of resuspended sediment were plated onto Löwenstein-Jensen medium and incubated at 37 °C for up to 8 weeks. For positive cultures, species identification was performed using conventional biochemical methods.

Statistical analyses

To determine whether or not overall SFC counts changed over time with TB treatment, we compiled T-SPOT.TB results from baseline, 16 weeks of treatment, and 24 weeks of treatment. To compare SFC counts between those with positive and negative sputum cultures at treatment week 8 and to compare SFC counts between those with and without cavitory disease, we performed a longitudinal data analysis. To model the dependency resulting from repeated measures, and given that SFC counts represented overdispersed count data, the data were analyzed using a marginal model with negative binomial approach with generalized estimating equation methods (GEE).[16] We chose an independent correlation structure with robust standard errors for the GEE models, as quantitative statistical comparisons of fit showed that this correlation structure provided the best fit. Negative binomial regression models were used to analyze differences in SFC counts between groups at treatment week 24. Sign-rank tests were used to compare SFC counts before and after treatment. Two-sided alpha levels of 0.05 were used to determine statistical significance in all analyses. Statistical analyses were performed using STATA statistical software (StataCorp, College Station, Texas).

Results

Demographic and clinical characteristics of study participants

During the T-SPOT.TB study period, 73 individuals were enrolled in the TB treatment trial. Among these 73 subjects, 11 had no baseline T-SPOT.TB result and 4 had only a baseline T-SPOT.TB result; these 15 subjects were excluded from the analysis. The remaining 58 patients had at least two blood samples collected, including a baseline sample, and were included in the analysis.

Table 1 shows the baseline characteristics of the study population. Only one subject was HIV-infected (CD4 426 cells/mm³); ESAT-6 and CFP-10 spot forming counts for

Table 1: Baseline characteristics of the study population.

	Total (n = 58)
Characteristic	
Mean age in years (SD)	33.4 (10.8)
Male (%)	36 (62.1)
Baseline weight in kg (SD)	55.7 (9.1)
Cavitory disease** (%)	41 (70.7)
Diabetes mellitus (%)	10 (17.2)
Assigned to HRZM treatment arm (%)	31 (54.4)
HIV-positive (%)	1 (1.7)†

*cavitory disease on baseline chest radiograph

† CD4 = 426 cells/mm³

SD, standard deviation

HRZE, combination treatment with isoniazid+rifampin+pyrazinamide+moxifloxacin.

this patient were 14 and 99 at week 0, 4 and 77 at week 16, and 8 and 63 at week 24, resulting in a qualitatively reactive test at all time-points. Sensitivity of the T-SPOT.TB test, as measured by baseline reactivity of frozen samples, was 72.4% (95% CI 59–83%).

Association between SFC counts and severity of TB disease at baseline

To determine whether or not SFC counts were higher among those with more severe TB, we evaluated the association between SFC counts and two markers of disease severity at baseline – cavitory lung disease and low body mass index (BMI). For ESAT-6, those with cavitory disease had, on average, 2.08 times higher SFC counts than those without cavitory disease (95% confidence interval for the incidence rate ratio [IRR] 1.06 to 4.10, $p = 0.034$), but CFP-10 SFC counts did not differ between the two groups ($p = 0.64$). There was no association between baseline BMI and either ESAT-6 or CFP-10 SFC counts ($p = 0.48$ and 0.48, respectively).

SFC counts over time during TB treatment

As shown in Figure 1, mean SFC counts declined over 24 weeks for ESAT-6, CFP-10, and summed RD1. Mean (SD) ESAT-6 SFC declined by 22.2 (62.9) over 24 weeks ($p = 0.01$ by signrank test), but CFP-10 SFC declined, on average, by only 8.9 (41.2) over 24 weeks ($p = 0.18$).

Table 2 shows the percent of study subjects having a reactive qualitative result for ESAT-6, CFP-10, and RD1 at the three time-points. Using qualitative results, there were no significant trends over time, and no differences between percentages of subjects positive by ESAT-6 versus by CFP-10 at any of the time-points. Of 42 individuals who had a reactive baseline test, 40 were retested at week 24; of these 40, 4 (10%) had a non-reactive T-SPOT.TB test at week 24.

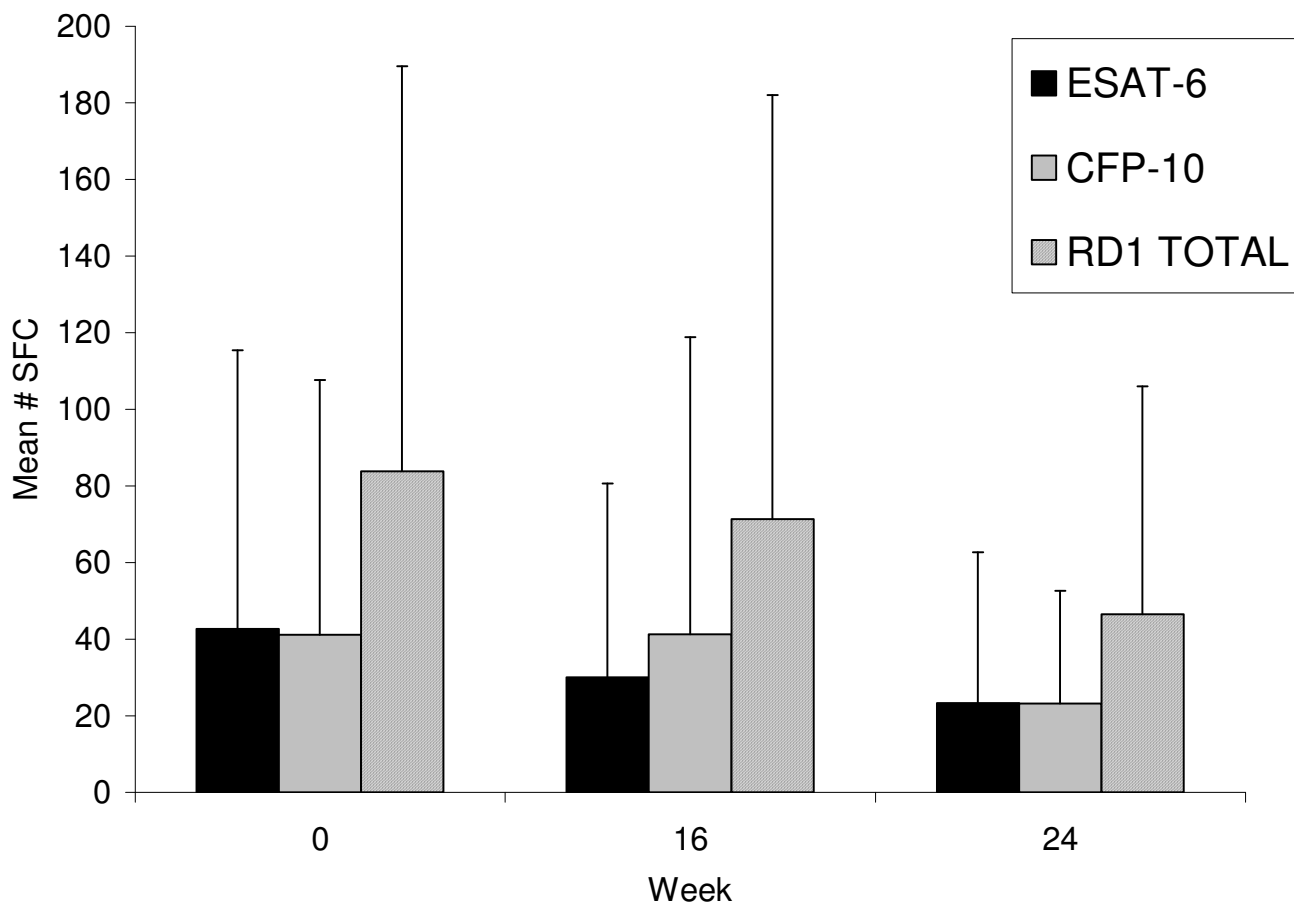


Figure 1
Mean ESAT-6, CFP-10, and summed RD1 specific spot forming cells at weeks 0 (baseline), 16, and 24 for all study participants (n = 58). SFC, spot forming cells. Vertical bars represent standard deviations of the means.

SFC counts among patients who were sputum culture positive versus negative at completion of 8 weeks of TB treatment

Next, we compared SFC counts between individuals who remained sputum culture positive at completion of 8 weeks of treatment and individuals who were sputum culture negative at completion of 8 weeks of treatment. Forty-eight (82.8%) of 58 individuals were culture negative at 8 weeks, and 10 (17.2%) of 58 remained culture positive. As shown in Figure 2, individual participant RD1 SFC response profiles demonstrated large intersubject and intrasubject variability. Mean SFC counts are shown in Figure 3. Compared with subjects having negative culture results, culture positive subjects had higher mean SFC counts at all time points and for both ESAT-6 and CFP-10. Mean ESAT-6 SFC count was on average 2.23 times higher for the group that was culture positive at completion of 8 weeks of treatment than for the group that was culture negative (IRR 95% CI 1.01 to 4.93, p = 0.048). The mean

CFP-10 SFC count was on average 1.51 times higher for the culture positive group compared to the culture negative group, but this difference did not reach statistical significance (IRR 95% CI 0.80 to 2.85, p = 0.20). The mean RD1 SFC count was on average 1.83 times higher for the culture positive group compared to the culture negative group (IRR 95% CI 1.01 to 3.33, p = 0.047); the rate of decline did not differ between the two groups (p = 0.54). At completion of 24 weeks of therapy, the culture positive group had ESAT-6 and CFP-10 counts that were 2.27 (IRR 95% CI 0.82 to 6.31) and 2.36 (IRR 95% CI 0.92 to 6.04) times higher than the culture negative group, but neither of these differences reached statistical significance.

Using qualitative results (Table 2), compared with culture negative subjects, slightly higher percentages of culture positive subjects had ESAT-6 or CFP-10 results classified as reactive at weeks 0, 16, and 24, but differences were not statistically significant.

Table 2: Qualitative T-SPOT. TB results: % of subjects having a reactive test, stratified by stimulatory antigen and by culture results at completion of 8 weeks of TB treatment

	Week 0	Week 16	Week 24
ESAT-6			
All subjects	56.9	58.9	53.7
Culture positive	60.0	77.8	60.0
Culture negative	56.3	55.3	52.3
CFP-10			
All subjects	55.2	58.9	59.3
Culture positive	60.0	77.8	60.0
Culture negative	54.2	55.3	59.1
RD1			
All subjects	72.4	78.6	75.9
Culture positive	70.0	88.9	70.0
Culture negative	72.9	76.6	77.3

Discussion

There has been considerable debate about the immune response to *M. tuberculosis* and correlates of bacterial containment in the human host. It has been postulated that active TB infection is immunosuppressive and that treatment of TB would lead to improved immune function and an increase in antigen-specific IFN- γ production by T cells.[17] Our data support an alternate hypothesis that treatment leads to decreased antigen burden and, in turn, diminished frequency of circulating antigen-specific T cells. In this regard, our findings are consistent with those of several prior studies using precommercial RD1-based interferon gamma release ELISPOT assays. [1,4,18,19] Specifically, Pathan et al. used an RD1-specific ELISPOT assay to evaluate kinetics of T cell responses in 12 active TB patients undergoing treatment.[1] They observed an average 38% decrease in SFCs over a mean follow-up period of 18.6 weeks. Aiken et al. showed that 55% of treated pulmonary TB patients had negative ESAT-6/CFP-10 ELISPOT tests one year after treatment initiation.[19] Some studies using precommercial assays, however, have demonstrated persistently high or positive RD1-specific ELISPOT test results even after treatment; multiple technical or environmental factors may affect assay performance characteristics.[20,21] One study using the commercially-available T-SPOT.TB comparing patients early in their TB treatment to patients late in their TB treatment showed significantly higher positive T-SPOT.TB proportions in the early-treatment group (83% vs. 17%).[22]

Our findings add strength to the hypothesis that SFC counts directly reflect bacillary burden and, importantly, used the commercially available T-SPOT.TB assay. Mean ESAT-6 and summed RD1 SFC counts were statistically significantly higher in the group with positive sputum cultures at week 8 compared with the group having negative

sputum cultures at week 8. These differences were apparent at baseline (time 0), and overall rates of decline in RD1 SFC counts did not differ between groups. These data suggest that higher SFC counts in those with positive sputum culture results at week 8 resulted from higher pre-treatment bacillary burdens of *M. tuberculosis* rather than from a slower decline in SFC counts during treatment. In addition, there was an association between ESAT-6 SFC count and presence of lung cavitation – a manifestation of TB disease usually characterized by high bacillary burden.

Additional studies of *M. tuberculosis* exposure, progression from latent to active TB, and treatment of latent TB also support the hypothesis that quantitative ELISPOT readout reflects mycobacterial burden. Specifically, Hill et al. found that, in individuals with positive ELISPOT responses to ESAT-6 and CFP-10, quantitative ELISPOT responses to PPD reflected the infectious load of *M. tuberculosis* as a result of recent exposure.[23] Richeldi et al. reported a newborn child exposed to TB – ELISPOT results turned positive at age 6 months, and were approximately 10-fold higher at age 24 months when the child developed overt TB disease.[24] In another case report, a rising ELISPOT count heralded progression to active TB in a patient with known latent TB.[25] With respect to treatment of latent TB, Ewer et al. used an RD1-specific ELISPOT assay to evaluate kinetics of T cell responses in individuals presumably recently infected with *M. tuberculosis* in the context of a point-source school-associated TB outbreak.[26] Tuberculin skin test-positive students treated with a three-month course of isoniazid and rifampin had an average 68% decline per year in frequencies of RD1 specific SFCs, but no change in frequencies of these cells was observed in untreated individuals. Chee et al. recently demonstrated that among individuals undergoing treatment for latent TB infection, treatment had a significant effect on response to CFP-10 but not on response to ESAT-6 as measured by the T-SPOT.TB assay.[27]

While our results and those of others indicate that immunologic responsiveness as measured by RD1-based interferon gamma release ELISPOT assays is dynamic during the course of *M. tuberculosis* disease and its treatment, our results indicate that the test's utility in evaluating or predicting treatment response in individual patients appears poor. Our results do not support this test's use as an early surrogate marker for treatment response in clinical trials. While overall SFC counts declined over the course of treatment, individual patient response profiles (mapping SFC counts over time) were highly variable in our study. Furthermore, the proportion of patients with positive qualitative test results was not different between groups and did not decline over time during treatment. Further studies evaluating this test in subgroups, such as HIV-seropos-

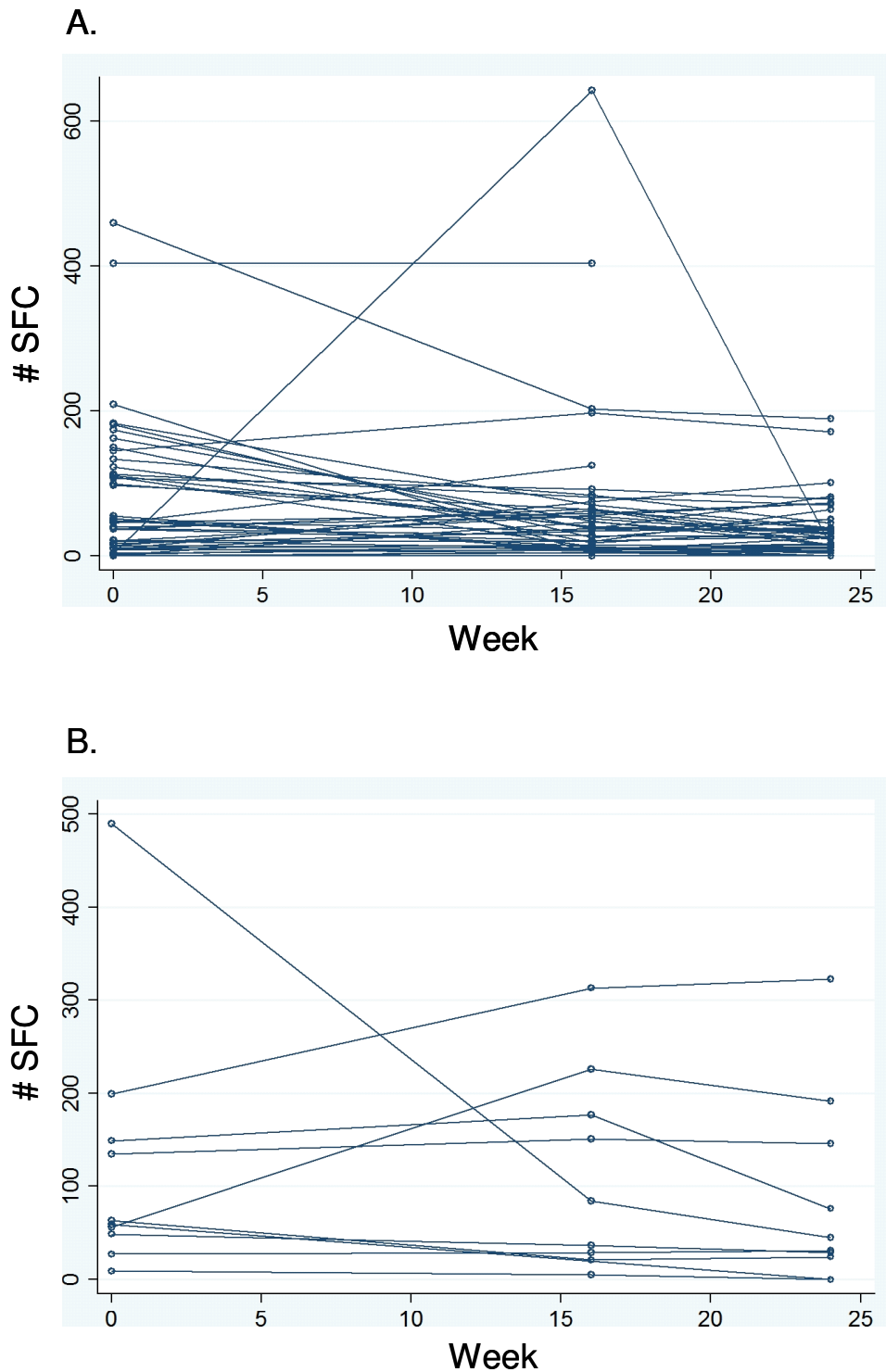


Figure 2
Individual patient RDI spot forming cell response profiles over 24 weeks of TB treatment for individuals having a negative sputum culture for *M. tuberculosis* at completion of 8 weeks of TB treatment (PANEL A, n = 48), and for individuals having a positive sputum culture at completion of 8 weeks of TB treatment (PANEL B, n = 10). SFC, spot forming cells.

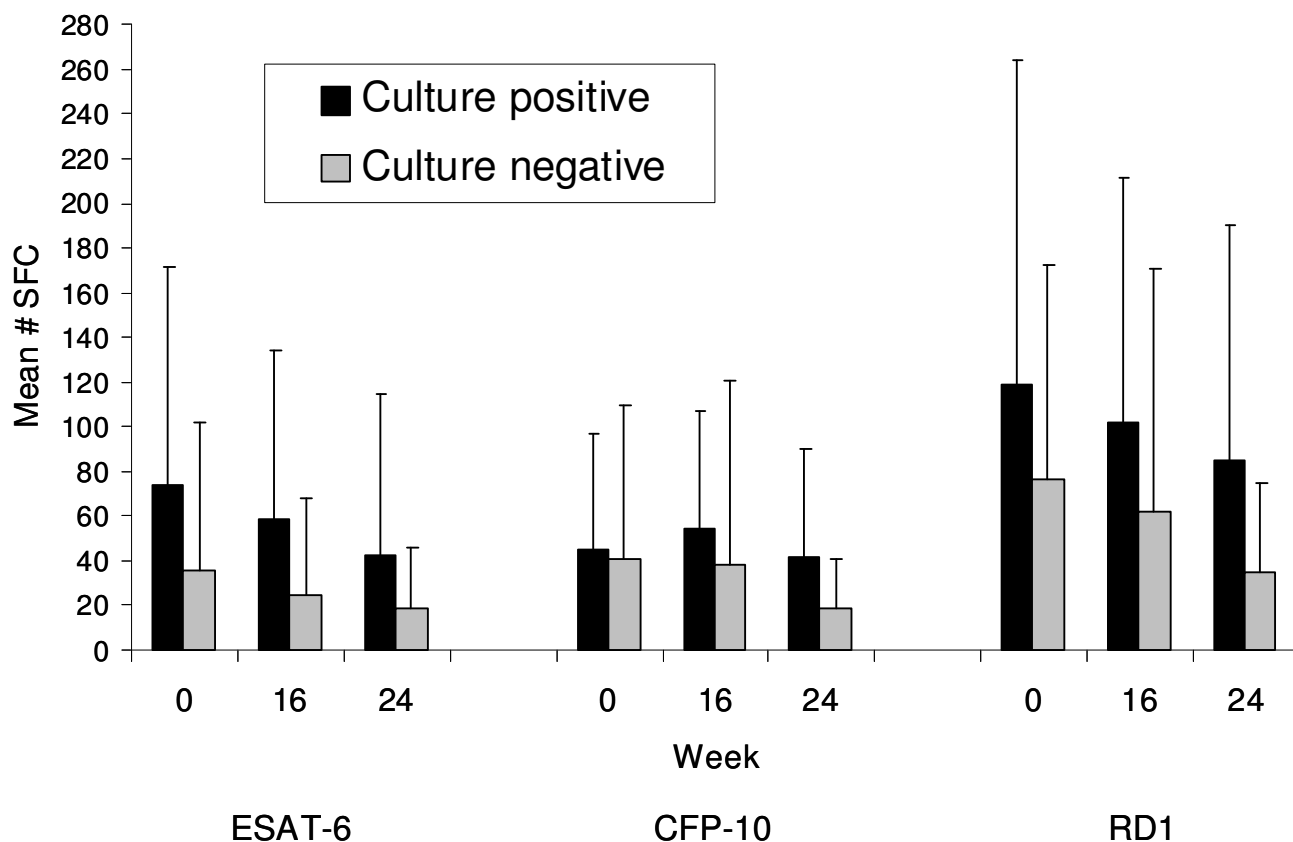


Figure 3
Mean ESAT-6, CFP-10, and summed RD1 specific spot forming cells at weeks 0 (baseline), 16, and 24 for individuals having a positive sputum culture for *M. tuberculosis* at completion of 8 weeks of TB treatment (SOLID BARS, n = 10), and for individuals having a negative sputum culture at completion of 8 weeks of TB treatment (HATCHED BARS, n = 48). SFC, spot forming cells. Vertical bars represent standard deviations of the means.

itive patients or patients with solely extrapulmonary disease, may help determine the utility of this test in these special populations. The utility of an RD1-based interferon gamma release ELISPOT assay in combination with other immunologic tests to evaluate treatment response also remains to be studied.

Our study has important limitations. First, we used frozen cells for cost reasons. Freeze-thaw processes may have diminished T cell reactivity, and this could account for the lower-than-expected baseline sensitivity of the T-SPOT.TB assay. We cannot exclude the possibility that frozen samples that were stored longest before testing (i.e., baseline samples) could have been most affected by storage and might have given spuriously low results; this could have diminished our ability to detect a decrease in assay responses with treatment. The effects of prolonged freezing could be studied by dividing samples into two aliquots, with one aliquot tested immediately and the other frozen for later testing. Second, we compared T-SPOT.TB

to a surrogate marker—sputum culture status at completion of eight weeks of treatment—and not to the accepted gold standard of durable TB cure without relapse after treatment. This was done for efficiency and convenience in our study but highlights the need and provides rationale for additional studies of T-SPOT.TB responses during long-term follow-up after completion of TB treatment. In our study, only 10% of subjects with a reactive T-SPOT.TB test at baseline had a nonreactive test at completion of 24 weeks of treatment. Aiken et al. showed that 55% of treated pulmonary TB patients had negative ESAT-6/CFP-10 ELISPOT tests one year after treatment initiation.[18] It remains to be seen whether, after successful TB treatment, SFC counts return to zero in a substantial majority of patients at time points beyond one year. If this were the case, the test might have utility in predicting or diagnosing relapsed or recurrent TB disease. In our study, there were no subjects with recognized TB treatment failure, and therefore we were not able to evaluate T-SPOT.TB responses in this important clinical scenario. We were also

unable to assess the kinetics of T cell responses early in treatment, as funding limitations precluded the performance of an 8-week TSPOT-TB test. Of note, current manufacturer instructions in the U.S. FDA-approved T-SPOT.TB assay classify those with spot counts of 5, 6, or 7 as borderline and recommend retesting. Retesting was not done for three individuals in our study who had spot counts of 5 at baseline, as manufacturer instructions at the time of our study classified them as negative. Using the current classification system, two of the three had positive results upon completion of treatment while one had a negative result, resulting in no substantive change in our overall results or conclusions.

On the other hand, our study has several strengths. First, the lab study was undertaken in a setting in which TB treatment (under direct observation), sputum monitoring, and subject follow-up were standardized and rigorous. In addition, the T-SPOT.TB laboratory technologist was not aware of patient status, thereby reducing potential bias. Finally, for each study subject, all T-SPOT.TB specimens were thawed and tested at the same time, thereby reducing the impact of potential unrecognized time-related differences in study procedures.

Conclusion

In conclusion, the correlation between ESAT-6 SFC counts and cavitation on baseline chest radiograph, the decline in SFC counts during treatment, and the observed differences in SFC counts between the group having positive 8-week cultures versus the group having negative 8-week cultures indicate that IFN- γ -producing RD1-specific T cells, as measured by the T-SPOT.TB assay, may be directly related to bacterial load in individuals undergoing treatment for pulmonary TB. However, high inter-patient variability in quantitative results as well as lack of reversion to negative of qualitative results in patients at the time of treatment completion, may limit the utility of this test as an early surrogate marker for treatment response. Longitudinal studies with long-term patient follow-up are warranted in order to determine the utility of the T-SPOT.TB test for detecting relapse after TB treatment.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SED conceived of and designed the study and helped to draft the manuscript. KD performed the statistical analyses and drafted the manuscript. NB, MBC, and REC assisted with study design, interpretation of results, and manuscript preparation. SR performed the TSPOT.TB laboratory assays. JH, AE, and CL coordinated the study and recruited study participants. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

T-SPOT.TB assay kits were generously supplied by Oxford Immunotec Ltd. This study was supported by grants from the National Institutes of Health (AI51528 to S. Dorman), the United States Agency for International Development (to S. Dorman), the United States Food and Drug Administration (FD-R2135 to R. Chaisson), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (E-26/100.653/2007 to M. Conde).

The authors thank Jose R. Lapa e Silva for support and assistance with equipment and supplies, and Patricia Lago for assistance with performance of the T-SPOT.TB assays.

References

1. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G, Hill AV, Lalvani A: **Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment.** *J Immunol* 2001, **167(9)**:5217-5225.
2. Mantegani P, Piana F, Codecasa L, Galli L, Scarpellini P, Lazzarin A, Cirillo D, Fortis C: **Comparison of an in-house and a commercial RD1-based ELISpot-IFN-gamma assay for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection.** *Clin Med Res* 2006, **4(4)**:266-272.
3. Goletti D, Butera O, Bizzone F, Casetti R, Girardi E, Poccia F: **Region of difference 1 antigen-specific CD4+ memory T cells correlate with a favorable outcome of tuberculosis.** *J Infect Dis* 2006, **194(7)**:984-992.
4. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV: **Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163(4)**:824-828.
5. Goletti D, Carrara S, Vincenti D, Saltini C, Rizzi EB, Schinina V, Ippolito G, Amicosante M, Girardi E: **Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study.** *Clin Microbiol Infect* 2006, **12(6)**:544-550.
6. Wang J, Chou C, Lee L, Hsu H, Jan I, Hsueh P, Yang P, Luh K: **Diagnosis of tuberculosis by an enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:553-558.
7. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T: **Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005, **24(8)**:529-536.
8. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, Deeks J, Pathan AA, Lalvani A: **Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study.** *Lancet* 2004, **364(9352)**:2196-2203.
9. Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, Ewer K, Prakash M, Klenerman P, Maskell N, Davies R, Pasvol G, Lalvani A: **Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis.** *Clin Infect Dis* 2005, **40(1)**:184-187.
10. Richeldi L, Luppi M, Losi M, Luppi F, Potenza I, Roversi P, Cerri S, Millington K, Ewer K, Fabbri L, Torelli G, Lalvani A: **Diagnosis of occult tuberculosis in hematological malignancy by enumeration of antigen-specific T cells.** *Leukemia* 2005:1-3.
11. Zellweger JP, Zellweger A, Ansermet S, de Senarclens B, Wrighton-Smith P: **Contact tracing using a new T-cell-based test: better correlation with tuberculosis exposure than the tuberculin skin test.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, **9(11)**:1242-1247.
12. Richeldi L, Ewer K, Losi M, Bergamini BM, Roversi P, Deeks J, Fabbri LM, Lalvani A: **T cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **170(3)**:288-295.
13. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, Monk P, Lalvani A: **Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak.** *Lancet* 2003, **361(9364)**:1168-1173.
14. Conde MB, Efron AR, Loredi C, Muzy de Souza GR, Graça NP, Cezar MC, Ram M, Chaudhary MA, Bishai WR, Kritski AL, Chaisson RE:

- Moxifloxacin in the initial therapy of tuberculosis : a randomized, phase 2 trial.** *Lancet* in press.
15. Anonymous: **T-SPOT.TB An aid in the diagnosis of tuberculosis infection: visual procedure guide for in vitro diagnostic use,** Oxford Immunotec. 2005.
 16. Zeger SL, Liang KY: **Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes.** *Biometrics* 1986, **42(1)**:121-130.
 17. Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, Wallis RS, Edmonds K, Okwera A, Mugerwa R, Peters P, Ellner JJ: **Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy.** *J Infect Dis* 1999, **180(6)**:2069-2073.
 18. Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N, Amicosante M, Girardi E, Goletti D: **Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy.** *Clin Infect Dis* 2004, **38(5)**:754-756.
 19. Aiken AM, Hill PC, Fox A, McAdam KP, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Donkor SA, Adegbola RA, Brookes RH: **Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases.** *BMC Infect Dis* 2006, **6**:66.
 20. Ferrand RA, Bothamley GH, Whelan A, Dockrell HM: **Interferon-gamma responses to ESAT-6 in tuberculosis patients early into and after anti-tuberculosis treatment.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, **9(9)**:1034-1039.
 21. Ulrichs T, Anding R, Kaufmann SH, Munk ME: **Numbers of IFN-gamma-producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2000, **4(12)**:1181-1183.
 22. Dheda K, Pooran A, Pai M, Miller RF, Lesley K, Booth HL, Scott GM, Akbar AN, Zumla A, Rook GA: **Interpretation of Mycobacterium tuberculosis antigen-specific IFN-gamma release assays (T-SPOT.TB) and factors that may modulate test results.** *J Infect* 2007, **55(2)**:169-173.
 23. Hill PC, Fox A, Jeffries DJ, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Owiafe PK, Donkor SA, Hammond AS, Corrah T, Adegbola RA, McAdam KP, Brookes RH: **Quantitative T cell assay reflects infectious load of Mycobacterium tuberculosis in an endemic case contact model.** *Clin Infect Dis* 2005, **40(2)**:273-278.
 24. Richeldi L, Ewer K, Losi M, Bergamini BM, Millington K, Fabbri LM, Lalvani A: **T-cell-based diagnosis of neonatal multidrug-resistant latent tuberculosis infection.** *Pediatrics* 2007, **119(1)**:e1-5.
 25. Adetifa IM, Brookes R, Lugos MD, de Jong BC, Antonio M, Adegbola RA, Hill PC: **Rising ELISPOT count prior to the onset of symptoms of full-blown tuberculosis disease.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2007, **11(3)**:350-352.
 26. Ewer K, Millington KA, Deeks JJ, Alvarez L, Bryant G, Lalvani A: **Dynamic antigen-specific T-cell responses after point-source exposure to Mycobacterium tuberculosis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **174(7)**:831-839.
 27. Chee CB, KhinMar KW, Gan SH, Barkham TM, Pushparani M, Wang YT: **Latent tuberculosis infection treatment and T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **175(3)**:282-287.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/23/prepub>

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



The challenge of pediatric tuberculosis in face of new diagnostic techniques

O desafio da tuberculose na faixa etária pediátrica frente a novas técnicas diagnósticas

Flavio R. Sztajnbok¹, Neio L. Boechat², Denise C. N. Sztajnbok³,
Samantha Brum Ribeiro⁴, Sheila K. F. Oliveira⁵, Clemax C. Sant'Anna⁶

Resumo

Objetivo: Apresentar uma revisão atualizada sobre os novos métodos para o diagnóstico da tuberculose baseados na produção *in vitro* de interferon-gama (IFN- γ) por células T dos pacientes sob investigação, comparando-os com a tradicional prova tuberculínica.

Fontes dos dados: Revisão de literatura utilizando os bancos de dados MEDLINE e LILACS (2000-2008) utilizando as palavras-chave tuberculose, interferon-gama, quantiFERON, ELISPOT e T-SPOT.TB.

Síntese dos dados: Esses novos testes mostraram-se, de um modo geral, tão ou mais sensíveis e específicos que a prova tuberculínica, tanto em adultos como em crianças e imunossuprimidos, para o diagnóstico da infecção latente e da doença ativa, apresentando vantagens como a menor interferência da vacinação prévia pelo BCG, menor influência de estados anérgicos e melhor acurácia em crianças menores. Nos Estados Unidos, já estão sendo utilizados em substituição à prova tuberculínica, e apesar dos custos ainda elevados, a Organização Mundial de Saúde vai priorizar a sua viabilidade econômica.

Conclusões: Sempre levando em conta a importância da história clínica e epidemiológica, os novos testes baseados na produção de IFN- γ apresentam resultados promissores e deverão ser considerados na investigação de tuberculose em qualquer paciente, mas especialmente nos grupos de risco, como as crianças e os imunossuprimidos.

J Pediatr (Rio J). 2009;85(3):183-193. Tuberculose, interferon-gama, quantiFERON, ELISPOT, crianças, imunossupressão.

Abstract

Objectives: To present an updated review concerning new assays for diagnosing tuberculosis based on *in vitro* interferon-gamma production by host T cells, and compare them with tuberculin skin test.

Sources: A literature review was carried out based on Medline and LILACS databases (2000-2008) searching for the following keywords: tuberculosis, interferon-gamma, quantiFERON, ELISPOT and T-SPOT.TB.

Summary of the findings: These new assays proved to have, in general, equal or superior sensitivity and specificity than the tuberculin skin test not only in adults but also in children and immunosuppressed patients for the diagnosis of both latent tuberculosis infection or active disease, with some advantages such as less cross-reactivity as a result of previous BCG vaccination, less influence of anergy and better accuracy in small children. In the United States, these assays have been used instead of the tuberculin skin test and, although still very expensive, the World Health Organization will be making its economic viability a priority.

Conclusions: Always having in mind the importance of clinical and epidemiological histories, these new assays based on interferon-gamma release present promising results and should be considered in tuberculosis investigation procedures for all patients, however with a special concern in the risk groups (i.e., children and immunosuppressed patients).

J Pediatr (Rio J). 2009;85(3):183-193. Tuberculosis, interferon-gamma, quantiFERON, ELISPOT, children, immunosuppression.

1. Professor assistente, Pediatria, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ. Responsável, Setor de Reumatologia, Núcleo de Estudos da Saúde do Adolescente, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ. Professor adjunto, Reumatologia Pediátrica, Universidade do Grande Rio Prof. José de Souza Herdy (UNIGRANRIO), Rio de Janeiro, RJ.
2. Professor adjunto, Clínica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.
3. Professora assistente, Pediatria, UERJ, Rio de Janeiro, RJ.
4. Responsável, Setor de Biologia Molecular, Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. Mestranda, Clínica Médica, HUCFF-UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.
5. Professora associada, Pediatria, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. Chefe, Serviço de Reumatologia Pediátrica, Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.
6. Professor associado, Pediatria, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. Médico, Serviço de Pneumologia Pediátrica, Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

Fonte financiadora: Este trabalho teve o apoio financeiro da FAPERJ (processo E26/170.759/2007).

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Como citar este artigo: Sztajnbok FR, Boechat NL, Sztajnbok DC, Ribeiro SB, Oliveira SK, Sant'Anna CC. The challenge of pediatric tuberculosis in face of new diagnostic techniques. *J Pediatr (Rio J)*. 2009;85(3):183-193.

Artigo submetido em 25.08.08, aceito em 17.09.08.

doi: 10.2223/JPED.1893

Introdução

A tuberculose (TB) continua sendo um desafio de saúde pública. Em países em desenvolvimento, as condições sanitárias e socioeconômicas facilitam e predispõem à sua disseminação e, em países desenvolvidos, o ressurgimento da doença coincide com os grandes fluxos migratórios e com o surgimento da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), além do problema da TB multirresistente. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e que, em sua maioria, tal infecção fique latente em indivíduos com seu sistema imunológico competente^{1,2}. A TB latente pode persistir por muitos anos, com risco de evolução para doença ativa em cerca de 10% na população geral. A TB representa importante causa de morbimortalidade, principalmente em pacientes imunossuprimidos, e ainda é considerada a maior causa de óbitos por doença infecciosa em adultos^{3,4}.

Enfermidades que cursam com imunossupressão como a AIDS, doenças difusas do tecido conjuntivo, doenças mieloproliferativas, neoplasias, diabetes e outras condições (desnutrição, idade avançada), assim como o uso de medicações imunossupressoras, podem levar a uma resposta imunológica menos efetiva contra a TB. Haverá, então, menor produção de citocinas, como o interferon-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), que têm importante papel na resposta imunológica contra o *Mycobacterium tuberculosis*⁵⁻⁹ e possível ausência de resposta à prova tuberculínica (PT), dificultando o diagnóstico da enfermidade. Nos pacientes imunossuprimidos, a PT pode apresentar sensibilidade mais baixa quando comparada a pacientes com sistema imunológico íntegro, dificultando e postergando o diagnóstico de TB^{10,11}. Como não há um teste confirmatório para o diagnóstico da TB latente ou da doença ativa sem cultura positiva, a PT ainda é considerada a ferramenta mais adequada. Embora apresente várias limitações, o verdadeiro padrão-ouro para diagnóstico da infecção seria a comprovação da evolução para doença, só possível em estudos longitudinais. O encontro de culturas positivas para o *Mycobacterium tuberculosis* seria o padrão-ouro para o diagnóstico da doença em atividade^{12,13}. Em relação à infecção latente, não há como prever que pacientes evoluirão para a doença em atividade.

Na faixa etária pediátrica, principalmente em crianças menores de 3 anos, a TB é frequentemente mais grave do que em adultos e, comparativamente, ocorre maior porcentagem de acometimento extrapulmonar e formas disseminadas. Amostras de material para cultura em crianças são frequentemente difíceis de serem obtidas, e os resultados muitas vezes são negativos. Há dificuldade para o diagnóstico de certeza, levando a casos não diagnosticados ou diagnosticados erroneamente. A PT parece apresentar baixa sensibilidade na faixa etária pediátrica, e sua negatividade não exclui a doença ativa. A criança pode evoluir para a doença ativa pouco tempo depois da infecção latente e, por isso, o diagnóstico precoce é crucial para a adoção de medidas preventivas¹⁴.

O diagnóstico precoce e preciso da TB representa, por si só, um passo importante, enquanto uma nova vacina que previna realmente a doença não estiver disponível. Várias novas técnicas diagnósticas bacteriológicas e moleculares

têm sido estudadas, como técnicas de PCR (*polymerase chain reaction*) mais sensíveis, testes para detecção microscópica e susceptibilidade a drogas (*Microscopic Observation for Detection and Susceptibility*, MODS) e novos meios de cultura, todos com informações escassas na área pediátrica. Recentemente, testes *in vitro* utilizando sangue total foram desenvolvidos no intuito de auxiliar o diagnóstico da TB latente, mostrando-se bastante promissores em pesquisas que envolvem a infecção tuberculosa latente e sua epidemiologia, assim como na doença ativa^{13,14}. Tais testes baseiam-se na produção de IFN- γ por células T do hospedeiro expostas *in vitro* a antígenos mais específicos para o *Mycobacterium tuberculosis* que o antígeno derivado proteico purificado (*purified protein derivative* – PPD) da PT. São disponíveis comercialmente o QuantiFERON-TB Gold® (Cellestis LTD, Carnegie, Victoria, Austrália) e o T-SPOT.TB® (Oxford Immunotec, Oxford, Reino Unido). O QuantiFERON-TB Gold está disponível em forma de placa, já aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), ou tubo, ainda não aprovado, e avalia a quantidade de IFN- γ produzida pelas células T do paciente em contato com antígenos específicos pela técnica ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*). O T-SPOT.TB, também conhecido como ELISPOT (*enzyme linked immunospot assay*), conta o número de células T produtoras de IFN- γ quando também sensibilizadas com antígenos específicos, já tendo sido aprovado para uso pelas entidades reguladoras europeias, bem como pelo FDA^{11,15-17}. Esses testes apresentam boas sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de TB com vantagens sobre a PT, principalmente nos pacientes com algum grau de imunossupressão¹⁸⁻²¹.

O diagnóstico e o tratamento precoces da infecção tuberculosa, evitando sua evolução para a doença, são desafios a serem conquistados para o controle mundial da TB²². Novos métodos diagnósticos serão bem-vindos, especialmente quando direcionados a facilitar o diagnóstico de TB em grupos especiais, como crianças e pacientes imunossuprimidos. Para o ano de 2015, a OMS espera ter reduzido a prevalência e a taxa de mortalidade da doença para menos de 50% dos valores encontrados em 1990²³.

Epidemiologia da tuberculose no Brasil e no mundo

A TB humana é causada por micobactérias pertencentes ao chamado complexo *Mycobacterium tuberculosis* que inclui *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium tuberculosis*. A TB latente ou TB infecção pode ser definida como uma síndrome clínica causada pela exposição ao *Mycobacterium tuberculosis* seguida de infecção evidenciada pela presença de PT positiva, mas com ausência de sinais e sintomas clínicos e radiológicos de atividade de doença, já que existe uma resposta imunológica eficaz para controlar o crescimento da micobactéria. O bacilo permanece em estado quiescente no tecido afetado, há redução do metabolismo bacteriano mas nem sempre há erradicação do *Mycobacterium tuberculosis*²⁴. A evolução da infecção para doença ativa parece estar relacionada a alguns fatores de risco como idade (pessoas idosas e crianças) e pacientes com doenças ou condições imunossupressoras (coinfecção pelo HIV, doenças autoimunes, desnutrição, neoplasia, diabetes,

insuficiência renal crônica, dentre outras) ou, ainda, uso de medicações que interfiram na imunidade²⁵⁻²⁸. Na maioria dos casos, a infecção fica latente e o indivíduo se torna um reservatório para futuros casos, criando um grande problema epidemiológico²⁹. Nos EUA, estima-se que haja atualmente entre 9 e 14 milhões de indivíduos com infecção latente³⁰. No mundo, estima-se que cerca de 2 bilhões de pessoas estejam infectadas e, dessas, cerca de 8 milhões desenvolverão a doença e 2 milhões de pessoas morrerão anualmente, sendo que cerca de 100.000 óbitos ocorrerão na faixa etária pediátrica. Cerca de 95% dos casos novos e 98% de mortes ocorrem em países em desenvolvimento, onde o acesso ao sistema de saúde é mais precário e a infecção pelo HIV é mais frequente^{4,24,31}.

Cerca de 50% dos casos de TB registrados nas Américas encontram-se no Brasil e no Peru. O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/Ministério da Saúde), há a notificação de cerca de 85.000 casos novos anualmente (coeficiente de incidência de 47/100.000 habitantes), e houve uma média de 6.000 óbitos por ano no período entre 1980 e 2002. Em 2001, o Brasil apresentava uma taxa de mortalidade por TB de 3,07/100.000 habitantes. A média do coeficiente de incidência da doença em nosso país, entre os anos 1990 e 2001, foi de 48 casos novos por 100.000 habitantes, havendo 10 estados com taxas acima da média brasileira. O coeficiente de incidência por 100.000 habitantes em 2001 foi maior no grupo etário de 20 a 39 anos, onde alcançou 98,8, mas, na faixa etária pediátrica, principalmente nos adolescentes, que podem ter um comportamento epidemiológico semelhante aos adultos, este coeficiente não foi baixo (9,7 no grupo etário 0-4 anos; 5,3 no grupo 5-9 anos; 21,8 no grupo 10-19 anos). Ainda segundo dados do Sinan, no ano 2000, 4,2% dos casos notificados de TB ocorreram em idade inferior a 15 anos e 6,8% entre 15 e 19 anos, ou seja, 11% dos casos notificados ocorreram em crianças e adolescentes. No ano de 2005, esses dados foram respectivamente 3,7 e 6%, ou seja, 9,7% dos casos notificados de TB ocorreram na faixa etária pediátrica. Tais dados enfatizam a importância da doença no Brasil em termos de morbimortalidade e reforçam a necessidade do diagnóstico e tratamento corretos e precoces^{4,32}.

Imunologia e patogênese

O controle imunológico da TB inicia-se pela imunidade inata, através de barreiras físicas e pela ação dos macrófagos e células dendríticas. Esses determinam uma resposta celular à micobactéria predominantemente tipo Th1 com aumento da população CD4+ (que induz à produção de IFN- γ) e CD8+, que funciona plenamente após 2 a 6 semanas de infecção²⁴. De modo geral, há diferenças importantes entre adultos e crianças quanto à imunopatogenia da TB. Em crianças, verifica-se deficiência funcional de macrófagos e células dendríticas e um predomínio da resposta celular tipo Th2, com falta de células CD8+ e com a produção de interleucinas 4 e 5 pelas células CD4+^{33,34}. Isso pode ser uma explicação para o fato de que formas disseminadas e meníngeas de

TB sejam proporcionalmente mais frequentes em crianças abaixo de 1 ano de idade (20% contra menos de 1% em crianças mais velhas e adultos)³⁵. Crianças muito jovens estão mais sujeitas ao desenvolvimento de TB doença, devido à imaturidade do sistema imunológico (inato e adaptativo) e pelo tempo prolongado de contato com possíveis cuidadores bacilíferos. O aumento da susceptibilidade à TB nas crianças parece estar ligado a fatores como a diminuição da função dos macrófagos e da produção de algumas citocinas pelos mesmos (IL-10, TGF- β , TNF- α) e à diminuição da função de células dendríticas e da resposta celular CD4+³⁴. Linfócitos maternos normalmente não cruzam a placenta e estão presentes em pouca quantidade no leite materno. Os recém-nascidos e lactentes dependem de sua própria imunidade celular, que tende a amadurecer nos anos seguintes, para agir contra patógenos intracelulares, como no caso da TB^{14,36}.

A transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* é fundamentalmente pela via inalatória. As primeiras barreiras físicas e anatômicas são a tosse e o transporte muco-ciliar, que reduzem a chegada dos bacilos aos alvéolos terminais. Após chegando, a micobactéria encontrará mecanismos inatos adicionais de defesa do aparelho respiratório, como defensinas, lectinas, lectinas e complemento, que têm várias funções, como ativar a via do complemento, estimular a produção de citocinas e quemoquinas, permeabilizar e danificar a membrana dos germes e aglutinar ou opsonizar bactérias. Caso a micobactéria consiga ultrapassar essas barreiras, vai infectar primariamente os macrófagos e, então, ativá-los.

Os macrófagos ativados vão inibir o crescimento intracelular das micobactérias por mecanismos ainda não bem esclarecidos. Provavelmente ocorre apoptose de macrófagos infectados e produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas (IL) 12 e 18, que, de alguma forma, impedem a disseminação da bactéria^{24,37,38}. O TNF- α também é secretado por células T e as interleucinas 12 e 18 pelas células dendríticas. A micobactéria apresenta, no entanto, mecanismos de defesa: inibição da maturação do compartimento endossomal do macrófago infectado³⁹; estímulo à produção, pelos macrófagos infectados, de citocinas como o *transforming growth factor-beta* (TGF- β), que diminui a resposta imunológica (inativação de macrófagos, supressão da resposta celular à micobactéria), estimula o crescimento intracelular da bactéria e inibe a produção de TNF- α e IL-12 induzida pela micobactéria^{40,41}. Além disso, macrófagos infectados produzem IL-10, potente citocina anti-inflamatória que diminui a resposta celular, em parte por diminuir a produção de IL-12⁴². A IL-10 pode converter as células dendríticas em células macrófago-like, que têm a capacidade de inibir o crescimento intracelular da micobactéria, mas pouca capacidade de apresentar antígeno⁴³. Outra função da IL-10 é inibir a proliferação de células T CD4+ estimuladas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, e a produção de IFN- γ pelas mesmas⁴⁰. Em suma, as citocinas TNF e IL-12 promovem o controle imunológico da infecção, enquanto a IL-10 e o TGF- β inibem (*downregulation*) a resposta inata e adquirida na TB.

As células dendríticas também têm importante papel na imunopatogenia da TB e parecem ser um meio de comu-

nicação importante entre as imunidades inata e adquirida, uma vez que também têm a função de célula apresentadora de antígeno. Sua ativação, inicialmente, determina maior eficiência na fagocitose e macropinocitose na periferia, processamento do antígeno e exposição na sua superfície, culminado na ativação potente da resposta celular dirigida à micobactéria. Após essas etapas, há migração para os linfonodos, onde as células dendríticas perdem a capacidade fagocitária, mas tornam-se potentes células apresentadoras de antígeno capazes de estimular a imunidade celular prolongadamente³⁴. As células dendríticas localizadas no epitélio do aparelho respiratório e nas regiões interseptais dos pulmões são essenciais na manutenção da homeostase imunológica local. Aí existe a necessidade de manutenção de um *status* não-inflamatório, apesar da constante chegada de antígenos novos nesse local. As células dendríticas podem predispor a uma resposta celular Th1 ou Th2 pela secreção de IL-12 ou IL-10, respectivamente. Fisiologicamente, são responsáveis pelo predomínio da resposta Th2 nos pulmões, constantemente alvos de novos antígenos^{34,44}. Uma vez infectadas pela micobactéria, as células dendríticas produzem principalmente IL-12 e TNF- α , ambos muito importantes no controle da resposta imunológica na TB⁴². Assim, crianças muito jovens apresentam função de células dendríticas diminuída em relação a adultos, propiciando menor estímulo à resposta imunológica celular e a maior susceptibilidade à TB⁴⁵.

É controverso o papel da imunidade humoral na resposta imunológica na TB, embora crianças e adultos com TB usualmente apresentem hipergamaglobulinemia³⁴. Alguns estudos mostram que anticorpos específicos não proporcionam proteção adequada⁴⁶. Outros mostram que células B podem aumentar a proteção contra a micobactéria independentemente da produção de anticorpos, ou seja, tais células poderiam funcionar como apresentadoras de antígeno⁴⁷. Essa proteção poderia ser ratificada pela observação de que existe relação entre níveis mais altos de anticorpos com melhor prognóstico⁴⁸, porém Sant'Anna et al.⁴⁹ encontraram, em nosso meio, valores mais elevados de anticorpos correlacionando-se com maior gravidade da doença. Crianças com TB, no entanto, tendem a apresentar títulos menores que os adultos. Tais títulos tendem a aumentar proporcionalmente à idade e duração da doença, refletindo a maturação do sistema imunológico e a exposição prolongada à micobactéria^{50,51}.

O TNF- α tem papel importante na resposta imunológica ao *Mycobacterium tuberculosis* e na imunopatologia da doença⁸. Trata-se de uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos ativadas em resposta a vários estímulos, como lipopolissacarídeos e infecções virais e bacterianas⁵². O TNF- α também pode ser expresso por células T ativadas, células B, células NK (*natural killer*) e algumas células tumorais. Pode existir sob duas formas: solúvel e transmembrana. Suas principais ações são: atividades antitumoral e viral; mediação do choque e caquexia; e estímulo a apoptose, principalmente de macrófagos não mais eficientes, privando a micobactéria de um local de multiplicação⁸. O TNF, nas infecções micobacterianas em modelos animais, parece aumentar a capacidade dos macrófagos em fagocitar e matar os agentes agressores, além de induzir à formação do granuloma, que

limita a disseminação da micobactéria, gerando uma resposta imunológica eficaz^{8,53,54}. Assim, principalmente o TNF- α solúvel tem importante papel na coordenação e contenção da infecção micobacteriana, especialmente a nível pulmonar, já que o granuloma controla o crescimento e disseminação da micobactéria, limitando o dano tecidual⁸. O TNF- α parece também aumentar a apoptose dos neutrófilos locais e diminuir o dano tecidual inflamatório. Por inferência, o uso de agentes antiTNF- α resultará no acúmulo dessas células, em inflamação persistente e dano mais grave⁵⁵. A apoptose de macrófagos infectados pela micobactéria, mediada pela ação do TNF- α , é uma característica da resposta normal de formação do granuloma na TB^{56,57}. Por outro lado, o excesso de TNF- α parece estar associado a reações necrotizantes caseosas. Clinicamente, causa inflamação sistêmica, suores noturnos e caquexia, condizente com sua denominação prévia, caquexina⁸. Assim, o uso de medicações que interfiram com o TNF- α poderia aumentar a incidência de infecções nas quais a formação de granulomas tenha importante papel na sua patogenia, como a TB e micoses profundas^{8,58,59}.

A tuberculose em crianças e em indivíduos imunossuprimidos

Para a investigação diagnóstica da TB latente ou doença ativa, utilizam-se dados epidemiológicos, história, exame físico e exames complementares. Crianças e adolescentes representam um desafio maior, pois apresentam sinais e sintomas da TB mais inespecíficos, culturas para micobactérias mais frequentemente negativas e maior risco de evolução de infecção para doença em relação aos adultos^{33,34}. A TB nessa faixa etária é considerada um evento sentinela, refletindo infecção recente de alguma fonte comunitária, já que crianças raramente são fontes primárias de infecção. Caso a criança não desenvolva a doença, poderá, no futuro, passar de infecção latente para doença³³. A infecção latente pode persistir por muitos anos com risco de evolução para doença de cerca de 10% na população geral⁸. Na faixa etária pediátrica, pode chegar a 43% em crianças menores de 1 ano de idade, 24% naquelas com idade entre 1 e 5 anos e 15% nos adolescentes, quando não tratados nos 2 primeiros anos após a infecção^{35,60}. Um dos principais fatores associados à não-evolução para a doença parece ser a produção do IFN- γ pelas células T do hospedeiro, que se encontra diminuída nas crianças menores⁶¹⁻⁶⁴.

Certas condições e enfermidades que cursam com imunossupressão e uso de medicações imunossupressoras podem levar à resposta imunológica pouco efetiva e, com isso, predispor ao maior risco de infecções oportunistas e não-oportunistas^{25-27,59,65-69}. O desenvolvimento da TB na população imunossuprimida envolve várias considerações: formas atípicas dificultando o diagnóstico, necessidade de tratamentos mais prolongados, possibilidade de interação medicamentosa do tratamento da TB com a terapia da doença de base, efeitos adversos da terapia antituberculosa associados à doença de base e, ainda, a possibilidade de transmissão da infecção para outros pacientes imunossuprimidos que frequentam o mesmo serviço de saúde. Considera-se que uma dose de prednisona superior a 15 mg/dia por período

superior a 2-4 semanas já determina risco aumentado para o desenvolvimento de TB^{69,70}. A identificação dos portadores de infecção nesse contexto pode ser difícil pelo fato de tais pacientes serem assintomáticos e pelas limitações dos métodos diagnósticos disponíveis.

O teste ideal para diagnóstico de TB latente deveria ter altas sensibilidade e especificidade, independentemente de história prévia de vacinação com BCG e infecção por outras micobactérias. A PT, que vem sendo por quase um século o método utilizado como padrão-ouro na identificação desses pacientes, é um teste *in vivo* que avalia a reação de hipersensibilidade cutânea tardia, utilizando um PPD como antígeno. O PPD consiste em uma mistura heterogênea de proteínas, o que dificulta a diferenciação entre infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias^{34,68}. A PT apresenta várias limitações: necessidade de comparecimento ao serviço de saúde duas vezes; presença de resultados falso-positivos associados à vacinação prévia com BCG (diminuição da especificidade), à ocorrência de efeito *booster* (a repetição da PT pode levar à reação anamnésica, com recrutamento de hipersensibilidade já pré-existente) ou, ainda, pelo contato prévio com outras micobactérias; presença de resultados falso-negativos (doentes graves, inclusive TB doença, e imunossuprimidos^{6,12,55}); e erros de realização e interpretação do teste^{17,68,71-74}. A PT teria um bom valor preditivo na evolução da infecção para doença ativa, mas em populações com baixa incidência de TB parece ter valor preditivo menor que 50%^{69,75,76}. Em países onde a incidência de TB é alta, a vacinação com BCG ao nascimento não apresentará resultados falso-positivos na interpretação da PT após alguns anos^{77,78}. Como a PT não possui controle positivo interno, é muito difícil distinguir entre os resultados verdadeiramente negativos daqueles falso-negativos. Quanto mais precoce a PT for realizada em pacientes com doença imunossupressora, menor o risco de resultado falso-negativo por anergia associada à doença de base. Assim, podem estar ocorrendo situações em que pacientes com risco não estejam sendo diagnosticados e tratados e outras em que possam estar recebendo tratamento desnecessário por erro de diagnóstico. A presença de positividade da PT pode indicar infecção recente, mesmo assintomática, ou infecção passada, passível de reativação^{8,29,34,79}. Em pacientes com alto risco de desenvolver TB ativa se estiverem infectados (infecção pelo HIV, contactantes recentes de caso de TB, imunossuprimidos), o ponto de corte da PT será 5 mm para indicação de quimioprofilaxia (ATS e Ministério da Saúde do Brasil)^{69,80}.

Agentes biológicos que atuam sobre o TNF- α (agentes antiTNF- α) foram inicialmente indicados para o tratamento da artrite reumatoide. Sua utilização já se tornou frequente também para outras doenças que necessitam imunossupressão. Vários estudos vêm abordando a incidência de TB nas doenças reumáticas, e o papel desses medicamentos e outros agentes imunossupressores na reativação da TB latente. Alguns estudos sugerem que doses baixas de corticosteroides e agentes citotóxicos utilizados na artrite reumatoide não aumentam a incidência de TB nesse grupo de pacientes^{69,81,82}. Yamada et al.⁶⁵ verificaram, no entanto, risco aumentado para TB em japoneses em tratamento para

artrite reumatoide antes da introdução de agentes antiTNF- α . Essa mesma situação foi relatada na Suécia⁸³ e Espanha⁸⁴, mas, nos EUA, Wolfe et al.⁸⁵ mostraram que a incidência de TB não aumentou com a imunossupressão convencional, talvez devido à baixa prevalência da TB nesse país. As informações disponíveis atualmente sugerem que tal classe de drogas aumenta o risco para TB e que a maioria dos casos resulte de reativação de infecção prévia. Desconhece-se a contribuição de infecções recentes para tal fenômeno⁸. Haveria necessidade de que pacientes que irão iniciar terapia com agentes biológicos, especialmente os agentes antiTNF- α , sejam submetidos previamente à investigação de TB, latente ou doença^{10,65,76}. Por outro lado, Keane & Bresnihan¹² não encontraram evidências na literatura sobre a associação de TB com o uso de outros agentes biológicos já de uso corrente como o rituximabe, abatacepte e anakinra. Caso a doença ativa seja excluída em pacientes com PT positiva, a terapia com isoniazida por 9 meses está preconizada como profilaxia da evolução da infecção latente para doença. Nesse caso, o início da terapia com o agente antiTNF- α deverá ser postergado por pelo menos 1 a 2 meses⁸. Admite-se que diminuição da ação TNF- α leve à resposta imune anormal mesmo a um pequeno número de bacilos, gerando importante repercussão clinicopatológica⁷⁰.

Métodos diagnósticos baseados na produção de interferon-gama

Recentemente, testes *in vitro* utilizando sangue total foram desenvolvidos no intuito de auxiliar o diagnóstico de TB. Tais testes são conhecidos como IGRAs (*interferon-gamma release assays*) porque avaliam a produção dessa citocina por células previamente sensibilizadas com agentes específicos. Em maio de 2005, foi aprovado pelo FDA o teste QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT-G), para diagnóstico da infecção latente ou doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (65). O QFT-G utiliza o método ELISA para medir a produção de IFN- γ pelas células T de uma amostra de sangue total⁶⁸. Outro teste de uso corrente, o ELISPOT (comercialmente disponível como T-SPOT.TB[®], Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido) utiliza a técnica de ELISPOT para avaliar o número de células mononucleares periféricas que produzem IFN- γ utilizando-se lentes de aumento ou um leitor próprio^{8,68,86}. O ELISPOT, de uso corrente na Europa, foi aprovado para uso nos EUA pelo FDA em final de julho de 2008. A positividade desses testes deve levar à investigação para determinar se existe TB doença antes de se considerar como TB infecção⁸⁷.

Tanto o QFT-G como o ELISPOT se baseiam na produção de IFN- γ produzida por linfócitos T previamente sensibilizados após incubação com peptídeos sintéticos simulando proteínas das micobactérias, como o *early secretory antigenic target 6* (ESAT-6) e o *culture filtrate protein 10* (CFP-10). Mais recentemente, novos antígenos têm sido incorporados aos testes no intuito de aumentar a sensibilidade. O antígeno TB7.7 foi incorporado ao novo QuantiFERON-TB Gold In-Tube (com introdução do sangue do paciente diretamente em tubo a vácuo com antígenos prontos pra incubação)^{15,68} e o antígeno Rv3879c ao ELISpot^{plus}¹⁶. Tais proteínas, presentes no PPD e secretadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* e por

cepas patogênicas do *Mycobacterium bovis*, estão ausentes na vacina BCG e na maioria das outras micobactérias não-tuberculosas, à exceção do *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai* e *Mycobacterium marinum*⁸⁸⁻⁹⁰. Logo, tais testes devem oferecer maior especificidade que a PT para o diagnóstico da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Lein et al.⁹¹ mostraram que pacientes com doença pulmonar causada pelo complexo *Mycobacterium avium* apresentavam os exames negativos.

Os genes que codificam esses antígenos encontram-se localizados na chamada região de diferença 1 do genoma da *Mycobacterium tuberculosis*. São deletados do genoma do *Mycobacterium bovis* do BCG e também não ocorrem no genoma de algumas micobactérias não-tuberculosas como a *Mycobacterium avium*⁶⁸. Assim, os antígenos utilizados nos IGRAs não estão presentes no BCG e em algumas micobactérias não-tuberculosas⁹². Budnick et al.⁹³ sugerem que o QFT-G identificaria indiretamente todo o complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microcoti* e *Mycobacterium canetti*. Gey Van Pittius et al.⁹⁴ sugerem que, embora o *Mycobacterium avium* e a maioria das micobactérias não-tuberculosas não possuam os genes que codificam as proteínas ESAT-6 e CFP-10, alguns genes presentes em algumas dessas micobactérias poderiam produzir proteínas que apresentariam reação cruzada com os genes associados ao segmento região de diferença 1. No entanto, Wang et al.⁹⁵ confirmaram a acurácia dos IGRAs para diagnóstico de TB em atividade mesmo em áreas endêmicas para micobactérias não-tuberculosas.

Esses testes parecem não ser influenciados pela vacinação prévia com BCG^{79,88} e menos influenciados por infecção prévia por micobactérias não-tuberculosas, o que aumenta sua sensibilidade e especificidade diagnósticas quando comparados à PT^{10,17,29,79,87,88,96}. Outras vantagens de tais testes são: necessidade de apenas uma visita (sem retorno para a leitura, como na PT), resultados em 24 horas, eliminação de erros de aplicação e interpretação de leitura da PT, uso de pequeno volume de sangue (o que é bom para a faixa etária pediátrica) e ausência do efeito *booster*, por não expor o próprio paciente a um antígeno. A Tabela 1 compara a PT

com os IGRAs. Richeldi et al.¹⁸ comentam que o fato de as proteínas ESAT-6 e CFP-10 estarem presentes no PPD possa levar, ao menos teoricamente, a que testes de PT repetidas vezes possam aumentar a resposta das células T a tais antígenos. Disso resultariam resultados falso-positivos no ELISPOT, método extremamente sensível mesmo a pequeno número de células T⁹⁷. No entanto, o mesmo estudo¹⁸ mostrou que, na prática, pacientes submetidos à PT repetidas vezes não tiveram positividade no ELISPOT. Esse teria alta especificidade mesmo em pacientes com PT falso-positiva devido ao efeito *booster*, podendo ser utilizado naqueles pacientes em investigação e que já foram submetidos à PT repetidas vezes. No entanto, erros de coleta, transporte, técnica e interpretação podem diminuir a sua acurácia. O sangue deve ser incubado com os antígenos sintéticos no máximo 12 horas após sua coleta. Outras limitações importantes são o custo do exame e a necessidade de um laboratório adequado à técnica do exame. Isso pode limitar seu uso em países em desenvolvimento, exatamente aqueles onde a TB é mais frequentemente endêmica. Outra limitação importante dos IGRAs, assim como também da PT, é a não-diferenciação de TB infecção da doença. O diagnóstico de TB infecção requer a exclusão da doença a partir de dados clínicos e exames complementares⁸⁷.

Os IGRAs podem apresentar resultados indeterminados por erros técnicos, pelo encontro de alta quantidade de IFN- γ no controle nulo ou, ainda, se o controle positivo com fitohemaglutinina (potente mitógeno estimulador de células T) determinar a produção de pequena ou nenhuma quantidade de IFN- γ ⁹. Essa baixa resposta mitógena pode refletir anergia ou falta de capacidade do sistema imunológico de montar resposta celular eficaz. Assim, também os IGRAs podem ser afetados por estados de imunossupressão. No entanto, resultados indeterminados podem, eventualmente, ser encontrados em indivíduos imunocompetentes⁸⁷. A literatura tem mostrado que resultados indeterminados foram encontrados em até 11% dos pacientes testados com QFT-G e tal fato deve estar associado aos poucos pacientes imunossuprimidos incluídos nesses estudos⁹⁸⁻¹⁰⁰. Ferrara et al.⁷⁹ encontraram alta taxa de resultados indeterminados (21,4%) numa população onde 20% dos pacientes recebiam

Tabela 1 - Comparação entre PTs e IGRAs

	PT	IGRA
Visita ao serviço de saúde	2 vezes	1 vez
Tempo para resultados	72-96 horas	24 horas
Resultados falso-positivos	BCG previamente, efeito booster	Não
Resultados falso-negativos	Imunossuprimidos, TB grave	Possível, mas pouco provável
Interpretação dos resultados	Sujeita a erros de avaliação	Informatizada

BCG = vacina Bacilo Calmette-Guérin; IGRA = testes diagnósticos baseados na liberação de interferon-gama (*interferon-gamma release assay*); PT = prova tuberculínica; TB = tuberculose.

imunossuppressores. Ravn et al.¹⁰¹, ratificando este estudo, encontraram resultados indeterminados com QFT-G em nove pacientes, dos quais três tinham infecção pelo HIV, um recebia imunossupressor e dois tinham quadros avançados de TB. Os resultados indeterminados devido à falta de resposta mitógena sugerem que os mesmos possam estar associados à imunossupressão. Portanto, o clínico deve ficar atento para a possibilidade de estado de anergia e deverá continuar a investigação de TB no paciente com suspeita de infecção latente ou doença ativa^{9,29}.

Poucos estudos têm abordado a importância dos IGRAs no contexto dos pacientes imunossuprimidos. Alguns estudos mostraram pequena diminuição na resposta dos IGRAs quando comparada à população não-imunossuprimida^{21,102}. Outros estudos mostraram que a prevalência de resultados positivos no ELISPOT foi superior à encontrada na PT, principalmente em imunossuprimidos^{16,102,103}. No entanto, Brock et al.¹⁰⁴ encontraram baixa prevalência de resultados positivos do QFT em pacientes assintomáticos infectados pelo HIV. Os resultados indeterminados eram mais frequentes em pacientes com contagem de CD4 menor que 100 células/mm³.

Estudos recentes têm mostrado que ambos os testes apresentam altas sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da TB doença, mas poucos abordaram a TB infecção, motivo inicial de sua aplicação^{21,79,96,102}. Ferrara et al.⁷⁹ sugerem que a especificidade dos IGRAs seja maior que a PT para o diagnóstico da infecção tuberculosa. Pai et al.¹⁰⁵ mostraram que os IGRAs são mais específicos que a PT quando se avaliam populações vacinadas com BCG. De modo geral, os diferentes estudos em adultos têm mostrado concordância de 60-80% quando comparados PT e os métodos baseados na produção de IFN- γ . Em relação à sensibilidade, há vários estudos mostrando a superioridade dos IGRAs sobre a PT^{15,102,103,106}. Ponce de Leon et al.¹⁵ mostraram recentemente que, numa população em área endêmica para TB, o ELISPOT foi significativamente mais sensível que a PT para diagnóstico de TB latente em pacientes com artrite reumatoide, mas não em pacientes hígidos. Tal achado provavelmente esteve associado à imunossupressão da doença e/ou da medicação utilizada no tratamento da mesma. No entanto, estudando um grupo de 2.381 contactantes de casos de TB em Gâmbia, Jackson-Sillah et al.¹⁰⁷ mostraram que o ELISPOT apresentou sensibilidade inferior à PT, mas chamam a atenção que o mesmo possa ser importante para o diagnóstico na faixa etária pediátrica. Em recente meta-análise, Pai et al.¹⁰⁸ concluíram que os IGRAs (especialmente o QFT-G em placa ou tubo) têm excelente especificidade para o diagnóstico da infecção tuberculosa latente, enquanto a PT tem alta especificidade em população não vacinada com BCG, mas baixa especificidade em população previamente vacinada. A sensibilidade dos IGRAs e da PT permanece controversa. É de difícil avaliação por meta-análise pelas diferenças metodológicas entre os estudos incluídos, porém o ELISPOT parece ser mais sensível que o QFT-G e a PT. Ambos mostraram sensibilidade semelhante entre si, donde se conclui que essa maior sensibilidade do ELISPOT pode ser útil na avaliação de pacientes imunossuprimidos⁶⁸. Cabe lembrar que a desnutrição, a própria imunossupressão e TB grave podem ocasionar anergia e contribuir para uma diminuição da sensibilidade dos IGRAs¹⁰⁸.

Em relação à resposta aos IGRAs na faixa etária pediátrica, o número de estudos ainda é insuficiente, e há várias controvérsias. Como anteriormente discutido, a imunidade celular tende a amadurecer com o crescimento. Estudos mostraram que a produção de IFN- γ detectado pelo QFT-G pode ser afetada pelo crescimento, mas que tal não ocorre com o ELISPOT, exceto nas primeiras semanas de vida. Esse teste tem capacidade de detectar a produção do IFN- γ mesmo com baixo número de células secretoras. Isso poderia explicar a maior frequência de resultados indeterminados do QFT-G quando comparado ao ELISPOT na faixa etária pediátrica em relação a adultos^{14,29,109}.

Em crianças sul-africanas com TB ativa em área de alta incidência de AIDS, Liebeschuetz et al.²¹ mostraram que o ELISPOT era muito mais sensível que a PT e que idade inferior a 3 anos, coinfeção pelo HIV e desnutrição diminuíram a sensibilidade da PT, mas não do ELISPOT. Em surtos escolares, Ewer et al.¹¹⁰ mostraram que o ELISPOT mostrou melhor correlação com a exposição ao *Mycobacterium tuberculosis* do que a PT num grupo de adolescentes de 11 a 15 anos, e que a vacinação prévia com BCG não influiu nos resultados do teste. A maior sensibilidade do ELISPOT em relação à PT também foi demonstrada em outros estudos^{95,111}. A sensibilidade do ELISPOT para o diagnóstico de doença ativa foi superior ao QFT-G e à PT, enquanto esses apresentaram resultados semelhantes entre si. Não há dados fidedignos para avaliação da especificidade dos IGRAs para diagnóstico da TB ativa^{14,109,112}.

Considerando-se a infecção latente, a falta de padrão-ouro para esse diagnóstico cria dificuldades para se comparar novos testes com a PT¹⁴. Em relação ao QFT-G, há controvérsias, mas dados mais recentes sugerem que tal exame possa ser menos sensível que a PT no diagnóstico da TB infecção¹⁰⁹. Vários estudos em crianças têm mostrado que o ELISPOT tem maior sensibilidade que a PT no diagnóstico da infecção latente^{18,19,110}. Pelo fato de o ELISPOT se correlacionar melhor com diferentes padrões de exposição à TB do que a PT, infere-se que tenha melhor sensibilidade que esta. Contudo, há necessidade de estudos longitudinais para confirmar a real melhor sensibilidade dos IGRAs. Em relação à especificidade, os IGRAs mostraram ser mais específicos que a PT no diagnóstico da infecção latente^{14,113,114}.

Conclusão

A PT avalia uma resposta inflamatória multimedida *in vivo* a múltiplos antígenos tubercúlicos, enquanto os IGRAs avaliam, *ex vivo*, a produção de IFN- γ por linfócitos dos pacientes frente a um estímulo composto de pequeno número de antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*. Embora os IGRAs tenham sido planejados como estratégia para diagnosticar a infecção latente, estudos têm mostrado que podem também ser úteis para o diagnóstico da doença ativa. Nesse caso, o resultado negativo seria suficiente para afastar a possibilidade de doença, ou seja, os IGRAs parecem ter alto valor preditivo negativo. Isso seria particularmente útil em crianças, imunossuprimidos e pacientes com culturas negativas,

nos quais o diagnóstico de doença ativa é mais difícil de ser estabelecido utilizando-se os testes convencionais¹³.

Embora ainda haja controvérsias, de modo geral se aceita que os IGRAs sejam mais sensíveis e específicos que a PT para o diagnóstico da infecção latente e da doença ativa. Faltam, porém, estudos longitudinais que permitam estabelecer esses dados com maior segurança. Estudos longitudinais também são essenciais para se determinar o risco futuro de desenvolvimento de doença ativa nos pacientes com resultados positivos, diferentemente do que ocorre com a PT. Com relação à PT, já se estabeleceram os riscos de doença e benefícios da terapia associados a diferentes resultados do teste⁶⁸. Tais fatos reforçam a necessidade de mais estudos sobre IGRAs em diferentes populações, principalmente naquelas com alta incidência de TB e que incluam pacientes com condições que levam à depressão da resposta imunológica celular, além de estudos específicos na faixa etária pediátrica.

Em termos de saúde pública, os IGRAs poderiam se constituir, ao menos por ora, em complemento em relação à PT, avaliando-se a relação custo-benefício. Embora esses testes requeiram apenas uma visita e não sejam realizados diretamente no paciente, ainda são testes caros e que requerem laboratórios especializados e profissionais aptos a realizá-los em tempo hábil. Oxlade et al.¹¹⁵ concluíram que a melhor relação custo-benefício do QFT seria testar pacientes sabidamente com PT positiva. Por ora, enquanto o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), órgão estadunidense, recomenda que o QFT-G substitua a PT em qualquer situação, órgãos de saúde da Inglaterra sugerem que os IGRAs devam ser avaliados conjuntamente com a PT. Apenas nos casos em que haja probabilidade de encontrar-se PT falsamente negativa, como nos imunossuprimidos e em crianças pequenas, estariam indicados para uso na fase inicial de investigação^{13,14,68,87}.

O achado de PT e IGRAs negativos em população imunossuprimida não exclui a TB latente ou a doença

ativa, ao menos por ora. Na prática, indivíduos com esses testes negativos, mas com fatores de risco de progressão de TB latente para doença ativa, poderão necessitar de quimioprevenção ou tratamento da doença⁸⁷.

A Organização Mundial de Saúde, reconhecendo a importância dos IGRAs em relação aos estudos clínicos, epidemiológicos e de pesquisa básica, copatrocinou uma reunião de *experts* em Genebra, Suíça, em março de 2006. Desse encontro, surgiram sete grandes linhas de prioridade para pesquisa em relação aos mesmos (Tabela 2)¹³. Apesar do grande número de estudos recentemente publicados, muitas perguntas permanecem sem resposta. A capacidade dos IGRAs em identificar pacientes com infecção latente com maior risco de evoluir para doença ativa e, assim, permitir que esses pacientes se beneficiem de medidas preventivas precocemente, bem como o comportamento de tais testes em estudos longitudinais envolvendo populações consideradas de alto risco, como crianças e imunossuprimidos, oferecem um campo fértil para a pesquisa, principalmente em países como o Brasil, onde a TB está longe de ser erradicada.

Referências

1. Whalen CC. *Diagnosis of latent tuberculosis infection: measure for measure*. JAMA. 2005;293:2785-7.
2. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. *Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000*. Bull World Health Organ. 1994;72:213-20.
3. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. *Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country*. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA. 1999;282:677-86.
4. Brasil. Ministério da Saúde http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21445. Acesso: 20/11/2007.
5. *Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection*. American Thoracic Society. MMWR Recomm Rep. 2000;49(RR-6):1-51.

Tabela 2 - Prioridades de pesquisa em relação aos IGRAs sugeridas pela OMS

Desenvolvimento de novos ensaios e considerações biológicas

Performance dos testes em populações de alto risco e aquelas pouco estudadas (onde foram incluídos pacientes imunossuprimidos e as crianças)

Modelos de predição de riscos

Reprodutibilidade dos testes

Avaliação das células T durante o tratamento da tuberculose

Aplicações epidemiológicas

Operacionalização do uso dos testes em relação a diferentes sistemas de saúde e condições socioeconômicas

IGRA = testes diagnósticos baseados na liberação de interferon-gama (*interferon-gamma release assay*);
OMS = Organização Mundial da Saúde.

6. Cantwell MF, Snider DE Jr, Cauthen GM, Onorato IM. Epidemiology of tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. *JAMA*. 1994;272:535-9.
7. Ferrand RA, Bothamley GH, Whelan A, Dockrell HM. Interferon-gamma responses to ESAT-6 in tuberculosis patients early into and after anti-tuberculosis treatment. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9:1034-9.
8. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R, et al. Anti-tumor necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:148-55.
9. Pai M, Lewinsohn DM. Interferon-gamma assays for tuberculosis: is anergy the Achilles' heel? *Am J Resp Crit Care Med*. 2005;172:519-21.
10. Efthimiou P, Sood S. QuantiFERON TB Gold Test: the new standard for screening of latent tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*. 2007;66:276.
11. Horsburgh CR Jr. Priorities for the treatment of latent tuberculosis in the United States. *N Engl J Med*. 2004;350:2060-7.
12. Keane J, Bresnihan B. Tuberculosis reactivation during immunosuppressive therapy in rheumatic diseases: diagnostic and therapeutic strategies. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20:443-9.
13. Pai M, Dheda K, Cunningham J, Scano F, O'Brien R. T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:428-38.
14. Lalvani A, Millington KA. T cell-based diagnosis of childhood tuberculosis infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20:264-71.
15. Ponce de Leon D, Acevedo-Vasquez E, Alvizuri S, Gutierrez C, Cucho M, Alfaro J, et al. Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol*. 2008;35:776-81.
16. Dosanjh DP, Hinks TS, Innes JA, Deeks JJ, Pasvol G, Hackforth S, et al. Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis. *Ann Intern Med*. 2008;148:325-36.
17. Barnes PF. Diagnosing latent tuberculosis infection: turning glitter to gold. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:5-6.
18. Richeldi L, Ewer K, Losi M, Bergamini BM, Roversi P, Deeks J, et al. T cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:288-95.
19. Soysal A, Millington KA, Bakir M, Dosanjh D, Aslan Y, Deeks JJ, et al. Effect of BCG vaccination on risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with household tuberculosis contact: a prospective community-based study. *Lancet*. 2005;366:1443-51.
20. Murakami S, Takeno M, Kirino Y. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific immune responses by using ELISPOT technique in rheumatoid arthritis patients receiving immunosuppressive therapies. *Arthritis Rheum* 2006; 9:S517.
21. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, Deeks J, Pathan AA, Lalvani A. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study. *Lancet*. 2004;364:2196-203.
22. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:736-42.
23. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
24. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:697-714.
25. Kurki PT. Safety aspects of the long term cyclosporine A therapy. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1992;95:35-8.
26. Stuck AE, Minder CE, Frey FJ. Risk of infectious complications in patients taking glucocorticosteroids. *Rev Infect Dis*. 1989;11:954-63.
27. Boerbooms AM, Kerstens PJ, van Loenhout JW, Mulder J, van de Putte LB. Infections during low-dose methotrexate treatment in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 1995;24:411-21.
28. Andonopoulos AP, Safridi C, Karokis D, Bounas A. Is a purified protein derivative skin test and subsequent antituberculous chemoprophylaxis really necessary in systemic rheumatic diseases patients receiving corticosteroids? *Clin Rheumatol*. 1998;17:181-5.
29. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet*. 2006;367:1328-34.
30. American Thoracic Society; Centers for Disease Control and Prevention; Infectious Diseases Society of America. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/ Infectious Diseases Society of America: controlling tuberculosis in the United States. *Am J Resp Crit Care Med*. 2005;172:1169-227.
31. World Health Organization. World health report 2004: changing history. Geneva: WHO; 2004.
32. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/epidemio.pdf>. Acesso: 23/07/2008.
33. Feja K, Saiman L. Tuberculosis in children. *Clin Chest Med*. 2005;26:295-312.
34. Lewinsohn DA, Gennaro ML, Scholvinck L, Lewinsohn DM. Tuberculosis immunology in children: diagnostic and therapeutic challenges and opportunities. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8:658-74.
35. Starke JR, Jacobs RF, Jereb J. Resurgence of tuberculosis in children. *J Pediatr*. 1992;120:839-55.
36. Marchant A, Goldman M. T cell-mediated immune response in human newborns: ready to learn? *Clin Exp Immunol*. 2005;141:10-8.
37. Rook GA, Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol*. 1996;50:259-84.
38. Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, et al. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukoc Biol*. 1999;66:763-4.
39. Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med*. 1995;181:257-70.
40. Othieno C, Hirsch CS, Hamilton BD, Wilkinson K, Ellner JJ, Toossi Z. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis*-induced transforming growth factor beta 1 and interleukin-10. *Infect Immun*. 1999;67:5730-5.
41. Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta 1. *J Infect Dis*. 1994;170:1229-37.
42. Hickman SP, Chan J, Salgame P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naïve T cell polarization. *J Immunol*. 2002;168:4636-42.
43. Fortsch D, Rollinghoff M, Stenger S. IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2000;165:978-87.
44. Holt PG. Antigen presentation in the lung. *Am J Resp Crit Care Med*. 2000;162:S151-6.
45. Nelson DJ, Holt PG. Defective regional immunity in the respiratory tract of neonates is attributable to hyporesponsiveness of local dendritic cells to activation signals. *J Immunol*. 1995;155:3517-24.
46. Turner J, Frank AA, Brooks JV, Gonzalez-Juarrero M, Orme IM. The progression of chronic tuberculosis in the mouse does not require the participation of B lymphocytes or interleukin-4. *Exp Gerontol*. 2001;36:537-45.
47. Bosio CM, Gardner D, Elkins KL. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *J Immunol*. 2000;164:6417-25.
48. Glatman-Freedman A, Casadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:514-32.
49. Sant'Anna CC, Fonseca LS, Saad MH. Relação entre o diagnóstico sorológico (ELISA) e a gravidade da tuberculose pulmonar na infância. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34:531-35.
50. Ashtekar MD, Samuel AM, Kameswaran M, Kadival GV, Sakhalkar V, Rajadhyaksha S. A study of tubercular antigen and antibody in childhood tuberculosis. *J Trop Pediatr*. 1992;38:22-6.
51. Mahadevan S. Clinical utility of serodiagnosis of tuberculosis. *Indian J Pediatr*. 1997;64:97-103.
52. Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology*. 2000;119:1148-57.
53. Havell EA. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. *J Immunol*. 1989;143:2894-9.
54. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*. 1989;56:731-40.

55. Smith S, Liggitt D, Jeromsky E, Tan X, Skerrett SJ, Wilson CB. Local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*. 2002;70:2082-9.
56. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun*. 1997;65:298-304.
57. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol*. 2000;164:2016-20.
58. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001;345:1098-104.
59. Lee JH, Slifman NR, Gershon SK, Edwards ET, Schwiertman WD, Siegel JN, et al. Life-threatening histoplasmosis complicating immunotherapy with tumor necrosis factor alpha antagonists infliximab and etanercept. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2565-70.
60. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:624-32.
61. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:578-90.
62. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*. 1996;335:1941-9.
63. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995;63:3231-4.
64. Frenkel L, Bryson YJ. Ontogeny of phytohemagglutinin-induced gamma interferon by leukocytes of healthy infants and children: evidence for decreased production in infants younger than 2 months of age. *J Pediatr*. 1987;111:97-100.
65. Yamada T, Nakajima A, Inoue E, Tanaka E, Hara M, Tomatsu T, et al. Increased risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis in Japan. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1661-3.
66. Holden M, Dubin MR, Diamond PH. Frequency of negative intermediate-strength tuberculin sensitivity in patients with active tuberculosis. *N Engl J Med*. 1971;285:1506-9.
67. Battershill JH. Cutaneous testing in the elderly patient with tuberculosis. *Chest*. 1980;77:188-9.
68. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new test for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med*. 2007;146:340-54.
69. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. *Am J Resp Crit Care Med*. 2000;161:S221-47.
70. Warris A, Bjornekleit A, Gaustad P. Invasive pulmonary aspergillosis associated with infliximab therapy. *N Engl J Med*. 2001;344:1099-100.
71. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*. 1993;17:968-75.
72. Tissot F, Zanetti G, Francioli P, Zellweger JP, Zysset F. Influence of bacille Calmette-Guerin vaccination on size of tuberculin skin test reaction: to what size? *Clin Infect Dis*. 2005;40:211-7.
73. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:736-42.
74. Porsa E, Cheng L, Seale MM, Delclos GL, Ma X, Reich R, Musser JM, et al. Comparison of a new ESAT-6/CFP-10 peptide-based gamma interferon assay and a tuberculin skin test for tuberculosis screening in a moderate-risk population. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:53-8.
75. Radhakrishna S, Frieden TR, Subramani R; Tuberculosis Research Centre (ICMR). Association of initial tuberculin sensitivity, age and sex with the incidence of tuberculosis in south India: a 15-year follow-up. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7:1083-91.
76. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1376-95.
77. Dogra S, Narang P, Mendiratta DK, Chaturvedi P, Reingold AL, Colford Jr JM, et al. Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect*. 2007;54:267-76.
78. Gustafson P, Lisse I, Gomes V, Vieira CS, Lienhardt C, Naclér A, et al. Risk factors for positive tuberculin skin test in Guinea-Bissau. *Epidemiology*. 2007;18:340-7.
79. Ferrara G, Losi M, Meacci M, Meccugni B, Piro R, Roversi P, et al. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:631-5.
80. Ministério da Saúde. Manual técnico para o controle da tuberculose. Cadernos de atenção básica no. 6. Série A. Normas e manuais técnicos; no. 148. Brasília, DF: MS; 2002.
81. Kim HA, Yoo CD, Baek HJ, Lee EB, Ahn C, Han JS, et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection in a corticosteroid-treated rheumatic disease patient population. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16:9-13.
82. Schatz M, Patterson R, Kloner R, Falk J. The prevalence of tuberculosis and positive tuberculin skin test in a steroid-treated asthmatic population. *Ann Intern Med*. 1976;84:261-5.
83. Askling J, Fored CM, Brandt L. Risk and case characteristics of tuberculosis in rheumatoid arthritis associated with tumor necrosis factor antagonists in Sweden. *Arthritis Rheum*. 2005;52:1986-92.
84. Carmona L, Hernández-García C, Vadillo C, Pato E, Balsa A, González-Alvaro I, et al. Increased risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2003;30:1436-9.
85. Wolfe F, Michaud K, Anderson J, Urbansky K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis Rheum*. 2004;50:372-9.
86. Lalvani A. Spotting latent infection: the path to better tuberculosis control. *Thorax*. 2003;58:916-8.
87. Mazurek GH, Jerreb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A; Division of Tuberculosis Elimination, National Center for HIV, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for using the QuantiFERON®-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep*. 2005;54:49-55.
88. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000;356:1099-104.
89. Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K, de Palou EC, van Soolingen D, Ottenhoff TH, et al. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis*. 2002;186:1797-807.
90. Gey van Pittius NC, Warren RM, van Helden PD. ESAT-6 and CFP-10: what is the diagnosis? *Infect Immun*. 2002;70:6509-10.
91. Lein AD, von Reyn CF, Ravn P, Horsburgh CR Jr, Alexander LN, Andersen P. 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*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6:606-9.
92. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty DM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000;356:1099-104.
93. Budnick LD, Burday M, Brachman G, Mangura CT, DeBlock D, Lardizabal A. Blood assay for tuberculosis: initial findings in a preplacement surveillance program. *J Occup Environ Med*. 2006;48:1115-7.
94. Gey Van Pittius NC, Gamielidien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, Beyers AD. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol*. 2001;2:RESEARCH0044.
95. Wang JY, Chou CH, Lee LN, Hsu HL, Jan IS, Hsueh PR, et al. Diagnosis of tuberculosis by an enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:553-8.
96. Schölvinc E, Wilkinson KA, Whelan AO, Martineau AR, Levin M, Wilkinson RJ. Gamma interferon-based immunodiagnosis of tuberculosis: comparison between whole-blood and enzyme-linked immunospot methods. *J Clin Microbiol*. 2004;42:829-31.

97. Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med*. 1997;186:859-65.
98. Pai M, Gokhale K, Joshi R, Dogra S, Kalantri S, Mendiratta DK, et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA*. 2005;293:2746-55.
99. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:59-64.
100. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:65-9.
101. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:491-6.
102. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, Pathan AA, Ewer K, Ayles H, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. *AIDS*. 2002;16:2285-93.
103. Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P, Ferrarese M, Migliori GB, Barbarano L, et al. Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. *Eur Respir J*. 2006;28:31-4.
104. Brock I, Ruhwald M, Lundgren B, Westh H, Mathiesen LR, Ravn P. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res*. 2006;7:56.
105. Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:761-76.
106. Ponce de Leon D, Acevedo-Vasquez E, Alvizuri S, Gutierrez C, Cucho M, Alfaro J, et al. Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol*. 2008;35:776-81.
107. Passalent L, Khan K, Richardson R, Wang J, Dedier H, Gardam M. Detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: a head-to-head comparison of the T-SPOT.TB test, tuberculin skin test, and an expert physician panel. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2:68-73.
108. Jackson-Sillah D, Hill PC, Fox A, Brookes RH, Donkor SA, Lugos MD, et al. Screening for tuberculosis among 2381 household contacts of sputum-smear-positive cases in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101:594-601.
109. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008;149:177-84.
110. Connell TG, Curtis N, Ranganathan SC, Buttery JP. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in children. *Thorax*. 2006;61:616-20.
111. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, et al. Comparison of T-cell based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet*. 2003;361:1168-73.
112. Connell T, Bar-Zeev N, Curtis N. Early detection of perinatal tuberculosis using a whole blood interferon-gamma release assay. *Clin Infect Dis*. 2006;42:e82-5.
113. Molicotti P, Bua A, Mela G, Olmeo P, Delogu R, Ortu S, et al. Performance of QuantiFERON-TB testing in a tuberculosis outbreak at a primary school. *J Pediatr*. 2008;152:585-6.
114. Okada K, Mao TE, Mori T, Miura T, Sugiyama T, Yoshiyama T, et al. Performance of an interferon-gamma release assay for diagnosing latent tuberculosis infection in children. *Epidemiol Infect*. 2008;136:1179-87.
115. Oxlade O, Schwartzman K, Menzies D. Interferon-gamma release assays and TB screening in high-income countries: a cost-effectiveness analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11:16-26.

Correspondência:

Flávio R. Sztajn bok
 Rua Álvaro Ramos, 405/804, bloco 1
 CEP 22280-110 - Rio de Janeiro, RJ
 Tel.: (21) 2275.7372, (21) 9994.7006
 Fax: (21) 2275.7372, (21) 2264.2082
 E-mail: flavios@skydome.net

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)