



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

**IMPLANTAÇÃO DE PROJETO PILOTO IGRA-TB – MINISTÉRIO DA
SAÚDE: PADRONIZAÇÃO, OTIMIZAÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E AVANÇOS
NA QUANTIFICAÇÃO DE IFN- γ PARA INOVAÇÕES FRENTE AO
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE LATENTE.**

ELOISE TROSTDORF MONTEIRO FILARDI

ARARAQUARA - SP

2024

ELOISE TROSTDORF MONTEIRO FILARDI

**IMPLANTAÇÃO DE PROJETO PILOTO IGRA-TB – MINISTÉRIO DA
SAÚDE: PADRONIZAÇÃO, OTIMIZAÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E AVANÇOS
NA QUANTIFICAÇÃO DE IFN- γ PARA INOVAÇÕES FRENTE AO
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE LATENTE.**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Bioprocessos Aplicadas à
Farmácia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista, Júlio de Mesquita Filho, para
obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia. Área de pesquisa: Imunologia

Orientador: Prof. Dr Paulo Inácio da
Costa

ARARAQUARA

2024

F478i Filardi, Eloise Trostdorf Monteiro.
Implantação de projeto piloto IGRA-TB – Ministério da Saúde:
padronização, otimização, epidemiologia e avanços na quantificação
de IFN- γ para inovações frente ao diagnóstico de tuberculose latente /
Eloise Trostdorf Monteiro Filardi. – Araraquara, 2024.
116 f. : il.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de
Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.
Área de pesquisa: Imunologia.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Tuberculose latente. 3. HIV. 4.
IGRA-TB. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: IMPLANTAÇÃO DE PROJETO PILOTO IGRA-TB – MINISTÉRIO DA SAÚDE: PADRONIZAÇÃO, OTIMIZAÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E AVANÇOS NA QUANTIFICAÇÃO DE IFN- γ PARA INOVAÇÕES FRENTE AO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE LATENTE.

AUTORA: ELOISE TROSTDORF MONTEIRO FILARDI

ORIENTADOR: PAULO INACIO DA COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. SIGRID DE SOUSA DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. THIAGO APARECIDO DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 18 de abril de 2024

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais,
Silvia Elena Trostdorf Filardi & Rafael Luiz Monteiro Filardi
minha base, minha primeira família.

Ao meu amado parceiro,
Lucas Henrique Espada
meu lar, minha segunda família.

Ao grandíssimo orientador,
Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Que seus conhecimentos ressoem por várias e várias gerações.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**,

e a todos os eventos que guiaram meu caminho para chegar até aqui.

Ao orientador **Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa**,

à todos esses anos de confiança em meu trabalho. Pela calma, paciência, apoio, bom humor e compreensão inestimáveis. Obrigada por acreditar e apoiar meu potencial, desde a especialização, assessora técnica e mestranda.

A **Profa. Dra. Manuela Berto Pucca**,

por toda ajuda prestada e início dessa parceria incrível, que estimo a geração de inúmeros frutos. Obrigada ao destino por ter cruzado nossos caminhos.

A **Dra. Sigrid De Sousa dos Santos** e **Prof. Dr. Thiago Aparecido da Silva**,

Pelas valiosas contribuições na qualificação desse trabalho e andamento para o doutorado.

A todos do **LICBM-Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular**,

foi uma honra conhecê-los e aprender com vocês.

Aos **parceiros de pesquisa e amigos**,

por todo o apoio, ajuda, risadas, conhecimentos compartilhados, conversas, coffee breaks e cafés sempre regados por muita parceria e companheirismo. Foi incrível trilhar esse caminho com a presença de cada um de vocês.

A **Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP**,

como instituição, pelo acolhimento, e aos seus funcionários, em geral, por todo o apoio, infraestrutura e ajuda para o desenvolvimento desse trabalho.

A **CAPES**,

Pelo apoio ao presente trabalho realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“Hold up

Hold on

Don't be scared

You'll never change what's been and gone...”

Stop Crying Your Heart Out – Oasis

RESUMO

A tuberculose continua sendo um importante desafio para a saúde pública mundial ao longo dos anos, com cerca de dez milhões de novos casos e 1,2 milhões de óbitos registrados. O Brasil está entre os 30 países com alta carga de coinfeção por tuberculose e HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), sendo esta uma das principais causas de morte nesse grupo específico. Controlar a disseminação da doença é uma prioridade global estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A infecção pode se manifestar de forma ativa ou latente. No primeiro caso, o diagnóstico pode ser feito por meio de exames de imagem ou pela identificação direta do agente etiológico. A dificuldade reside no diagnóstico da tuberculose latente (ILTB), na qual o indivíduo contaminado não apresenta sintomas nem sinais clínicos evidentes, apesar de os bacilos de Koch permanecerem nos granulomas, onde o *Mycobacterium tuberculosis* (MT) prolifera e se desenvolve até a eventual manifestação da tuberculose ativa, especialmente em pacientes imunossuprimidos nos quais o bacilo escapa do sistema imunológico. A resposta imunológica ao MT ocorre após a prévia sensibilização dos linfócitos T, que são responsáveis pela produção e secreção da citocina interferon-gamma (IFN- γ). Essa citocina pode ser quantificada por meio de um ensaio clínico, como o teste IGRA-TB, que é uma alternativa para o diagnóstico da ILTB. No entanto, o teste pode apresentar limitações de sensibilidade em pacientes com linfopenia e redução nos valores absolutos de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, os quais são responsáveis pela secreção de IFN- γ após a apresentação de antígenos da tuberculose por monócitos, resultando em falsos negativos ou resultados inconclusivos, especialmente em casos de coinfeção com o vírus HIV. O método de RT-PCR foi proposto para dosagem de RNAm de IFN- γ na presença de antígenos específicos do MT, ESAT-6 e CPF-10, demonstrando resultados promissores, com uma maior frequência de RNAm expresso em amostras que foram positivas para ILTB. Além de descrever o processo de padronização, implementação e propostas para o refinamento da dosagem de IFN- γ , o presente estudo também analisou a epidemiologia dos casos de tuberculose em cinco regiões diferentes do estado de São Paulo. Os resultados revelaram uma taxa de 14,3% de casos positivos para ILTB nas seguintes regiões: DRS III - Araraquara/São Carlos, XIII - Ribeirão Preto, VIII - Franca, XV - São José do Rio Preto e V - Barretos, juntamente com uma análise descritiva das populações estudadas.

Palavras chave: Mycobacterium tuberculosis, Tuberculose Latente, HIV, IGRA-TB.

ABSTRACT

Tuberculosis remains a significant challenge for global public health over the years, with approximately ten million new cases and 1.2 million deaths recorded. Brazil is among the 30 countries with a high burden of tuberculosis and HIV coinfection (Human Immunodeficiency Virus), which is one of the leading causes of death in this specific group. Controlling the spread of the disease is a global priority established by the World Health Organization (WHO). The infection can manifest itself in an active or latent form. In the former case, the diagnosis can be made through imaging tests or by directly identifying the etiological agent. The challenge lies in diagnosing latent tuberculosis (LTBI), where the infected individual does not present symptoms or evident clinical signs, although the Koch bacilli remain in granulomas, where *Mycobacterium tuberculosis* (MT) proliferates and develops until the eventual manifestation of active tuberculosis, especially in immunosuppressed patients where the bacillus escapes the immune system. The immune response to MT occurs after prior sensitization of T lymphocytes, which are responsible for the production and secretion of the cytokine interferon-gamma (IFN- γ). This cytokine can be quantified through a clinical assay, such as the IGRA-TB test, which is an alternative for LTBI diagnosis. However, the test may have sensitivity limitations in patients with lymphopenia and reduced absolute values of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, which are responsible for IFN- γ secretion after the presentation of tuberculosis antigens by monocytes, resulting in false negatives or inconclusive results, especially in cases of HIV coinfection. The RT-PCR method was proposed for measuring IFN- γ mRNA in the presence of specific MT antigens, ESAT-6 and CPF-10, demonstrating promising results, with a higher frequency of mRNA expressed in samples that were positive for LTBI. In addition to describing the process of standardization, implementation, and proposals for refining IFN- γ measurement, the present study also analyzed the epidemiology of tuberculosis cases in five different regions of the state of São Paulo. The results revealed a rate of 14.3% of positive cases for LTBI in the following regions: DRS III - Araraquara/São Carlos, XIII - Ribeirão Preto, VIII - Franca, XV - São José do Rio Preto, and V - Barretos, along with a descriptive analysis of the studied populations.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Latent Tuberculosis, HIV, IGRA-TB.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 01.** FORMAS CLÍNICAS CAUSADAS POR MICOBACTÉRIAS NÃO-TUBERCULOSAS EM HUMANOS.....página 5
- TABELA 02.** RELAÇÃO DE REAGENTE POR POÇO PARA REAÇÃO DE RT-PCR EM PROPORÇÃO 1:1 COM RNAM DE PBMC PÓS ESTÍMULO COM ANTÍGENOS TB1 E TB2, PRIMERS IFN- γ página 29
- TABELA 03.** RELAÇÃO DE REAGENTE POR POÇO PARA REAÇÃO DE DE RT-PCR EM PROPORÇÃO 1:1 COM RNAM DE PBMC PÓS ESTÍMULO COM ANTÍGENOS TB1 E TB2, GAPDH.....página 29
- TABELA 04.** CURVA DE ESTIMULAÇÃO DE IFN- γ NO INTERVALO DE 30 MINUTOS A 24 HORAS.....página 31
- TABELA 05.** INFLUÊNCIA DO REGIME DE INCUBAÇÃO COM E SEM AGITAÇÃO A 37°C.....página 32
- TABELA 06.** INFLUÊNCIA DO REGIME DE INCUBAÇÃO 37° X TA.....página 33
- TABELA 07.** INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DAS CÉLULAS PBMC SOBRE O RESULTADO DO TESTE QFT GOLD PLUS.....página 36
- TABELA 08.** QUANTIFICAÇÃO DO RENDIMENTO MÉDIO E GRAU DE PUREZA OBTIDO PELA EXTRAÇÃO DE RNAM DE CÉLULAS PBMC POR EXTRAÇÃO AUTOMATIZADA.....página 37
- TABELA 09.** VALORES DE $2^{-\Delta\Delta CT}$, OBTIDOS DAS MÉDIAS DAS TRIPLICATAS REALIZADAS DE CADA AMOSTRA EM CADA PERÍODO DE 30MIN, 2, 4, 6, 8, 10 E 24 HORAS.....página 38
- TABELA 10.** RELAÇÃO DO RESULTADO OBTIDO DE CASOS ENCAMINHADOS PARA DIAGNÓSTICO DE ILTB SEGUNDO IDADE.....página 40
- TABELA 11.** RELAÇÃO DO NÚMERO DE CASOS ENCAMINHADOS PARA DIAGNÓSTICO DE ILTB SEGUNDO IDADE E SEXO.....página 40
- TABELA 12.** QUANTITATIVO EM RELAÇÃO DO TIPO DE SOLICITAÇÃO ENCAMINHADOS PARA DIAGNÓSTICO DE ILTB SEGUNDO IDADE.....página 41

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01.** FLUXOGRAMA DE DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....página 21
- FIGURA 02.** DEMOSTRATIVO DE PROCESSEDIMENTO DE ESTIMULAÇÃO DE SANGUE TOTAL PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSE LATENTE SEGUINDO PROTOCOLO QUANTIFERON-TB GOLD PLUS (QTF®-PLUS) (QIAGEN).....página 23
- FIGURA 03.** REAGENTES DO TESTE QUANTIFERON-TB GOLD PLUS (QTF®-PLUS QIAGEN).....página 24
- FIGURA 04.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MODELO DE PLACA ADOTADO PARA EXTRAÇÃO E REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE RNAM DE IFN- γ página 27
- FIGURA 05.** CONTAGEM DE CÉLULAS PBMC EM CÂMARA DE NEUBAUER ONDE CÉLULAS VIVAS APRESENTAM COR AMARELADA¹ E MORTAS COR AZULADA² DEVIDO ADERÊNCIA DO CORANTE AZUL DE TRYPAN.....página 33
- FIGURA 06.** OBSERVAÇÃO A FRESCO DE PBMC + SFB EM MICROSCÓPIO INVERTIDO.....página 33
- FIGURA 07.** LÂMINA FIXADA DE PBMC* + SFB COM COLORAÇÃO HEMATOLÓGICA MAY GRUNWALD GIEMSA.....página 34
- FIGURA 08.** DISTRIBUIÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE $2^{-\Delta\Delta CT}$, OBTIDOS DAS MÉDIAS DAS TRIPLICATAS REALIZADAS DE CADA AMOSTRA EM CADA PERÍODO DE 30MIN, 2, 4, 6, 8, 10 E 24 HORAS.....página 36
- FIGURA 09.** RELAÇÃO CRESCENTE DO QUANTITATIVO DE EXAMES ENCAMINHADOS PARA DIAGNÓSTICO DE ILTB NO PERÍODO DE MAIO DE 2022 A JUNHO DE 2023.....página 38
- FIGURA 10.** PIRÂMIDE ETÁRIA DE CASOS DO SEXO FEMININO E MASCULINO ENCAMINHADOS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE IGRATB DO PERÍODO DE MAIO DE 2022 A JUNHO DE 2023.....página 40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A.C Antes de Cristo

AP-1 Proteína ativadora 1

BAAR Bacilo álcool-ácido resistente

BAAR Bacilo álcool-ácido resistentes

BCG Bacilo Calmette-Guérin

BCG Bacilo de Calmette e Guérin

BCG Bacilo de Calmette e Guérin

CFP-10 Culture filtrate protein 10

COVID-19 Corona Virus Disease 2019

CRT-AIDS Centro de Referência em HIV/Aids

CSFs fatores estimuladores de colônias

CT Cycle threshold

DDCCIST Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis

EPTB Tuberculose extrapulmonar

EROs Espécies reativas de oxigênio

ESAT-6 Early Secreted Antigenic Target

HIV Vírus da imunodeficiência humana

IAL Instituto Adolfo Lutz

IFNs Interferons

IFN- γ Interferon gamma

IGRA Interferon-gamma release assays

IL-1 Interleucina 1

IL-10 Interleucina 10

IL-11 Interleucina 11

IL-12 Interleucina 12

IL-13 Interleucina 13

IL-18 Interleucina 18

IL-4 Interleucina 4

IL-6 Interleucina 6

IL-8 Interleucina 8

ILs Interleucinas

LTB Tuberculose latente

IRAK-1 Quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1

IRAK-4 Quinase 4 associada ao receptor de interleucina-1

MBNT Micobactérias não-tuberculosas

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade

MT Mycobacterium tuberculosis

MyD88 Fator de diferenciação mielóide 88

NF- κ B Factor nuclear kappa B

NHANES National Health and Nutrition Examination Survey

NK Natural killer

OMS Organização Mundial da Saúde

PAMPs Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC Peripheral blood mononuclear cell

PPD Derivado proteico purificado

QTF®-Plus QuantiFeron-TB Gold Plus

RT-PCR Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SARS-COV-2 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

TACO Tryptophan Aspartate Rich Coat

TAK1 Proteína quinase 7 ativada por mitógeno

TAP Transportador associado à apresentação de antígeno

TB Tuberculose

TGFs fatores de crescimento

TGF- β Fator de transformação do crescimento beta

TH Linfócito T Helper

TLR Receptor Toll-Like

TLR Toll-Like

TNFs Fatores de necrose tumoral

TNF- α Fator de Necrose Tumoral alfa

TRAF6 Fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral

TST Tuberculin skin test

UTI Unidades de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	1
2- JUSTIFICATIVA	19
3- OBJETIVO	20
3.1- OBJETIVOS GERAIS.....	20
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4- MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
4.2- ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS.....	21
4.3- MÉTODOS E EXPERIMENTOS	22
4.3.1- EXTIMULAÇÃO EX VIVO	22
4.3.2- QUANTIFICAÇÃO DO IFN- γ POR ELISA.....	24
4.3.3- CURVA DE EXPRESSÃO E DOSAGEM DE IFN- γ	25
4.3.4- AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA E MODELO DE INCUBAÇÃO IDEAL	25
4.3.5- OBTENÇÃO DE PBMC.....	25
4.3.6- RENDIMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE PBMC	26
4.3.7- QUANTIFICAÇÃO DO IFN- γ COM CONCENTRADO DE PBMC.....	26
4.3.8- DESENHO DE PRIMERS IFN- γ RNAM.....	26
4.3.9- EXTRAÇÃO DE IFN- γ RNAM.....	27
4.3.10- AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR.....	28
4.3.11- ANÁLISE DE BANCO DE DADOS	29
4.3.12- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5- RESULTADOS OBTIDOS.....	30
5.1- CURVA DE EXPRESSÃO E DOSAGEM DE IFN- γ	30
5.2- AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA E MODELO DE INCUBAÇÃO IDEAL	31
5.3- RENDIMENTO E VIABILIDADE DE PBMC	33
5.4- QUANTIFICAÇÃO DO IFN- γ COM CONCENTRADO DE PBMC.....	34
5.5- QUANTIFICAÇÃO E GRAU DE PUREZA DE RNAM IFN- γ EXTRAÍDO DE CÉLULAS PBMC.....	36
5.6- CÁLCULO DE EXPRESSÃO DE RNAM DE IFN- γ	36
5.7- ANÁLISE DE BANCO DE DADOS E DELINEAMENTO EPIDEMIOLÓGICO.....	37
6- DISCUSSÕES.....	42
7- CONCLUSÕES.....	44
8- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	45
9- BIBLIOGRAFIA	46
10- APÊNDICES.....	51
11- ANEXO	102

1) INTRODUÇÃO

SARS-COV-2 E O IMPACTO NA EPIDEMIA DE TUBERCULOSE

A Tuberculose (TB) é uma doença infecto contagiosa transmissível decorrente da infecção humana pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MT), sendo a forma pulmonar a principal entre as demais que podem ocorrer. Segue a vários anos como principal causa de inúmeras complicações e uma das principais causas de óbito em todo o mundo. Até a pandemia do SARS-CoV-2, o MT era responsável pela maior gravidade infecciosa e a principal causa morte derivada de um único agente infeccioso, ficando apenas atrás do HIV (Vírus da imunodeficiência humana) em todo o mundo (OMS, 2022).

Ao final do ano de 2019, um surto de pneumonia emergente na cidade de Wuhan, na China, desencadeou uma pandemia de grandes proporções, decorrente do coronavírus 2, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus - 2* (SARs-CoV-2) altamente patogênico de origem zoonótica, responsável por quadro de síndrome respiratória aguda grave, denominada posteriormente como doença do coronavírus 2019 (COVID-19), segundo agente infeccioso e o ano de seu surgimento, progredindo para inúmeras complicações durante a infecção e sequelas graves após remissão do vírus (HU et al., 2021).

A pandemia se iniciou com a notificação de 27 casos de pneumonia severa na cidade de Wuhan em 2019, chegando a pico máximo de casos diários em 19 de dezembro de 2022 com mais de 44 milhões de casos confirmados mundialmente, em um único dia, totalizando acima de 772 milhões de casos até dezembro de 2023, com quase 7 milhões de óbitos confirmados (HU et al., 2021; OMS, 2023).

Durante o período de quase 3 anos de pandemia do SARs-Cov-2, diversas estratégias de contenção do vírus foram adotadas, como o uso de máscaras, lavagem frequente de mãos, distanciamento social e quarentena. O período apresentou ameaça extraordinária para a saúde pública afetando populações pela gravidade da infecção do vírus que em inúmeros casos era necessária a internação e intubação com permanência do paciente em UTI hospitalares. O agravamento de casos ocorria sem distinção de idade, sexo, etnia, e condições de saúde já pré-existentes se tornaram um fator de risco importante para complicações severas. Em conjunto com todos os acontecimentos, houveram implicações na saúde mental com o aumento significativo de relatos de casos de ansiedade, depressão, angústia, distúrbios do sono e transtornos de estresse pós-traumático, durante os períodos de confinamento e isolamento social. Não apenas setores da saúde foram afetados pela pandemia, sendo relatados inúmeros

impactos aos âmbitos econômico, alimentício, educacional, turístico e até mesmo o aumento de relatos de violência doméstica (ONYEAKA et al., 2021).

Estima-se que durante a pandemia da COVID-19, mesmo com a utilização de máscara e outras intervenções para contenção do vírus SARs-Cov-2, cerca de 10,6 milhões de pessoas chegaram a desenvolver sintomas e adoeceram com tuberculose em 2021, um aumento de 4,5% de 10,1 milhões em relação ao ano de 2020. A taxa de incidência de novos casos por 100.000 habitantes por ano aumentou 3,6% entre 2020 e 2021. Apesar de apresentar pouca recombinação e uma baixa taxa de mutação, o aumento significado de novos casos chama a atenção à estudos de sequenciamento, aparecimento de novos mecanismos de virulência e resistências a fármacos, como também estudos epidemiológicos (OMS, 2022; BAÑULS et al., 2015; BENAVENTE et al., 2015).

Majoritariamente o aumento significativo de casos de tuberculose entre os anos de 2020 e 2021 está intimamente ligado a pandemia da COVID-19, devido à redução severa de diagnósticos para quadros de TB, consequentemente falta de intervenções medicamentosas, devido a quantidade substancial de casos de infecção por Sars-COV-2 e sua gravidade, que acarretou a intensa sobrecarga de todos os departamentos relacionados a saúde, ficando em segundo plano o diagnóstico e controle não apenas da tuberculose mas inúmeras outras patologias (RAMANATHAN et al., 2022).

No Brasil, no ano de 2017 foi criado o Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose na tentativa de se adequar a metas propostas pela OMS (Organização Mundial da Saúde) que estabeleceu três metas a serem alcançadas até o ano de 2035: reduzir a incidência da TB em 90%, reduzir o número de mortes pela doença em 95% e zerar o número de pessoas afetadas pelos custos catastróficos em decorrência da TB. O plano foi arquitetado pelo Ministério da Saúde e organizado em quatro fases de execução 2017-2020, 2021-2025, 2026-2030, 2031-2035, e as metas da OMS foram adequadas ao cenário nacional, em que se espera alcançar menos de 10 casos por 100 mil hab. e limitar o número de mortes anuais para menos de 230 até 2035 (BRASIL, 2021).

Entre os anos 2015 e 2019 o coeficiente de incidência estava em ritmo crescente de casos, porém invertendo o perfil epidemiológico entre 2019 e 2020, antes da pandemia da COVID-19, com redução de 12,1% de casos de tuberculose passando-se de 37,9 casos por 100 mil habitantes - 79.784 casos, para 33,3 casos por 100 mil habitantes - 70.554 casos, durante o período de 2019 e 2020. Durante a pandemia, o coeficiente de incidência voltou a crescer alcançando 34,9 casos por 100 mil habitantes - 74.385 casos em 2021, seguindo para 2022 com perfil ascendente com aumento para 36,3 casos por 100 mil habitantes - 78.057 casos. A

pandemia da COVID-19 exerceu influência e impacto negativo no combate a casos de TB, distanciando a meta de redução de casos da expectativa global (BRASIL, 2021).

HISTÓRIA, ORIGENS E PRIMEIROS AVANÇOS

O gênero *Mycobacterium* compreende mais de 170 espécies, composto em sua maioria por organismos ambientais saprófitos do solo que desempenham função vital na decomposição de matéria vegetal morta importantes no ciclo de enriquecimento do solo, e retorno de nutrientes e minerais ao meio ambiente, presentes antes mesmo da evolução do reino animal. A medida que répteis, anfíbios, peixes, aves e mamíferos foram surgindo nas árvores filogenéticas, as micobactérias evoluíram para a capacidade de parasitar células de espécies de sangue frio até mamíferos de sangue quente (FEDRIZZI et al., 2017; GAGNEUX, 2018).

Os primeiros relatos de infecção humana por microbactérias datam de 2.000 aC, na Índia, sendo o patógeno classificado como *Mycobacterium leprae*, apenas em 1874, pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, dando origem ao nome “doença de Hansen”, variando para hanseníase, popularmente conhecida como lepra. Acredita-se que o *Mycobacterium leprae* tenha se separado do *Mycobacterium tuberculosis* a cerca de 36 milhões de anos, trazendo divergências importantes quanto a infectividade, pela predileção do *M. leprae* por células da pele e do sistema nervoso, acarretando sintomatologia diferencial descrita por manchas cutâneas hipopigmentadas ou eritematosas com perda definitiva de sensibilidade, nervos periféricos espessados e bacilos álcool-ácido resistentes detectados em esfregaços de pele ou material de biópsia (BHAT; PRAKASH, 2012; DJELOUADJI; RAOULT; DRANCOURT, 2011).

O processo evolutivo da espécie humana com o consumo de carne animal, progredindo para criações de corte, estreitando o contato homem e gado, foi um fator importante para a transmissão da micobactéria causadora da tuberculose bovina, *Mycobacterium bovis*, para seres humanos, através da inalação de gotículas infectadas com bacilos de bovinos portadores do *M.bovis* e do consumo de produtos lácteos contaminados e não pasteurizados. Estima-se que cerca de 30% dos casos de tuberculose da Europa no início da década de 90 foram causadas pelo patógeno da tuberculose bovina (O'REILLY; DABORN, 1995; RODWELL et al., 2010).

É provável que o MT tem acompanhado a espécie humana ao longo dos séculos, desde a saída do homem do continente africano durante a colonização mundial, tingindo seu ápice epidêmico durante os séculos XVIII e XIX. O período industrial Europeu é citado como grande marco para aumento de casos de tuberculose devido à alta concentração populacional em

ambientes socioeconômicos desfavoráveis. A tuberculose não pode ser considerada uma doença pandêmica, por ter sido disseminada por todo o globo, com picos de incidência em períodos históricos diferentes, porém atualmente tem-se conhecimento de sua presença nos diversos continentes globais (BARBIER; WIRTH, 2017; STEAD, 1997).

Descoberto em 1882 pelo bacteriologista alemão Robert Koch, o *Mycobacterium tuberculosis* foi primeiramente descrito como Bacilos de Koch, que passou a ser isolado, cultivado e inoculado em animais de laboratório dando início a uma nova era de pesquisas. Desde o seu isolamento, estudos tem corrido durante décadas resultando no desenvolvimento de testes cutâneos capazes de detectar a positividade para portadores do MT, conhecido como teste de purificado proteico derivado (PPD), onde a proteína tuberculina específica de Micobactérias é aplicada na derme, e a resposta inflamatória produzida no local da aplicação, guia a análise para a conclusão do resultado, utilizado até os dias atuais para o diagnóstico de casos de tuberculose ativa e latente. A primeira tuberculina descoberta e purificada foi denominada como tuberculina de Pirquet e Mantoux. Outro avanço importante gerado pelos estudos com o bacilo foi a produção da vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin) descoberta por Albert Calmette e Camille Guérin. Um dos primeiros fármacos e serem estudados para o combate a infecção pelo MT foi a estreptomicina Selman Waksman, dando início a avanços e produção de outras drogas antituberculosas. O prêmio Nobel de Medicina de 1905 foi entregue a Robert Koch, tamanha importância da descoberta e capacidade de isolamento do bacilo (GRADMANN, 2001).

Após os primeiros relatos de Koch, os bacilos tuberculínicos foram descritos como álcool-ácido resistentes (BAAR), por conta da grande dificuldade para coloração das estruturas bacterianas por métodos convencionais de coloração como o GRAM, onde a parede celular do microrganismo é corada devido a ligação dos corantes, Cristal violeta e Fucsina às camadas de peptideoglicano presentes na parede celular. Essa dificuldade é devido a espessa camada da parede celular presente em micobactérias, composta internamente por polímeros de arabinose e galactose, seguida de outra camada formada por ácidos micólicos, e uma terceira camada mais superficial de estrutura lipídica constituída por sulfolipídios e micosídeos, que dificultam a ligação dos corantes de modo convencional (MOLINO et al., 2002).

A descoberta do MT foi anunciada em 24 de Março de 1882 em artigo publicado na revista alemã “Berliner Klinische Wochenschrift” trazendo o título “Die Ätiologie der Tuberkulose” traduzido para “A Etiologia da Tuberculose” onde Robert Koch descrevia o método de coloração de lâminas fixadas para observação em microscópio, utilizado para coloração de micobactérias através da utilização de solução alcoólica concentrada com 10% de

azul de metileno, permanecendo nessa solução de 20 a 24 horas. Foi descrito que quando aquecidas a 40°C as lâminas na presença do corante, esse tempo poderia ser reduzido a meia hora. Ao decorrer dos anos outros pesquisadores conduziram melhorias à técnica proposta por Koch, até a modificação mais conhecida e utilizada atualmente como uma das ferramentas utilizadas no diagnóstico da tuberculose, denominada coloração de ZIEHL-NEELSEN que reúne contribuições do patologista alemão Friedrich Carl Adolf Neelsen e o bacteriologista alemão Franz Ziehl, publicada na revista Lancet de 9 de abril de 1887 (BISHOP; NEUMANN, 1970).

Atualmente existem cerca de 13 espécies de micobactérias não-tuberculosas (MBNT) descritas como capazes de infectar tecidos humanos, porém a suscetibilidade a infecção varia conforme as diferentes populações e etnias. Muitas das MBNT não são obrigatoriamente transmitidas pelo sistema respiratório, estando presentes no meio ambiente, solo, água e matéria orgânica. Foram descritas diversas formas de doenças causadas pelas MBNT, acometendo pulmão, gânglios, pele, articulações, tendões e de forma disseminada por todo o hospedeiro, com diferentes formas clínicas (tabela 01) (CAMPOS, 2000).

Tabela 01. Formas clínicas causadas por micobactérias não-tuberculosas em humanos

Forma clínica	Etiologia frequente	Etiologia incomum	
Doença pulmonar	Complexo <i>M. avium</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. shimodii</i>
	<i>M. kansasii</i>	<i>M. szugulai</i>	<i>M. haemophilum</i>
	<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. smegmatis</i>
	<i>M. xenopi</i>	<i>M. celatum</i>	
	<i>M. malmoense</i>	<i>M. asiaticum</i>	
Linfadenite	Complexo <i>M. avium</i>	<i>M. fortuitum</i>	
	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. chelonae</i>	
	<i>M. malmoense</i>	<i>M. abscessus</i>	
		<i>M. kansasii</i>	
Doença Cutânea		<i>M. haemophilum</i>	
	<i>M. marinum</i>	Complexo <i>M. avian</i>	
	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. kansasii</i>	
	<i>M. chelonae</i>	<i>M. nonomoeenicum</i>	
	<i>M. abscessus</i>	<i>M. smegmatis</i>	
Doença disseminada	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. haemophilum</i>	
	Complexo <i>M. avium</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. conspicuum</i>
	<i>M. chelonae</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. marinum</i>
	<i>M. kansasii</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. fortuitum</i>
	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. simiae</i>

Fonte: Adaptado de CAMPOS, 2000.

MORFOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

A tuberculose em majoritariamente dos casos é caracterizada pela infecção do tecido pulmonar por bacilos tuberculínicos que são facilmente disseminados através de espirros e gotículas salivares, projetados pelo hospedeiro em quadro ativo da doença, sendo a forma pulmonar a manifestação clínica mais frequente. Os bacilos tuberculínicos são capazes de atingir as vias aéreas inferiores rapidamente, devido a seu pequeno tamanho, com cerca de 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura, finos de formato reto ou ligeiramente curvos, pertencendo a filo Actinobactéria, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae, família Mycobacteriaceae e gênero Mycobacterium (BAÑULS et al., 2015; KOCH; MIZRAHI, 2018).

No Brasil, dentre os meios sólidos, utiliza-se Lowenstein Jensen (LJ) e Ogawa Kudouh (OK), à base de ovo para cultivo de micobactérias. O bacilo apresenta ciclo intracelular facultativo de crescimento lento com tempo de duplicação de 15 até 18 h em cultivo in vitro, com condições ideais de cultura à temperatura de 37°C, pH = 7 levando de uma a 3 semanas para que colônias visíveis apareçam. As colônias de MT apresentam morfologia descrita como granulosa, com aspecto de migalhas de pão ou de couve-flor, secas, branco-acinzentadas ou amarelo-acastanhadas. São bacilos imóveis, sem cápsula e não formam esporos (SIMEÃO et al., 2009; MOLINO et al., 2002).

Apesar de imóveis, estudos recentes relatam a expressão de pili, apêndices filamentosos presentes na superfície bacteriana, importantes em vários processos bacterianos. O MT tem a capacidade de expressar o curli pili, ferramenta importante para adesão e invasão de macrófagos do hospedeiro, e o pili tipo IV, também descrito como um fator de adesão a células (RAMSUGIT; PILLAY, 2015).

As vias aéreas são consideradas a porta de entrada do agente infeccioso, porém inúmeros outros tecidos podem ser infectados através da disseminação pelos gânglios linfáticos e pela via hematogênica, acarretando quadros de tuberculose extrapulmonar (EPTB) já descrito em diversos sítios anatômicos como gânglios linfáticos, pleura, sistema geniturinário, ossos e articulações, sistema gastrointestinal, sistema nervoso central, coluna, tecido epitelial e olhos. O diagnóstico para casos de EPTB agrava a dificuldade analítica devido à ausência de metodologias específicas para outros tecidos, sendo a busca direta pelo agente etiológico muitas vezes invasiva e inviável, limitando-se em muitos casos à diagnósticos de imagem (PANG et al., 2019); ROLO et al., 2023).

CASCATA DE TRANSMISSÃO DA TUBERCULOSE

A via de transmissão e porta de entrada ao MT são as vias aéreas. Devido a seu pequeno diâmetro os bacilos são facilmente disseminados através de espirros e gotículas salivares, projetados pelo hospedeiro em quadro ativo da doença, e o sucesso da infecção será determinado pela resposta imune do novo indivíduo contaminado. A cascata de transmissão da tuberculose pode ser resumida em: 1- um paciente fonte, com quadro ativo de tuberculose, 2- gera partículas infecciosas contendo MT através da fala, tosse e espirro 3- capazes de manter-se viáveis no ambiente por certo tempo considerável que 4- são inaladas por um indivíduo suscetível, 5- podem ser infectado e 6- progredir para o desenvolvimento da tuberculose (CHURCHYARD et al., 2017).

O sucesso da infecção e o desenvolvimento da forma pulmonar da TB dependem de quatro etapas: a fagocitose dos bacilos no tecido alveolar, sua multiplicação intracelular, a fase latente da infecção e finalmente, a infecção pulmonar ativa. Em diversos casos o paciente pode progredir para diferentes cenários clínicos: com a presença de sinais e sintomas ou permanecendo assintomático, porém portador do bacilo em forma latente com reativação após longos períodos. Na infecção ativa o paciente apresenta febre vespertina, sudorese noturna, cansaço, tosse seca e desconforto respiratório. Com a evolução da infecção ativa e extensão da lesão tecidual ocasionada pelo ciclo de replicação do MT, se inicia a tosse com sangue, sinal clássico de quadros de tuberculose (BAÑULS et al., 2015).

Fatores de risco para o desenvolvimento da tuberculose podem acarretar maior propensão ao desenvolvimento de casos e dificuldades no manejo e tratamento. Alguns dos principais fatores de risco associados à redução da efetividade do sistema imune são listados como a diabetes, tabagismo, uso de droga lícitas como o álcool de forma excessiva, uso de droga ilícitas, e a infecção pelo vírus HIV. Outro fator importante em relação a cadeia de transmissão e risco, é o contato família e social frequente com casos de tuberculose ativa, devido ao alto risco de infecção com taxa de infectividade de 22%, estimando-se que um portador de TB ativa pode infectar, em média, de 10 a 15 pessoas durante o período de um ano (CAMPOS, 2006; SILVA et al., 2021).

O médico canadense, William Osler, já ressaltava que o fator de risco importante para a infecção por MT era o contato pessoa e pessoa, em 1909, e que todos os que se misturavam com pacientes com tuberculose eram infectados, mas permaneciam bem desde que cuidassem de si mesmos e mantivessem o solo em condições desfavoráveis ao crescimento da semente, fazendo referência que hábitos pessoais de cada indivíduo poderiam influenciar o não

desenvolvimento da semente, o *Mycobacterium tuberculosis* (DOBBS & KIMMERLING, 2008 apud CHURCHYARD et al., 2017).

RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO FRENTE AO NOVO BACILO INVASOR

Com a chegada nas vias áreas inferiores, os macrófagos alveolares são as primeiras células a serem infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, dando início a primeira sinalização e recrutamento de outras células como resposta, denominada de imunidade inata. O decorrer da resposta a infecção já envolve mecanismo da resposta imune adaptativa que leva cerca de 11 a 14 dias para que neutrófilos, monócitos e linfócitos T sejam ativados pela apresentação dos novos antígenos do MT, e transportados do timo e gânglios linfáticos até os alvéolos pulmonares. É citado como um possível fator de contribui para a implantação da doença, o crescimento lento do MT, como também a capacidade do bacilo de se desenvolver dentro do fagossomo de macrófagos em alvéolos pulmonares, escapando da resposta imune tanto celular como humoral. A imunidade inata é uma primeira linha de resistência contra patógenos microbianos e está envolvida na ativação de respostas imunes adaptativas, como também na reparação de tecidos (BUCCINI; CARDOSO; FRANCO, 2021; COHEN et al., 2019b; POTTER, 2008).

A resposta imune desencadeada no novo hospedeiro, em presença do bacilo, segue passos normalmente visto quando o sistema imune humano entra em contato com antígenos desconhecidos, e em primeiro momento é classificada como imunidade inata. Essa fase inicial da infecção é conhecida pela ação de células mononucleares que tem como principal primeira função a fagocitose dos antígenos presentes no tecido. As células mononucleares fagocitárias como os macrófagos, derivados de monócitos circulantes no sistema sanguíneo, atravessam as barreias epiteliais até a chegada no foco na infecção, e também células dendríticas, são responsáveis por fagocitar, processar, e apresentar os novos antígenos a outras células mononucleares do sistema imune, para adaptação ao novo agente invasor (BEUTLER, 2004).

É possível destacar outra importante função dos macrófagos durante a resposta imune adaptativa, além da fagocitose e apresentação de antígenos, a elaboração de citocinas com ação quimiotáticas. Essas citocinas são produzidas pelas células, desencadeadas pelo processo de fagocitose, e são descritas como sinais biológicos responsáveis por informar que outras células estão sendo necessárias no foco infeccioso, e serão guiadas até o local da infecção. Após o processamento dos novos antígenos, a resposta imune pode se tornar extremamente específica ao agente infeccioso à qual foi ativada, denominada como imunidade adaptativa, mas esse

processo não é exclusivo apenas ao MT, e está presente no processo de contenção a qualquer agente infeccioso invasor (BEUTLER, 2004; VANKAYALAPATI; BARNES, 2009).

O reconhecimento dos fagócitos frente aos antígenos, no caso bacterianos, é realizada através de receptores de superfície nativos expressos em inúmeras células do sistema imune, como em monócitos e células dendríticas, mas também presentes em células natural killer (NK), mastócitos, basófilos e eosinófilos. Esses receptores são denominados de Toll-Like (TLRs), uma família de receptores de reconhecimento padrão passíveis de ligação em diversos fragmentos bacterianos chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ausentes em qualquer composição de moléculas e tecidos humanos, reconhecidos como fragmentos não próprios que desencadeiam as primeiras respostas do sistema imune inato (DELNESTE; BEAUVILLAIN; JEANNIN, 2007; ZHANG; LIANG, 2016).

Os receptores TLRs são proteínas transmembrana, capazes de traduzir a ligação com PAMPs em sinais intracelulares que impulsionam a expressão de genes pró-inflamatórios, que são transcritos em RNA mensageiros, traduzidos por ribossomos, sintetizando proteínas solúveis denominadas de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. A transdução de sinal TLR + PAMPs podem ser descrita por um longa cascata de sinalizações, onde outras proteínas e ligantes, denominados de fatores de transcrição, vão se associando no ambiente intracelular até a ativação dos mecanismo moleculares de síntese proteica. A primeira cascata de sinalização se inicia pela ligação do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), na porção intracelular do TLR, que recruta quinase associada a IL-1R (IRAK-1) e IRAK-4 e fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6), sendo o complexo IRAK-1+TRAF6 dissociado, para ligação de outro complexo composto por quinase transformada ativada pelo fator de crescimento β (TAK1) e proteínas de ligação, TAK1 1 (Tab1) e 2 (Tab2). Esse último complexo então formado leva à ativação de TAK1, que por sua vez ativa os fatores de transcrição fator nuclear- κ B (NF- κ B) e proteína ativadora 1 (AP-1) (UEMATSU; AKIRA, 2007).

A complexa cadeia ativada pelo reconhecimento de antígenos é uma fração do grande processo denominado inflamação. As manifestações sistêmicas clássicas descritas durante a inflamação são dor, rubor, calor, edema e por fim, perda de função. Cada um dos sinais clássicos da inflamação estão intimamente ligados a ação em conjunto de citocinas e células envolvidas em cada fase, e dependendo de sua função, as citocinas também podem ser classificadas como pró-inflamatórias e anti-inflamatórias regulando o equilíbrio da modulação do sistema imune. As citocinas podem ser classificadas em diversas categorias, incluindo fatores de necrose tumoral (TNFs), interleucinas (ILs), linfocinas, monocinas, interferons (IFNs), fatores

estimuladores de colônias (CSFs) e fatores de crescimento (TGFs) (LIU et al., 2021; MANTOVANI; GARLANDA, 2023).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular podendo variar de 6 até 70 kDa, e são consideradas biomarcadores para muitas doenças, desempenham um papel importante na avaliação de processos fisiológicos e patológicos. A quantificação de citocinas pode ser realizadas em diferentes fluidos corporais como sangue total, plasma, soro, lágrimas, urina e fezes, fluidos intersticiais e líquidos cefalorraquidianos, e fornecer informações clínicas em relação ao estado imunológico do hospedeiro, se há ou não a presença de processos infecciosos e até mesmo autoimunes (LIU et al., 2021).

Deve-se manter o equilíbrio no recrutamento e ativação de células do sistema imune mediado por citocinas pró-inflamatórias e a ação antagonista mediada por citocinas anti-inflamatórias. A resposta pró-inflamatória excessiva pode levar à inflamação crônica, perturbando as vias responsáveis pela homeostase biológica. Antígenos bacterianos são capazes de ativar a liberação de IL-8, IL-12, IL-18, IFN- α / γ e TNF- α , fatores pro-inflamatórios. Citocinas anti-inflamatórias apresentam funções imunorreguladoras que inibem a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias e as principais são listadas por IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 e TGF- β (OPAL; DEPALO, 2000; BOSHTAM et al., 2017).

A principal classe de citocinas induzida pela infecção pelo MT é do interferon gama. Todos os interferons, tem como função ativar cascatas de transcrição, após ligação IFN- γ e seu receptor IFN- γ R, onde genes de combate a bactérias intracelulares são expressos, desempenhando papel importante na ativação de macrófagos. Além disso, foi demonstrado que o IFN- γ é parte integrante de vários métodos antibacterianos, como a fusão fagossomo-lisossomo. O IFN- γ também é classificado como uma das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na manutenção da estrutura do granuloma juntamente com IL-17, TNF- α e regulação anti-inflamatória ocorrer pela ação de IL-10 e TGF- β (GHANAVI et al., 2021; POTTER, 2008; LIN; FLYNN, 2018).

Os linfócitos são a classe de células mais importante presente na resposta imune adaptada ao MT e ambas as linhagens CD4⁺ Th1 e CD8⁺ Tc1 estão envolvidos na cascata de produção de IFN- γ . O processo de apresentação de antígenos através de moléculas MHC pode ser realizada por diferentes linhagens celulares. A via importante a ser ressaltada em infecções pelo MT, ocorre pela apresentação de novos antígenos do MT aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ através da ligação do complexo MHC/antígeno TB a moléculas receptoras de linfócitos T (TCR) (GROTZKE; LEWINSOHN, 2005)

A classe dos interferons (IFN) pode ser dividida em três subtipos principais: alfa, beta e gama. A classificação nos 3 grandes grupos leva em consideração diferenças nas sequências de aminoácidos, propriedades físico-químicas e indução de sua produção por diferentes tipos de células, vírus, bactérias, antígenos e mitógenos. Em primeiro momento é liberado precocemente por células natural killers (NK), fundamental para ativação de macrófagos. A grande maioria das células NK são responsáveis por ativar a apoptose de células autólogas infectadas, pertencendo a classe de linfócitos CD3- CD56+ granulares, com 90-95% da população exercendo função citotóxica, e apenas de 5-10% são responsáveis pela produção de IFN- γ (VANKAYALAPATI; BARNES, 2009).

A via ativada pela fagocitose é o processamento dos bacilos bacterianos engolfados, que passam pelo processo de digestão no interior dos fagossomos, invaginações do próprio citoplasma celular, que é agregado a vesículas digestivas presentes no meio intracelular denominados de lisossomos. A junção entre as duas vesículas leva o nome de fagolisossomo, e enzimas digestivas são as responsáveis pela fragmentação do bacilo. Partes proteicas derivadas da digestão do agente infeccioso são transportadas pela ação de outra proteína de membrana do retículo endoplasmático denominada TAP (transportador associado à apresentação de antígeno), responsável pela permeação das frações proteicas para o interior do retículo, onde proteínas de superfície denominadas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) são aderidas aos antígenos bacterianos, e carregadas para serem exposta novamente para o meio extracelular, porém agora agregada a molécula de MHC (NEEFJES et al., 2011).

A interação dos linfócitos T CD4+ Th1 ocorre através do MHC do tipo II e em CD8+ Tc1 em MHC do tipo I. As denominações CD4 e CD8 fazem referência aos ligantes de superfície presentes no exterior da superfície de cada membrana celular, e podem ser consideradas moléculas acessórias que auxiliam na maior estabilização e eficácia do contato MHC/TCR. Produzidos na medula óssea, os linfócitos migram para o timo onde ocorre o processo de maturação, apresentações de antígeno acontecessem e as subpopulações são definidas pelo conjunto de ligantes CD de superfície. As denominações Th e Tc faz referência a função que cada linhagem de células será responsável por realizar, sendo o linfócito T Helper (Th) o perfil denominado para linfócitos CD4+ responsável pela produção de citocinas auxiliares da resposta imune adaptativa. Cada perfil de citocinas produzido determina uma linhagem celular diferente, como por exemplo a classe de linfócitos responsáveis pela produção de citocinas pro-inflamatórias denominados Th1 são produtores IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Já CD4+ que produzem a interleucina 17 (IL-17) leva a denominação Th17, Th9 o produtor de interleucina 9 (IL-9) e linfócitos Th2 são considerados anti-

inflamatórios pela produção de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10). Já os linfócitos T CD8⁺ além de produzirem TNF- γ e IFN- γ possuem capacidade citotóxica, ativando a apoptose de células infectadas também pelo reconhecimento de antígenos via MHC (PARRA-ORTEGA et al., 2019).

Bactérias de metabolismo intracelular, evoluíram para a capacidade de se multiplicar dentro de células epiteliais do hospedeiro como ferramenta de escape da ação do sistema imune. O MT pode ser classificada como uma bactéria intracelular, e seu diferencial é a capacidade de multiplicação dentro de células fagocíticas dificultando a competência do sistema imune em combater-la. A capacidade do desenvolvimento intracelular do MT é devido a dois principais fatores de virulência de antígenos MT específicos, ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target) e CFP-10 (culture filtrate protein). Tem sido demonstrado que a proteína ESAT-6 exerce a função de induzir a apoptose de macrófagos auxiliando na liberação do bacilo do meio intracelular, como também o CFP-10 (culture filtrate protein), responsável pela lise do fagossomo e escape do bacilo, impedindo que vesículas digestivas denominadas fagolisossomos se agreguem ao fagossomo, dificultando a digestão, processamento, e apresentação dos novos antígenos bacterianos. Alguns estudos ainda elucidam que podem existir a interação entre ambas as proteínas tuberculinicas e o complexo formado ESAT-6/CFP-10 ser capaz de inibir a produção de EROs, espécies reativas de oxigênio produzidas por fagócitos, sendo uma das ferramentas também presentes na resposta imune inata (MARTIN; CAREY; FORTUNE, 2016).

Além da inibição da produção de EROs, o MT também produz o cátion amônio (NH₄⁺) de pH básico, que proporciona a neutralização da acidificação carregada por fagolisossomos dentro do fagossomo. Outra proteína importante também transcrita pelo MT é denominada de TACO (Tryptophan Aspartate Rich Coat), e também inibe a fusão do fagossomo aos lisossomos. As proteínas ESAT-6 e CFP-10 são específicas e produzidas pelo MT, dessa forma em dado momento, quando certo fagócito completa o ciclo de processamento do agente infeccioso, ambas poderão ser apresentadas por células apresentadoras de antígenos por meio do MHC, como parte da resposta imune adaptativa (ANAND; KAUL, 2005).

O combate à infecção pelo MT segue uma sequência de eventos extremamente similar e bem definida. Apesar da alta eficácia do sistema imune, certos mecanismos de escape se tornam importantes fatores para gravidade de casos de tuberculose. A capacidade de manutenção metabólica do bacilo dentro da complexa estrutura formada ao redor dos focos infecciosos do MT denominada de granuloma é um achado clínico clássico e responsável pela gravidade das lesões teciduais observadas em quadros ativos de tuberculose. Essa estrutura é composta em

seu interior por macrófagos diferenciados, que se fundem para formação de células gigantes multinucleadas, cercadas por uma borda de linfócitos e granulócitos, como neutrófilos, e com o passar do tempo podem ser recobertos por uma camada densa de fibroblastos para contenção do bacilo. A formação do granuloma pode ocorrer tanto em focos infecciosos como não infecciosos, não sendo exclusivo apenas como infecções por MT (SAUNDERS; COOPER, 2000, p. 334 - 341 apud CHASTELLIER, 2009).

Há muito a se esclarecer sobre os fatores que influenciam a formação do granuloma, mas apesar disso é um achado clínico clássico em infecções pelo MTssss, tanto em infecções pulmonares e extrapulmonares. Sua configuração celular não é estática, ou seja, existe a dinâmica entre células entrando e saindo da estrutura, e esse fator agrava a infectividade do MT. No primeiro momento de início da formação, o granuloma genuinamente desempenha a capacidade de conter o bacilo no foco infeccioso, contudo e devido a capacidade de multiplicação dentro de macrófagos, o recrutamento dessas células para a formação da estrutura do granuloma acarreta no maior número de macrófagos infectados, e pela dinâmica que existe na configuração estrutural, macrófagos infectados levam o MT para outros locais além do foco inicial de infecção (RAMAKRISHNAN, 2012).

É de conhecimento que o MT é altamente adaptado à vida dentro do granuloma, que apresenta interior de tecido necrótico denominado “caseum”, necrose tecidual coagulativa semelhante a coalhada. O escape do interior dessa estrutura leva a proliferação do bacilo a áreas ainda maiores do tecido, porém outro fator de risco importante nos quadros de tuberculose é o desenvolvimento da forma crônica da infecção, com a presença de bacilos vivos dentro da estrutura do granuloma, que pode ocorrer a reativação após anos sem a presença de sinais e sintomas antecedentes, denominada de forma latente da infecção (MARTIN; CAREY; FORTUNE, 2016).

O desenvolvimento da forma latente da infecção é descrito como principal fator de atenção a casos de tuberculose, devido à ausência de sinais e sintomas da infecção, com a manutenção do bacilo no interior dos granulomas. A dinâmica celular envolvida na manutenção do granuloma pode ser afetada por quadros de imunossupressão onde os monócitos, juntamente com neutrófilos, outras células polimorfonucleares, e linfócitos são recrutados para outro foco infeccioso secundário, migrando da estrutura do granuloma como contenção de outros agentes, facilitando o escape do bacilo que inicia quadro ativo da infecção com a presença de sinais e sintomas (BOOM; SCHAIBLE; ACHKAR, 2021).

EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE LATENTE

A importância do diagnóstico e prevenção da infecção ainda na forma latente é devido a capacidade do *Mycobacterium tuberculosis* permanecer por décadas sem o desenvolvimento de sintomas, dessa forma, indivíduos assintomáticos sem tratamento serem passíveis de desenvolver a infecção ativa são importantes reservatórios do bacilo (HOUBEN; DODD, 2016).

Acredita-se que aproximadamente 2 bilhões de indivíduos estão infectados pela forma latente do MT. Estima-se que a cerca de 20 anos, um terço da população mundial está acometida pela tuberculose latente (TBL) fazendo referência a importância para a prevenção devido à alta distribuição global, e mortalidade quando progride para forma ativa, ultrapassando quase o dobro do número causado pelo vírus HIV, responsável por 680 mil mortes registradas no ano de 2020 (OMS, 202; BEHR et al., 2021).

Um estudo mais apurado selecionando 88 estudos de 36 países apresentou a prevalência global de ILTB significativa e mais precisa presente em um quarto da população mundial, com diagnósticos confirmados através de testes específicos (IGRA e TST) para o quadro latente, elegíveis ao tratamento. Apesar da necessidade de grupos maiores serem necessários para afirmar com mais segurança a frequência da ILTB, revisões sistêmicas já trazem uma visão do panorama da epidemiologia global (COHEN et al., 2019).

Mesmo com distribuição de casos não uniforme mundialmente e em cada país, regiões específicas serem mais acometidas que outras ou apresentar maior número de relatos de novos casos, a alta prevalência de ILTB é vista como uma barreira crítica para a erradicação global da TB, estimando-se que os casos de ILTB gere 16,5 casos por 100.000 habitantes no ano de 2035 e 8,3 novos casos de TB ativa por 100.000 no ano de 2050 (BEHR et al., 202; HOUBEN e DODD, 2016).

Com cerca de 300 milhões de habitantes, estima-se que 2,7% da população dos EUA, ou seja 8,6 milhões de pessoas, apresentavam quadros de ILTB no ano de 2015. A prevalência estimada de ILTB entre pessoas nascidas nos EUA foi de 1,0% e entre pessoas não nascidas nos Estados Unidos foi de 13,9%. Entre as pessoas nascidas nos Estados Unidos, a maior prevalência de ILTB foi em pessoas com idade ≥ 65 anos. Entre pessoas não nascidas nos Estados Unidos, a maior prevalência de ILTB foi estimada em pessoas com idade entre 45 e 64 anos. Com base nos dados do National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), estima que até 13 milhões de pessoas nos Estados Unidos apresentam atualmente a infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MIRZAZADEH et al., 2021).

A Prevalência da Infecção Latente por TB no Oriente Médio e África foi relatada em 31 artigos científicos de dez países dessas regiões e relataram a prevalência de casos de ILTB em 41,78% das populações estudadas, sendo 33,12% e 32,65% em homens e mulheres, respectivamente, com prevalência de 0,44% em crianças, 3,37% adolescentes e 43,81% dos casos relatados em adultos. Já na região da Europa prevalência de ILTB foi estimada em 13,7% da população (BARRY, 2021; GUTHMANN; HAAS, 2019).

Na América Latina as maiores altas de casos no ano de 2021 estavam presentes no Haiti com 159 casos por 100.000 habitantes, Peru 130/100.000, Bolívia 109/100.000, Guiana 83/100.000. Em El Salvador, Paraguai, Equador, Brasil e Venezuela os casos foram registrados de 49 a 47 casos a cada 100.000 habitantes. Uruguai e Argentina apresentaram frequência de casos de 32 a 30 casos / 100.000, México 25/100.000, Chile 16/100.000 e a maior baixa registrada foi de 1 caso a cada 100.000 habitantes no Porto Rico (OMS)

Altas taxas de prevalência de ILTB foram documentadas em 31,2% da população em 2010 na Etiópia e em Uganda com 49% da população apresentando quadro de ILTB no período de 2008 a 2009. No ano de 2005 a taxa de infecção era de 10,8% na Zâmbia e 30,3% na África do Sul. Durante o período de 2015 a 2016 36,8% dos adultos no Vietnã e em 2013 no China 19% apresentaram ILTB. A baixa frequência de casos foi observada em alguns países desenvolvidos com baixa incidência de TB, como por exemplo na Austrália com 4,6% em 2006 e 5,1% em 2016 (DING et al., 2022).

DIAGNÓSTICO E AVANÇOS

Até 2001, o teste tuberculínico cutâneo de derivado proteico purificado (PPD), conhecido também como reação de Mantoux era a única ferramenta disponível para o diagnóstico da tuberculose latente (ILTB), baseado na resposta imune intradérmica celular, onde proteínas secretadas de micobactérias tuberculínicas são administrados na epiderme do paciente a ser testado e após certo período é medido o halo inflamatório formado, sendo de baixa especificidade, por gerar resultados positivos para indivíduos saudáveis expostos a micobactérias não-tuberculosas ambientais e em indivíduos saudáveis que tenham recebido a vacina e imunização pelo Bacilo Calmette-Guérin (BCG). Além da logística para a realização do exame, sendo necessário o retorno do paciente ao laboratório responsável pela realização do PPD após o período de 48 a 72 horas para leitura do resultado. (KLAUTAU et al., 2018; SIQUEIRA; ORÉFICE, 2019).

A resposta imunológica ao MT ocorre após prévia sensibilização pelo antígeno dos linfócitos T, responsáveis pela produção e secreção da citocina interferon-gamma (IFN- γ), a qual pode ser quantificada em ensaio clínico ex vivo afim de verificar a concentração desta citocina associada à infecção pelo MT. Recentemente, um ensaio de liberação de interferon- γ (IGRA) foi proposto para avaliar a secreção desta citocina por linfócitos T do sangue periférico, quando estimulados por antígenos de virulência MT específicos: ESAT-6 e CFP-10 (DERRICK; MORRIS, 2007; GANGULY et al., 2008).

Apesar do grande avanço tecnológico frente ao diagnóstico de casos de tuberculose latente, a sensibilidade do Teste IGRA é discutível quando aplicado para o diagnóstico da tuberculose latente (ILTB) em pacientes que por alguma razão apresentam quadros linfopênicos, com reduzidos valores absolutos de linfócitos CD3+CD4+ e CD3+CD8+, responsáveis pela produção e secreção do IFN- γ , que pode gerar resultados falsos negativos e inconclusivos. Além disso, estudos relevam a prevalência de resultados inconclusivos de ILTB pelo ensaio IGRA-TB em pacientes imunodeprimidos, surgindo a necessidade de se encontrar um fator de correção entre as baixas populações linfocitárias com a concentração de IFN- γ por esse método (PETRUCCIOLI et al., 2020; KLAUTAU et al, 2018).

IMPLANTAÇÃO PROJETO PILOTO IGRA-TB

Em 2021 o Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis (DDCCIST) do Ministério da Saúde propôs criar nos Estados Brasileiros uma rede de testagem IGRA-TB por meio dos laboratórios da Rede Nacional de Quantificação de Linfócitos CD4/CD8. Como nosso laboratório integra a Rede Nacional desde sua criação em 1997, a Coordenação dessa Rede no Estado de São Paulo junto à Secretaria de Estado da Saúde feita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) e Centro de Referência em HIV/Aids (CRT-AIDS), após avaliação dos 22 laboratórios, selecionou 10 para a implantação do Projeto Piloto com utilização do teste para pesquisa de casos de tuberculose latente QuantiFeron-TB Gold Plus (QTF®-Plus) (Qiagen), sendo o nosso laboratório um desses selecionados.

Em 2021 o Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis (DDCCIST) do Ministério da Saúde propôs criar nos Estados Brasileiros uma rede de testagem IGRA-TB por meio dos laboratórios da Rede Nacional de Quantificação de Linfócitos CD4/CD8. A implantação do Projeto Piloto diz respeito a realização dos testes IGRA, utilizando o kit comercial QuantiFeron-TB Gold Plus (QTF®-Plus) (Qiagen), adquirido e distribuído aos laboratórios que compõe a rede, afim de realizar a testagem e triagem de

populações consideradas de risco a serem portadoras da ILTB ou que em dados momento possam desenvolver o quadro de tuberculose ativa devido algum tipo de imunossupressão. Inicialmente o teste foi liberado para ser realizado em pacientes portadores do vírus HIV, expandindo para outras populações descritas nas normativas do Ministério da Saúde Nº 2 de 2022 e Nº 4 de 2023 (apêndice 01). Atualmente os seguintes grupos de risco indicados para realização do teste IGRA para triagem de ILTB são:

- **NOTA INFORMATIVA Nº 2/2022-CGDR/.DCCI/SVS/MS**
 - Pessoas vivendo com HIV (contagem de linfócitos T-CD4+ > 350 células/mm³)
 - Crianças <10 anos, contato de casos de TB ativa
 - Pessoas candidatas a transplante de células-tronco
- **NOTA INFORMATIVA Nº 4/2023-CGDR/.DCCI/SVS/MS**
 - Pessoas com indicação/uso de medicamentos imunobiológicos ou imunossupressores
 - Pessoas em situação de pré-transplante de órgãos

AVANÇOS E INOVAÇÃO FRENTE AO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE LATENTE

A alta frequência de ILTB, principalmente em pacientes que apresentam coinfeções com o HIV, não está totalmente elucidada, devido ao elevado número de resultados falsos positivos como também resultados inconclusivos em pacientes que apresentam infecção pelo vírus HIV. Diante de observações e dificuldade encontradas em rotina diagnóstica durante a implantação da nova rede IGRA-TB, surgiu o interesse no aprofundamento das investigações em relação ao novo teste e elucidar a expressão de RNAm por subpopulações linfocitárias CD4 e CD8 em busca de avanços frente ao diagnóstico de casos de ILTB.

Em buscar de avanços frente ao diagnóstico de TB em casos latentes, atualmente limitado a apenas 2 opções, o teste PDD e os implantados recentemente, IGRAs no Sistema único de saúde, propõe-se a padronização da dosagem de RNAm de IFN- γ expresso por linfócitos CD4 e CD8. Até o momento, a quantificação da expressão do mRNA de citocinas inflamatórias presentes em casos de TB e ILTB como o IFN- γ não foi utilizada para o diagnóstico da infecção por MT, sendo uma ferramenta de alta cadência e propensão para

estudo e futuras implantações de alternativas diagnóstica, por meio de avanços de novas tecnologias em biologia molecular (KIM et al., 2013).

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR) pode ser descrita como método laboratorial de biologia molecular que utiliza plataforma fluorescente capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação de sequências genômicas, pela ação *in vitro* de ciclos térmicos responsáveis pelo afrouxamento do amaranhado do material genético, e ativação da ligação em temperatura ideal de trabalho de enzimas de transcrição que polimerizam em presença de nucleotídeos, fitas de RNA complementares. A quantificação das fitas de RNA produzidas exponencialmente é obtida através da utilização de primers, sequências de nucleotídeos complementares que se ligam a sequências de DNA ou RNA de interesse, tanto para fita primária como complementar denominados forward e reverse, e a cada ciclo térmico de reação, emite sinais de fluorescência que são detectados ciclo a ciclo. A reação em cadeia se inicia quando a enzima de transcrição, polimerase, reconhece sequências padrão lidas como sinal de “START”, que a partir daquele determinado ponto, nucleotídeos devem ser recrutados de 3 em 3 para confecção da fita complementar ao RNA molde de interesse. A fluorescência detectada pode ser oriunda tanto da ligação de fluoróforos que reconhecem fitas simples de RNA, emitindo fluorescência a cada nova ligação, como também pela ligação de fluoróforos acoplados a sondas de nucleotídeos, inicialmente de fluorescência suprimida pela presença de quencher, que devido a ação da polimerase, separa as porções fluoróforos e quencher, emitindo sinal de luz detectável. A RT-PCR tem sido amplamente utilizada para quantificar os níveis de expressão gênica, e pode ser utilizado para quantificar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de citocinas, expresso em células imunes através da análise comparativa entre os valores de Ct (cycle threshold) obtidos pela amplificação. Valores de Ct são indicativos que depois de um determinado número de ciclos térmicos, a sequência alvo de interesse está presente, e pode ser detectada (KUBISTA et al., 2006; RAO et al., 2013).

Podem ser utilizadas duas estratégias para analisar dados obtidos através da RT-PCR, a quantificação absoluta e quantificação relativa. A quantificação absoluta identifica a quantidade do gene alvo com base na curva padrão de polimerização tabulada ponto a ponto de forma exponencial. Por outro lado, a quantificação relativa determina a expressão genética de sequência alvo em relação a sequência de referência. O cálculo para a determinação da expressão gênica, utiliza a expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$, realizado através do ΔCt , e se refere à diferença entre o Ct amplificado do gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene controle, e $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse e o ΔCt da amostra de referência (RAO et al., 2013).

2) JUSTIFICATIVA

Diante da necessidade de implantar uma rede de diagnóstico preciso da ILTB, faz-se necessário conhecer as características da população encaminhada para testagem, aprimorar o método IGRA-TB e desenvolver método alternativo que detecte diretamente a produção de RNAm para interferon gama, evitando os resultados inconclusivos em pessoas com níveis basais elevados de gama-IFN”

3) OBJETIVO

3.1- OBJETIVOS GERAIS

- Implantação e padronização de nova rede do Ministério da Saúde, proposta de otimizações de processamento, e padronização de RT-PCR com alvo RNAm de IFN- γ extraído de células PBMC de pacientes imunodeprimidos portadores do Vírus HIV, como proposta e elucidação de alternativa para o diagnóstico da tuberculose latente.

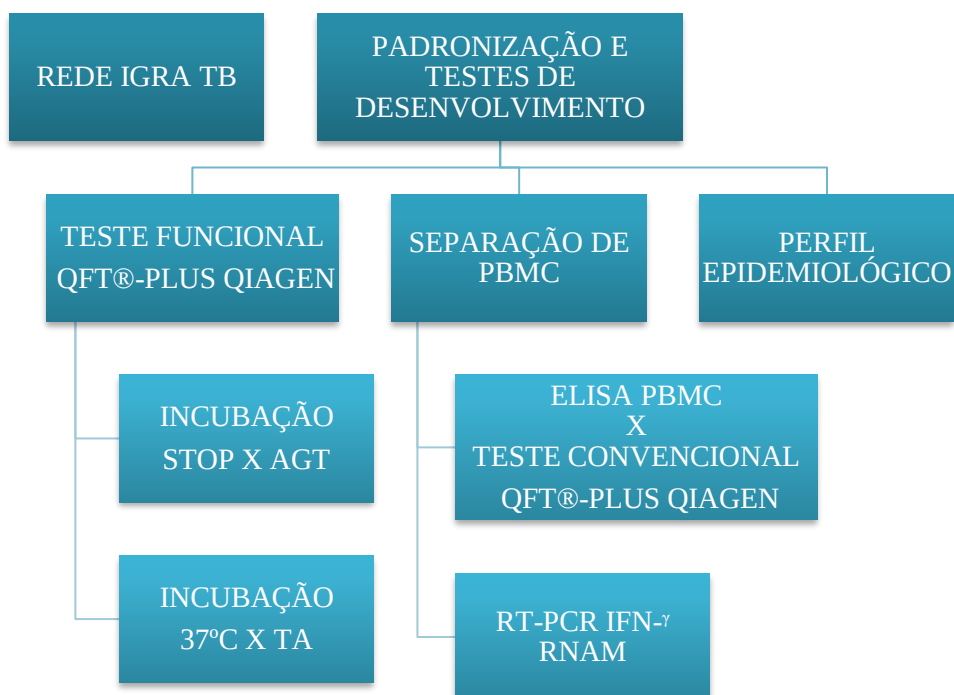
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ajustar o valor da dosagem de IFN- γ em relação a população global de CD4 e CD8 em pacientes portadores do vírus HIV através da utilização de células PBMC.
- Aprimorar e otimizar a técnica de dosagem do IFN- γ a fim de descartar falsos negativos e resultados inconclusivos, e facilitar o processamento.
- Análise de dados epidemiológicos através de banco de dados extraído do sistema GAL - Gerenciador de Ambiente Laboratorial.
- Padronizar a proposta de alternativa de diagnóstico de ILTB por meio de RT-qPCR pela amplificação de RNAm de IFN- γ .

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 01: Fluxograma de delineamento experimental.



4.2 ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. As amostras de sangue utilizadas no processo de implantação, padronização e melhorias foram coletadas e enviadas pelas DRS III- Araraquara/São Carlos, XIII- Ribeirão Preto, VIII- Franca, XV- São José do Rio Preto e V- Barretos para diagnóstico pelo teste IGRA-TB coletados em heparina sódica ou de lítio em um volume mínimo de 5ml para realização do teste diagnóstico convencional. A proposta alternativa de diagnóstico de ILTB por meio de RT-PCR pela amplificação de RNAm de IFN- γ correu no primeiro momento para padronização do método, através da seleção de amostras portadores do vírus HIV, pela disponibilidade de volume necessário para realização

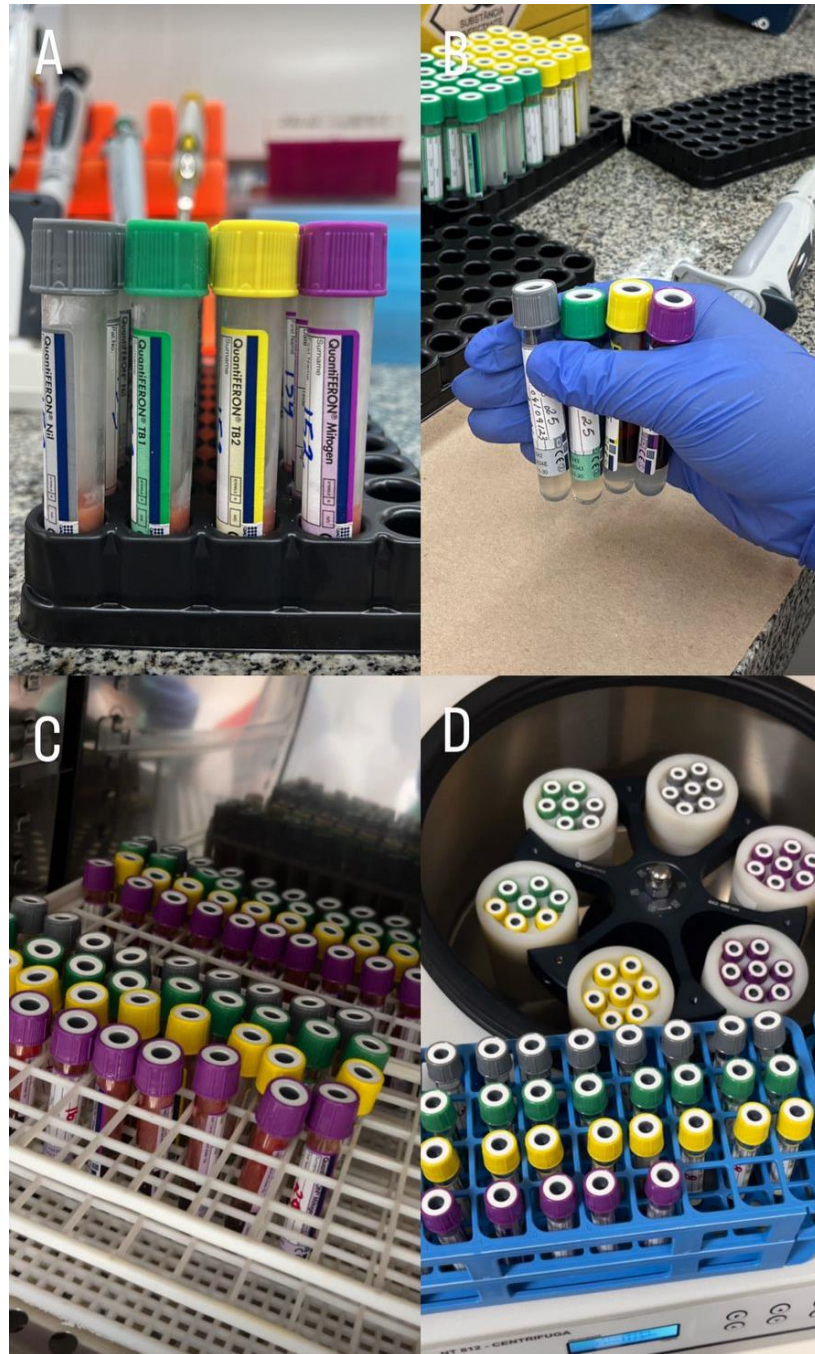
dos testes propostos. Para continuidade do presente trabalho durante o processo de doutorado, e validação da proposta realizada durante o mestrado foi realizada a parceria com o Centro de Atendimento de Infecções Crônicas – CAIC localizado na cidade de São Carlos, onde o amparo, seleção e coleta dos participantes da pesquisa ocorre, o termo de consentimento livre e Esclarecido (TCLE) é assinado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em São Carlos (apêndice 03). Houve a dispensa para consulta e utilização de banco de dados e informações de domínio público disponível em bancos de dados vinculados ao Ministério da Saúde, cujas informações são agregadas, sem possibilidade de identificação individual.

4.3 MÉTODOS E EXPERIMENTOS

4.3.1 EXTIMULAÇÃO EX VIVO

O 1º tubo com aproximadamente 5,0ml de sangue total foi distribuído em volumes de 1,0ml em 4 tubos de reação (figura 4), conforme protocolo estabelecido no ensaio QuantiFeron-TB Gold Plus (QTF®-Plus, Qiagen) (apêndice 02) e padronizado em “PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP), REDE ESTADUAL DE IGRA-TB/SP, ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE INTERFERON-GAMA (IGRA) UTILIZANDO KIT QUANTIFERON®-TBGOLD-PLUS” (apêndice 01). Cada tubo individualmente contém: somente o gel separador, Tubo NIL, cinza, controle negativo, para dosagem da concentração basal de IFN- γ sem estímulo específico, tubos verde (TB1) e amarelo (TB2) contendo antígenos de virulência MT específicos, sendo o tubo TB 1 jateado com o antígeno EAST-6 (early secretory antigen target 6) detectando principalmente a resposta de células T CD4+ e o tubo TB 2 o antígeno CFP-10 (culture filtrate protein 10) com desempenho para ambas linhagens linfocitárias CD4+ e CD8+ para investigação da resposta imune adaptativa frente a antígenos específicos, e último tubo contendo mitógeno, ativador de liberação de IFN- γ (Controle Positivo) para investigação da situação e qualidade imunológica do paciente. Os tubos foram agitados por 10 vezes de cima para baixo com a mão espalmada (conforme recomendação do fabricante) incubados à 37°C em estufa sem necessidade de atmosfera de CO₂ de 16 - 24 horas, centrifugados a 2500xg, 10 minutos, e o plasma separado (figura 02). As amostras de plasma foram armazenadas a -20°C até a realização do teste ELISA para quantificação do IFN- γ e liberação do teste convencional para todas as amostras usualmente realizado em rotina.

Figura 02. Demonstrativo de processamento de estimulação de sangue total para diagnostico de tuberculose latente seguindo protocolo QuantiFeron-TB Gold Plus (QTF®-Plus) (Qiagen).



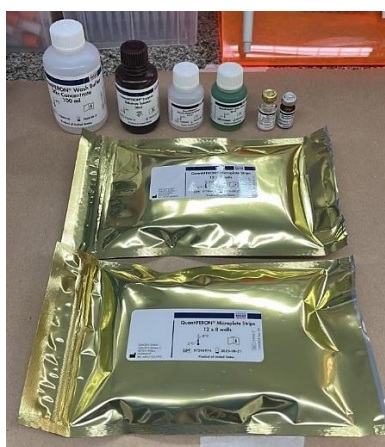
A: NIL: tubo cinza, controle negativo; TB1: tubo amarelo, teste 1; TB2: tubo verde, teste 2; MIT: roxo, controle positivo. B: Demonstração da homogeneização do conjunto de tubos QTF®-Plus com mão espalmada e fazendo movimentos verticais por 10x. C: Incubação do conjunto de tubos QTF®-Plus à 37°C em estufa sem atmosfera de

CO2 de 16 - 24 horas. D: Demonstração da centrifugação do conjunto de tubos QTF®-Plus 2500xg, 10 minutos.
Fonte: produzido pelo autor, 2023.

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DO IFN- γ POR ELISA

O teste de ELISA para a quantificação de IFN- γ após as estimulações e procedimentos descritos acima, foi realizado segundo orientações do fabricante do teste QuantiFeron-TB Gold Plus (QFT®-Plus Qiagen) (figura 03). Como se trata de ensaio quantitativo será padronizada a curva de calibração com IFN- γ Padrão reconstituído a 8,0 UI/mL e diluído em tampão de amostra (fornecido pelo fabricante) nas concentrações em UI/mL sendo P1 = 4.0, P2 = 1.0, P3 = 0.25 e P4 = 0.0. Para cada amostras, 4 reações ELISA foram realizadas, uma para cada plasma pós-incubação, tanto para o sangue total quanto para PBMC. Os poços da placa de ELISA estão adsorvidos com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ . Cada poço recebe 50 uL do conjugado anti-IFN- γ -HRP e 50 uL da amostra, homogeneizados por 1 minuto, incubado a temperatura ambiente por 2 horas, lavado 6 vezes com 400 uL do tampão de lavagem e adicionados 100uL do substrato da HRP, sendo homogeneizado por 1 minuto e incubado 30 minutos à temperatura ambiente. A parada da reação enzimática é feita pela adição de 50 uL da solução stop e a leitura da reação a 450nm com referência a 630nm é realizada na leitora de microplacas accuSkan GO (Thermo). Os resultados são analisados pelo software QFT_TBGoldPlus_v2.71.2 Build06 fornecido pelo próprio fabricante.

Figura 03. Reagentes do teste QuantiFeron-TB Gold Plus (QFT®-Plus Qiagen).



Fonte: produzido pelo autor, 2023.

4.3.3 CURVA DE EXPRESSÃO E DOSAGEM DE IFN- γ

Foram selecionadas randomicamente durante o decorrer da rotina 5 amostras para compor a padronização e avaliação da curva de expressão e dosagem de IFN- γ , de forma que 1 ml de sangue total foi incubado nos 4 tubos que compõe o kit, incubados à 37°C e retiradas alíquotas de 50 μ l de plasma separado por sedimentação nos intervalos de tempo 30 minutos e em 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas. As amostras de plasma foram armazenadas a -20°C até a realização do teste ELISA para quantificação do IFN- γ e avaliação da curva de expressão e liberação de IFN- γ .

4.3.4 AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA E MODELO DE INCUBAÇÃO IDEAL

5 amostras de sangue total conforme disponibilidade de envio do volume necessário, denominadas (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5) sofram submetidas a mesma temperatura de incubação, 37°C e dois regimes de incubação diferentes, com agitação (AGT) contante em 360° em 15 RPM no agitador Intelli-Mixer RM-2M e sem agitação (STOP) por 24 horas, afim de se avaliar a influência do movimento supondo que em agitação haveria o maior contato célula a célula podendo aumentar a sensibilidade.

Outras 5 amostras sofram selecionadas para avaliação da influência da temperatura sendo incubadas a 37°C e a temperatura ambiente (TA) em paralelo, buscando a otimização e simplificação do procedimento sem a utilização e obrigatoriedade de incubadora com temperatura controlada.

4.3.5 OBTENÇÃO DE PBMC

Para a avaliação da influência da separação das células mononucleares (PBMC) sobre o teste IGRA-TB, conforme disponibilidade de volume de sangue total coletado tubo coletado, após o procedimento tradicional de realização do teste IGRATB, 5 ml de sangue total foi utilizado para obter as PBMC a partir de processo de centrifugação com HISTOPAQUE®-1077 (d=1,077, Sigma Aldrich) na razão 1:1 com amostra de sangue periférico total do grupo de estudo. Em tubo Falcon de 15 ml foi desprezado 5 ml de HISTOPAQUE®-1077 em seguida cuidadosamente adicionado 5ml do sangue total seguindo para centrifugação onde foram

obtidas as PBMC por coluna de densidade após 30min em 1.400 rpm. As células obtidas foram lavadas por 3 vezes com 10 ml de PBS estéril a 1.400 RPM por 10min.

4.3.6 RENDIMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE PBMC

Após centrifugação e separação das células PBMC o rendimento do procedimento de todas as amostras submetidas a extração foi verificado através do contador de células Countess II (Invitrogen Thermo Fisher) com coloração Azul de Trypan (Sigma Aldrich) na proporção 1:3, a mesma proporção também foi utilizada para contagem de células em câmara de Neubauer, com a leitura dos 4 maiores quadrantes e realizada a conta de concentração celular $PBMC/\mu L = (\text{leucócitos contados} \times \text{fator da diluição} \times 10) \div 4$. Durante o andamento de padronização do método, alíquotas de 5 μ l no final do processo contendo PBMC + SFB foram submetidas à observação a fresco em microscópio invertido e confecção de lâmina fixada e com coloração hematológica May Grunwald Giemsa em microscópio ótico em lente de imersão.

4.3.7 QUANTIFICAÇÃO DO IFN- γ COM CONCENTRADO DE PBMC

Como mais uma proposta na busca de melhoria na sensibilidade foi padronizado o teste de ELISA QuantiFeron-TB Gold Plus (QFT®-Plus Qiagen) da mesma forma que realizado usualmente na rotina diagnostica com sangue total, sendo então realizado com as células PBMC puras em concentração padrão após avaliação do rendimento máximo e mínimo obtido após a seleção onde espera-se o aumento da dosagem de IFN- γ em pacientes portadores de ILTB pelo fato do aumento da concentração das células presentes nos tubos de incubação e ativação de linfócitos T previamente sensibilizados pelos antígenos do MT, sendo 10 amostras selecionadas, 5 positivas através do procedimento padrão e 5 com resultado negativo.

4.3.8 DESENHO DE PRIMERS IFN- γ RNAME

O par de primers mais adequado foi selecionado consultando o banco de dados GenBank NCBI sequência de referência NM_000619.3, Homo sapiens interferon gamma (IFNG) mRNA e enviado sequência alvo com primers forward: 5'-GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG-3' e reverse: 5'-TGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTC-3' para produção customizada (Thermo).

A sequência foi citada por WANG et al., 2022 e LIAO et al., 2022 relatando a expressão de IFN- γ RNAm em diferentes patologias.

4.3.9 EXTRAÇÃO DE IFN- γ RNAM

Após confirmação de resultados reagente para ILTB por ELISA convencional IGRATB, foi realizada a estimulação de 1000 μ l da solução PBMC + SFB de 5 amostras HIV+ nos tubos NIL, TB1, TB2 e MIT, e triplicata (total 16 tubos por amostra), separadas alíquotas de 100 μ l nos intervalados de tempo 30min, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas para realização de RT-PCR para avaliação da presença de RNAm de IFN- γ (figura 04), e gene referência GAPDH realizada amplificação por alíquota de 100 μ l após as 24 horas. A extração foi realizada por meio de método automatizado padronizado com beads magnéticas no aparelho Loccus Extracta 96, placas KingFisher deep-well 96 Plate (Thermo) e pentes KingsFisher 96 tip comb for DW Magnets (Thermo), tampão de extração tiocianato de guanidina, 3 lavagens subsequentes com etanol 70% (Sigma Aldrich), e eluição em fosfato de sódio 5Mm.

Figura 04. Representação esquemática de modelo de placa adotado para extração e reação de amplificação de RNAm de IFN- γ

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
30 min	A	NIL 1.1	NIL 1.2	NIL 1.3	TB1 1.1	TB1 1.2	TB1 1.3	TB2 1.1	TB2 1.2	TB2 1.3	MIT 1.1	MIT 1.2	MIT 1.3
2 horas	B	NIL 1.1	NIL 1.2	NIL 1.3	TB1 1.1	TB1 1.2	TB1 1.3	TB2 1.1	TB2 1.2	TB2 1.3	MIT 1.1	MIT 1.2	MIT 1.3
4 horas	C	NIL 1.1	NIL 1.2	NIL 1.3	TB1 1.1	TB1 1.2	TB1 1.3	TB2 1.1	TB2 1.2	TB2 1.3	MIT 1.1	MIT 1.2	MIT 1.3
6 horas	D	NIL 1.1	NIL 1.2	NIL 1.3	TB1 1.1	TB1 1.2	TB1 1.3	TB2 1.1	TB2 1.2	TB2 1.3	MIT 1.1	MIT 1.2	MIT 1.3
8 horas	E	NIL 1.1	NIL 1.2	NIL 1.3	TB1 1.1	TB1 1.2	TB1 1.3	TB2 1.1	TB2 1.2	TB2 1.3	MIT 1.1	MIT 1.2	MIT 1.3
10 horas	F	NIL 1.1	NIL 1.2	NIL 1.3	TB1 1.1	TB1 1.2	TB1 1.3	TB2 1.1	TB2 1.2	TB2 1.3	MIT 1.1	MIT 1.2	MIT 1.3
24 horas	G	NIL 1.1	NIL 1.2	NIL 1.3	TB1 1.1	TB1 1.2	TB1 1.3	TB2 1.1	TB2 1.2	TB2 1.3	MIT 1.1	MIT 1.2	MIT 1.3
GAPD	H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H	GAPD H

Fonte: produzido pelo autor, 2023.

O rendimento final da concentração e pureza de RNAm foi avaliado em Espectrofotômetro Biowave DNA WPA. O grau de pureza é necessário para verificação da qualidade do RNA extraído, o quão puro o material genético se encontra, sem a contação de proteínas que podem estar presentes no produto da extração. A quantificação é realizada através da leitura de absorbância a 260 nm, considerando-se 1 DO = 50 ng/ L de RNA, com background

280nm, e a determinação do grau de pureza, é a razão entre as leituras A260/A280, sendo desejado um valor próximo de $1,8 \pm 0,2$ para pureza de RNA (Turner et al.,1997).

4.3.10 AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR

Após extração, 10 µl de RNAm extraído das PBMC foi submetido ao método de RT-PCR em proporção 1:1 em microplacas e filme de vedação (Axygen), utilizando master mix KCQS08-500RXN LN Q66159384 One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™ Low ROX™, acrescido de SYBR Green (Sigma Aldrich), par de primers forward e reverse (Thermo) (tabela 01) em regime térmico no termociclador Bio Rad CFX96 por 15 minutos a 50°C, 3 minutos a 95°C e 39 ciclos subsequentes de 95°C por 15 segundos e 1 minutos a 56°C. A Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humana (GAPDH), controle endógeno Applied Biosystems™ Human GAPDH (Thermo) foi utilizada como gene de controle e referência utilizado para validação da extração e amplificação (tabela 02). A amplificação de cada amostra foi realizada em triplicata para obtenção de média. Foi realizado o cálculo $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a determinação da expressão gênica, e plotadas médias de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dentre as 5 amostras em cada tempo 30 min, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas.

Tabela 02. Relação de reagente por poço para reação de RT-PCR em proporção 1:1 com RNAm de PBMC pós estímulo com antígenos TB1 e TB2, primers IFN- γ .

REAGENTE	PROPORÇÃO
One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™ Low ROX™	7,5 µl
SYBR Green	1,9 µl
forward: 5'-GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG-3'	0,3 µl
reverse:5'-TGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTC-3'	0,3 µl

Fonte: Produzido pelo autor, 2023.

Tabela 03. Relação de reagente por poço para reação de de RT-PCR em proporção 1:1 com RNAm de PBMC pós estímulo com antígenos TB1 e TB2, GAPDH

REAGENTE	PROPORÇÃO
One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™ Low ROX™	7,5 µl
GAPDH	0,5 µl
H2O DNase FREE	2,0 µl

Fonte: Produzido pelo autor, 2023.

4.3.11 ANÁLISE DE BANCO DE DADOS

Dentro das competências do projeto piloto foi realizada a liberação de resultados e consulta de dados demográficos, epidemiológicos e clínicos no sistema GAL - Gerenciamento de Ambiente Laboratorial, disponível em: gal.saude.sp.gov.br e Siscel - Sistema de Controle de Exames Laboratoriais, desenvolvido pela coordenação geral de laboratórios de Saúde Pública integrado ao Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) e a Secretária de Vigilância em Saúde (SVS) desenvolvido para Laboratórios de Saúde Pública aplicado aos exames e ensaios de amostras de origem humana, animal e ambiental, com padrão nacional, e desenvolvido de acordo com os protocolos do Ministério da Saúde, sendo assistida as consulta em ambos bancos de dados pelo Resolução Nº 510, de 07 de Abril de 2016, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), despondo do parágrafo III – pesquisa que utilize informações de domínio público, V - pesquisa com bancos de dados, cujas informações são agregadas e VII - pesquisa que objetiva o aprofundamento teórico de situações que emergem espontânea e contingencialmente na prática profissional, desde que não revelem dados que possam identificar o sujeito sem possibilidade de identificação individual.

4.3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados demográficos, epidemiológicos e de distribuição geográfica, clínicos, laboratoriais e moleculares foram analisadas e plotados através do software estatístico JASPE 0.17.1, juntamente com o plotagem de dados na plataforma GraphPad Prism 5. Foi realizada estatística descritiva das características observadas, utilizando-se medidas de frequência e distribuição.

5) RESULTADOS OBTIDOS

5.1 CURVA DE EXPRESSÃO E DOSAGEM DE IFN- γ

Após a incubação por 24 horas, todas as 5 amostras selecionadas apresentaram resultado negativo para ILTB, e nas alíquotas de 4 horas se iniciou a dosagem de IFN- γ nos tubos de controle positivo com adição de mitógeno nas amostras T1, T2, T3 e T4. Em todas, valores acima de 1 IU/ml de dosagem de IFN- γ ocorreu dentro das 6 horas de incubação (tabela 04).

Tabela 04. Curva de estimulação de IFN- γ no intervalo de 30 minutos a 24 horas.

IFN- γ (IU/ml)	NIL	TB1	TB2	Mitógeno	TB1-Nil	TB2-Nil	Mitógeno-NIL	Resultado
30 min - T1	0,02	0,01	0,05	0,02	-0,01	0,03	0,00	Indeterminado
1 hora - T1	0,02	0,01	0,02	0,01	-0,01	0,00	-0,01	Indeterminado
2 horas - T1	0,02	0,02	0,03	0,15	0,00	0,01	0,13	Indeterminado
4 horas - T1	0,03	0,02	0,02	4,31	-0,01	-0,01	4,28	Negativo
6 horas - T1	0,03	0,03	0,02	8,31	0,00	-0,01	8,28	Negativo
8 horas - T1	0,03	0,03	0,04	>10 μ	0,00	0,01	>10 μ	Negativo
10 horas - T1	0,04	0,04	0,04	>10 μ	0,00	0,00	>10 μ	Negativo
24 horas - T1	0,03	0,03	0,02	>10 μ	0,00	-0,01	>10 μ	Negativo
30 min - T2	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	Indeterminado
1 hora - T2	0,01	0,01	0,01	0,08	0,00	0,00	0,07	Indeterminado
2 horas - T2	0,01	0,01	0,01	0,04	0,00	0,00	0,03	Indeterminado
4 horas - T2	0,04	0,03	0,03	>10 μ	-0,01	-0,01	>10 μ	Negativo
6 horas - T2	0,09	0,04	0,04	>10 μ	-0,05	-0,05	>10 μ	Negativo
8 horas - T2	0,12	0,07	0,07	>10 μ	-0,05	-0,05	>10 μ	Negativo
10 horas - T2	0,15	0,08	0,08	>10 μ	-0,07	-0,07	>10 μ	Negativo
24 horas - T2	0,07	0,03	0,10	>10 μ	-0,04	0,03	>10 μ	Negativo
30 min - T3	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	Indeterminado
1 hora - T3	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	Indeterminado
2 horas - T3	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	Indeterminado
4 horas - T3	0,02	0,01	0,02	0,59	-0,01	0,00	0,57	Negativo
6 horas - T3	0,02	0,02	0,05	9,78	0,00	0,03	9,76	Negativo
8 horas - T3	0,03	0,03	0,03	>10 μ	0,00	0,00	>10 μ	Negativo
10 horas - T3	0,03	0,04	0,04	>10 μ	0,01	0,01	>10 μ	Negativo
24 horas - T3	0,04	0,08	0,05	>10 μ	0,04	0,01	>10 μ	Negativo

30 min - T4	0,02	0,01	0,02	0,01	-0,01	0,00	-0,01	Indeterminado
1 hora - T4	0,01	0,04	0,04	0,02	0,03	0,03	0,01	Indeterminado
2 horas - T4	0,02	0,01	0,01	0,06	-0,01	-0,01	0,04	Indeterminado
4 horas - T4	0,04	0,07	0,05	0,97	0,03	0,01	0,93	Negativo
6 horas - T4	0,06	0,08	0,06	6,52	0,02	0,00	6,46	Negativo
8 horas - T4	0,07	0,06	0,06	>10 ⁹	-0,01	-0,01	>10 ⁹	Negativo
10 horas - T4	0,04	0,00	0,08	>10 ⁹	-0,04	0,04	>10 ⁹	Negativo
24 horas - T4	0,03	0,03	0,02	>10 ⁹	0,00	-0,01	>10 ⁹	Negativo
30 min - T5	0,02	0,02	0,02	0,03	0,00	0,00	0,01	Indeterminado
1 hora - T5	0,03	0,02	0,02	0,03	-0,01	-0,01	0,00	Indeterminado
2 horas - T5	0,02	0,02	0,02	0,03	0,00	0,00	0,01	Indeterminado
4 horas - T5	0,03	0,05	0,03	0,06	0,02	0,00	0,03	Negativo
6 horas - T5	0,03	0,03	0,03	1,64	0,00	0,00	1,61	Negativo
8 horas - T5	0,00	0,03	0,02	2,04	0,03	0,02	2,04	Negativo
10 horas - T5	0,05	0,05	0,00	6,47	0,00	-0,05	6,42	Negativo
24 horas - T5	0,02	0,02	0,02	>10 ⁹	0,00	0,00	>10 ⁹	Negativo

Fonte: Produzido pelo autor (2023).

5.2 AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA E MODELO DE INCUBAÇÃO IDEAL

A incubação com agitação aumentando o contato célula-célula, reduziu a dosagem de IFN- γ em todos os tubos utilizados no teste IGRA. A agitação gerou resultados inconclusivos em 3 amostras que apresentaram resultado negativo a 37° sem agitação, em uma amostra ainda pode ser obtido resultado negativo, porém com valor de mitógeno reduzido e em uma amostra com resultado considerado reagente para ILTB dentro do procedimento padrão, também apresentou resultado inconclusivo quando incubada sob agitação (tabela 05) inviabilizando essa forma de incubação em busca do aumento da sensibilidade da reação.

Tabela 05. Influência do regime de incubação com e sem agitação a 37°C.

IFN- γ (IU/ml)	NIL	TB1	TB2	Mitógeno	TB1-Nil	TB2-Nil	Mitógeno-NIL	Resultado
ST1 37°								
	0,13	0,12	0,17	7,61	-0,01	0,04	7,48	Negativo
ST1 AGT	0,10	0,02	0,02	1,11	-0,08	-0,08	1,01	Negativo
ST237°								
	0,02	0,05	0,06	7,62	0,03	0,04	7,60	Negativo
ST2 AGT	0,04	0,01	0,01	0,09	-0,03	-0,03	0,05	Indeterminado

Tabela 05. Influência do regime de incubação com e sem agitação a 37°C.

IFN- γ (IU/ml)	NIL	TB1	TB2	Mitógeno	TB1-Nil	TB2-Nil	Mitógeno-NIL	Resultado
ST3 37°	0,00	0,03	0,03	7,60	0,03	0,03	7,60	Negativo
ST3 AGT	0,02	0,01	0,02	0,10	-0,01	0,00	0,08	Indeterminado
ST4 37°	0,03	0,05	0,06	7,62	0,02	0,03	7,59	Negativo
ST4 AGT	0,90	0,02	0,02	0,02	-0,88	-0,88	-0,88	Indeterminado
ST5 37°	0,07	0,94	1,00	7,60	0,87	0,93	7,53	Positivo
ST5 AGT	0,06	0,00	0,03	0,12	-0,06	-0,03	0,06	Indeterminado

Fonte: Produzido pelo autor (2023).

A incubação sem a necessidade de temperatura controlada, realizada apenas em cima da bancada durante 24 horas em temperatura ambiente, foi proposta como mais uma alternativa afim de facilitar e otimizar o processo completo do teste IGRA, que demanda muito tempo e diversos equipamentos. Tanto em amostras negativas (STA, STB, STC, STD) e positiva (ST5), foram obtidos resultados não viáveis a utilização, devido a diminuição da sensibilidade nos tubos TB1 e TB2 como também ativação do controle negativo reduzida (tabela 06).

Tabela 06. Influência do regime de incubação 37° x TA

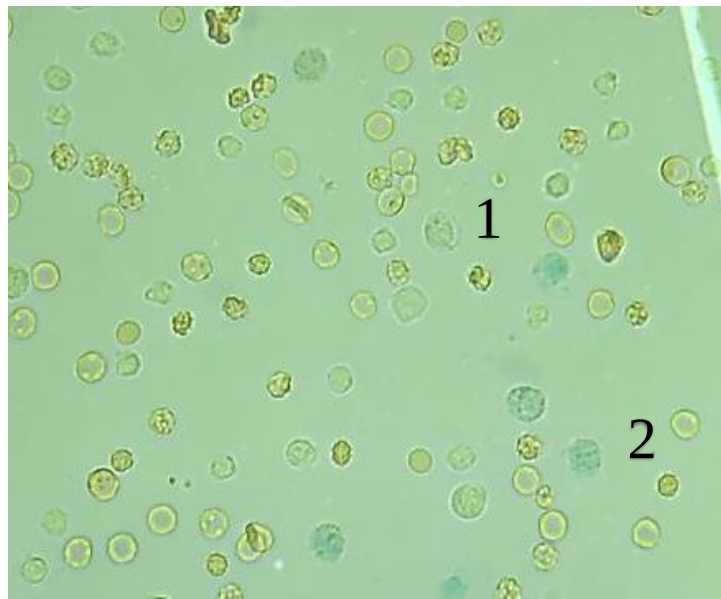
IFN- γ (IU/ml)	NIL	TB1	TB2	Mitógeno	TB1-Nil	TB2-Nil	Mitógeno-NIL	Resultado
STA 37°	0,3	0,2	0,2	7,6	-0,1	-0,1	7,3	Negativo
STA TA	0,24	0,03	0,03	5,79	-0,21	-0,21	5,55	Negativo
STB 37°	0,02	0,02	0,06	7,63	0	0,04	7,61	Negativo
STB TA	0,02	0,02	0,02	3,62	0	0	3,6	Negativo
STC 37°	0,05	0,03	0,03	7,61	-0,02	-0,02	7,56	Negativo
STC TA	0,05	0,02	0,01	4,05	-0,03	-0,04	4	Negativo
					0	0	0	
STD STOP	0,02	0,03	0,02	7,5	0,01	0	7,48	Negativo
STD TA	0,05	0,01	0,03	2,61	-0,04	-0,02	2,56	Negativo
					0	0	0	
ST5 37°	0,07	0,67	1	7,6	0,6	0,93	7,53	Positivo
ST5 TA	0,06	0,09	0,08	7,15	0,03	0,02	7,09	Negativo

Fonte: Produzido pelo autor (2023).

5.3 RENDIMENTO E VIABILIDADE DE PBMC

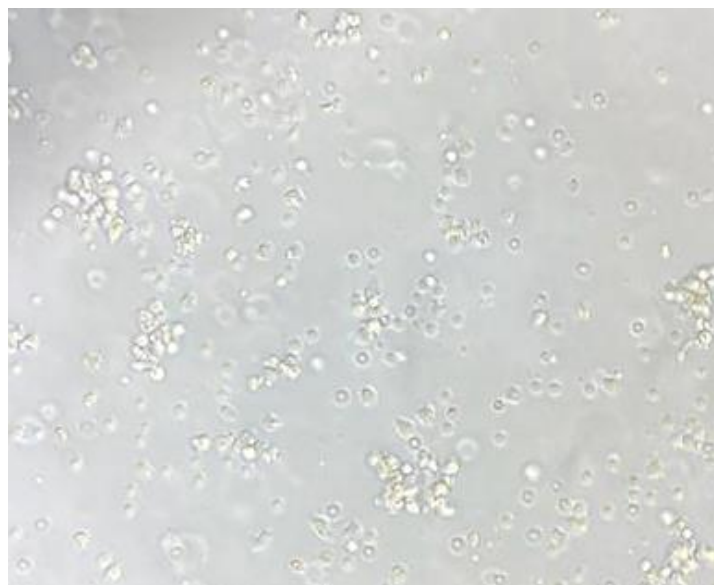
O rendimento médio máximo obtido pelo processo de separação utilizando o volume de 5ml de sangue total foi de 3:2 relação de células vivas e mortas, em escala 10^6 células/ml, sendo o padrão ideal de rendimento máximo obtido fixado em 2×10^6 células/ml com viabilidade em 60% células vivas e 30% células mortas (figura 05, 06 e 07)

Figura 05. Contagem de células PBMC em câmara de Neubauer onde células vivas apresentam cor amarelada¹ e mortas cor azulada² devido aderência do corante Azul de Trypan.



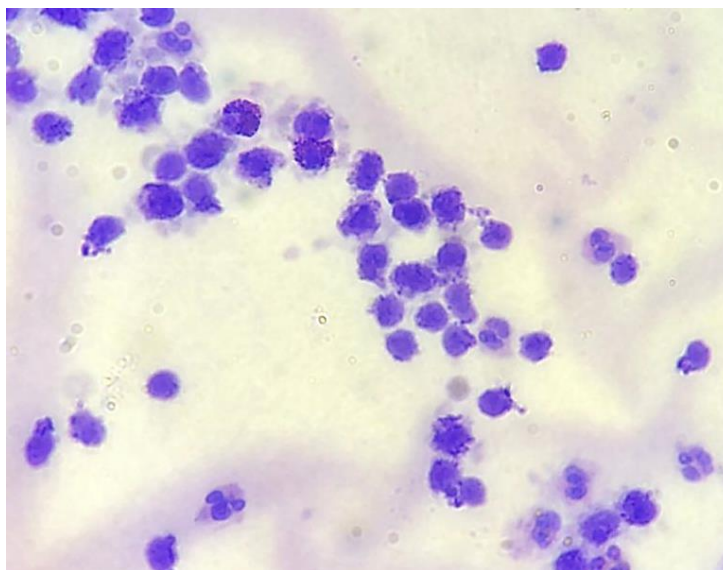
1: linfócito vivo; 2: linfócito morto. Fonte: produzido pelo autor, 2023.

Figura 06. Observação a fresco de PBMC + SFB em microscópio invertido.



Fonte: produzido pelo autor, 2023.

Figura 07. Lâmina fixada de PBMC* + SFB com coloração hematológica May Grunwald Giemsa.



Linfócitos: Núcleo azul violeta e o citoplasma azul.; Monócitos: Núcleo azul violeta e citoplasma azul claro.
Fonte: produzido pelo autor, 2023.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DO IFN- γ COM CONCENTRADO DE PBMC

Como mais uma proposta na busca de melhoria na sensibilidade foi padronizado o teste de ELISA QuantiFeron-TB Gold Plus (QFT®-Plus Qiagen) da mesma forma que realizado usualmente na rotina diagnostica com sangue total, sendo então realizado com as células PBMC puras em concentração padrão após avaliação do rendimento máximo e mínimo obtido após a seleção onde espera-se o aumento da dosagem de IFN- γ em pacientes portadores de ILTB pelo fato do aumento da concentração das células presentes nos tubos de incubação e ativação de linfócitos T previamente sensibilizados pelos antígenos do MT. Ao contrário do que era esperado, a separação apenas de linfócitos e monócitos, células envolvidas na sinalização e produção de IFN- γ na presença de antígenos da ILTB, entre as 10 amostras selecionadas, 5 positivas através do procedimento padrão e 5 com resultado negativo, todas apresentaram baixo desempenho, descartando a possibilidade da utilização do concentrado de células filtrado para aumento da sensibilidade e melhor desempenho do teste IGRA. A tabela a seguir demonstra lado a lado o desempenho segundo concentrações de IFN- γ das amostras lado a lado, com o resultado da reação realizada com sangue total (ST) e o filtrado de PBMC. Nas amostras positivas denominadas 6, 7, 8, 9 e 10 ocorreu baixo desempenho na ativação celular e liberação de IFN- γ . Nas amostras negativas 2, 3 e 4, uma baixa leitura de IFN- γ pode ser observada em células PBMC, em contraponto a reação convencional realizada com sangue total. Apesar desse

achado ser interessante para aprofundamento das investigações para o aumento da sensibilidade do teste, a ausência da ativação do tubo mitógeno, dificulta a utilização apenas do filtrado celular (tabela 07).

Tabela 07. Influência da utilização das células PBMC sobre o resultado do teste QFT gold plus.

IFN- γ (UI/ml)	Nil	TB1	TB2	Mitogen	TB1-Nil	TB2-Nil	Mitogen-Nil	Resultado
ST 1	0,09	5,96	6,4	> 10¶	5,87	6,31	> 10¶	Positivo
PBMC 1	0,04	0,02	0,06	0,02	-0,02	0,02	-0,02	Indeterminado
ST 2	0,11	1,61	1,33	> 10¶	1,5	1,22	> 10¶	Positivo
PBMC 2	0,02	0,02	0,02	0,02	0	0	0	Indeterminado
ST 3	2,97	> 10¶	> 10¶	> 10¶	9,05	9,15	9,08	Positivo
PBMC 3	0,02	0,02	0,04	0,19	0	0,02	0,17	Indeterminado
ST 4	1,73	> 10¶	> 10¶	> 10¶	9,17	9,17	> 10¶	Positivo
PBMC 4	0,04	0,04	0,02	3,73	0	-0,02	3,69	Negativo
ST 5	6,09	> 10¶	> 10¶	> 10¶	4,38	5,2	6,09	Positivo
PBMC 5	0,02	0,02	0,02	0,02	0	0	0	Indeterminado
ST 6	0,16	0,14	0,14	> 10¶	-0,02	-0,02	> 10¶	Negativo
PBMC 6	0,02	0,02	0,02	1,76	0	0	1,74	Negativo
ST 7	0,11	0,11	0,11	> 10¶	0	0	10	Negativo
PBMC 7	0,02	0,06	0,02	0,04	0,04	0	0,02	Indeterminado
ST 8	0,14	0,14	0,16	> 10¶	0	0,02	> 10¶	Negativo
PBMC 8	0,06	0,19	0,04	0,06	0,13	-0,02	0	Indeterminado
ST 9	0,11	0,14	0,14	> 10¶	0,03	0,03	> 10¶	Negativo
PBMC 9	0,04	0,06	0,06	0,09	0,02	0,02	0,05	Indeterminado
ST 10	0,11	0,14	0,14	9,98	0,03	0,03	9,87	Negativo
PBMC 10	0,06	0,04	0,02	0,09	-0,02	-0,04	0,03	Indeterminado

Fonte: produzido pelo autor, 2023.

5.5 QUANTIFICAÇÃO E GRAU DE PUREZA DE RNAM IFN- γ EXTRAÍDO DE CÉLULAS PBMC

A quantificação do rendimento médio de RNAm e grau de pureza obtido através do método de extração foi calculado através da média dos valores obtidos por placa de extração, utilizadas no total 5 placas de 95 poços, e média entre placas, esquematizadas em (figura). A concentração média de RNA ul/ml foi de 3,61 (mediana: 3,52; moda: 4,08; máx: 7,32; mín: 1,36), e o grau de pureza relação A260/A280 média de 1,53 (mediana: 1,57; moda: 1,59; máx: 1,69; mín: 1,27) (tabela 08).

Tabela 08. Quantificação do rendimento médio e grau de pureza obtido pela extração de RNAm de células PBMC por extração automatizada.

Concentração RNA ul/ml		Relação A260/280	
Média	3,61	Média	1,53
Mediana	3,52	Mediana	1,57
Moda	4,08	Moda	1,59
Desvio padrão	1,47	Desvio padrão	0,09
Mínimo	1,36	Mínimo	1,27
Máximo	7,32	Máximo	1,69
Nível de confiança (95,0%)	0,44	Nível de confiança (95,0%)	0,03

Fonte: produzido pelo autor, 2023.

5.6 CÁLCULO DE EXPRESSÃO DE RNAM DE IFN- γ

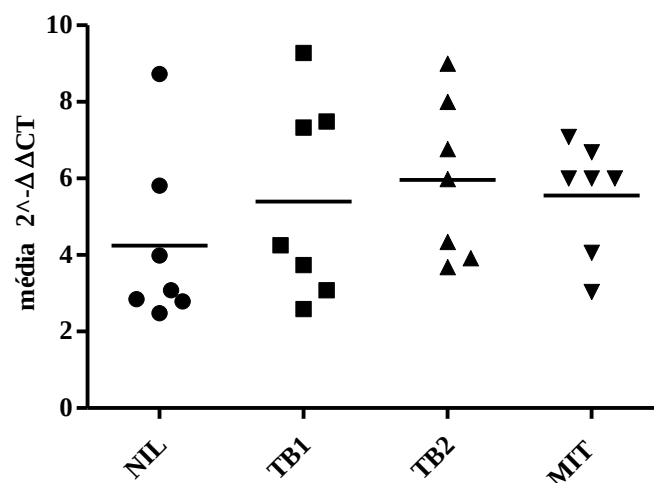
Para análise do valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$, foram realizadas as médias de Ct obtidos das triplicatas realizadas de cada amostra em cada período de 30min, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas (tabela 9), e o Ct referência pelo cálculo da média de triplicata de Ct obtido pela detecção de GAPDH no período de 24 horas, de cada tubo utilizado para estimulação, NIL, TB1, TB2 E MIT . O ΔCt foi calculado através da operação $\Delta Ct = Ct \text{ teste} - Ct \text{ referência}$. O valor de $\Delta\Delta Ct$ foi então calculado por $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ teste} - \Delta Ct \text{ referência}$. Por fim, o cálculo $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a determinação da expressão gênica, foi obtido através da equação $^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ e plotadas as médias de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dentre as 5 amostras em cada período de 30min, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas (figura 8)

Tabela 09. Valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$, obtidos das médias das triplicatas realizadas de cada amostra em cada período de 30min, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas.

Média $2^{\Delta\Delta Ct}$	NIL	TB1	TB2	MIT
30 min	8,730	9,278	5,995	7,095
2 horas	3,081	3,736	6,766	16,896
4 horas	2,850	4,247	3,918	16,200
6 horas	2,475	3,079	3,690	4,063
8 horas	2,785	2,588	19,426	3,045
10 horas	5,807	7,333	18,248	37,235
24 horas	3,988	7,493	4,354	6,692
média	4,250	5,390	8,910	13,030
mediana	3,080	4,250	5,990	7,090

Fonte: produzido pelo autor, 2023.

Figura 8. Distribuição gráfica dos valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$, obtidos das médias das triplicatas realizadas de cada amostra em cada período de 30min, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas.



Fonte: produzido pelo autor, 2023.

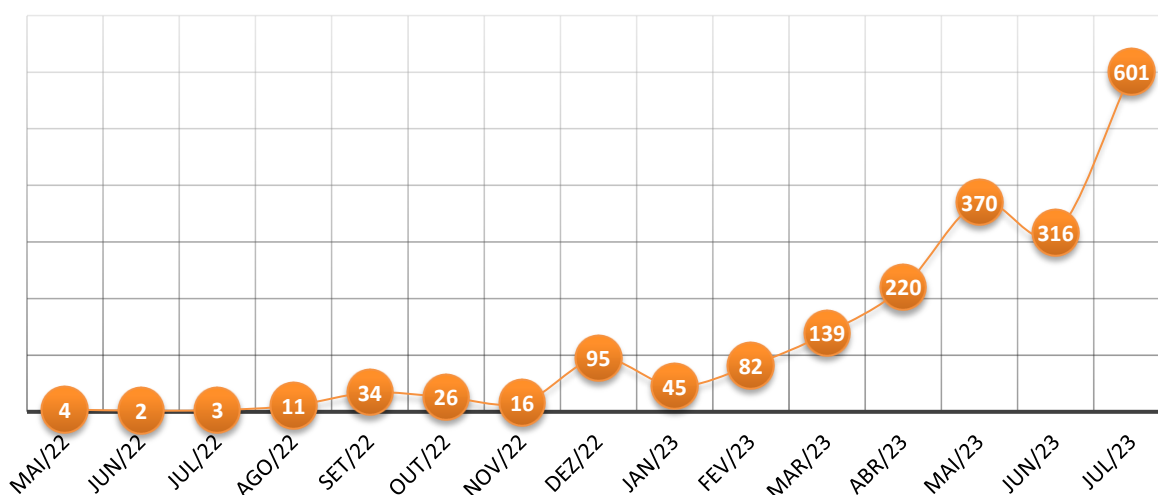
5.7 ANÁLISE DE BANCO DE DADOS E DELINEAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

A análise epidemiológica procedeu-se da consulta ao banco de dados disponível em gal.saude.sp.gov.br, plataforma GAL - Gerenciamento de Ambiente Laboratorial DATASUS. O período analisado foi de Maio de 2022 ao mês de Junho de 2023, totalizando 1.997 amostras encaminhadas para diagnóstico provável ou não pra tuberculose latente.

Avaliando a linha temporal do período em análise pode ser concluído que mês com menor índice de encaminhamento de exames foi de Março de 2022 com 3 solicitações, e o

maior índice no último mês de análise dos dados em Julho de 2023, projetando um característica crescente a partir do mês de Janeiro de 2023 com o processamento de 45 teste chegando ao máximo em Julho de 2023 com 601 exames realizadas durante o mês. Realizando a distribuição do total de exames realizados pelo período (Maio 2022 – Junho 2023) a média mensal seria de 131 exames por mês durante 15 meses (figura 09).

Figura 09. Relação crescente do quantitativo de exames encaminhados para diagnóstico de ILTB no período de Maio de 2022 a Junho de 2023



Fonte: Produzido pelo autor, 2023

A primeira análise foi realizada considerando a faixa etária e o resultado obtido dentro da investigação para casos de ILTB. De 1.997 testes realizados, 1.663 foram considerados não reagentes para diagnóstico sugestivo de ILTB, 238 foram considerados reagentes sugestivos para indivíduos portadores do MT em forma latente, 57 testes realizados foram indeterminados sendo 35 devido a presença de dosagem de IFN- γ no tubo NIL sem antígeno controle negativo e 22 devido à ausência de dosagem de IFN- γ no controle positivo contendo mitógeno. 5 indivíduos inconclusivos devido resultado muito próximo ao limite para ser considerado “reagente” segundo critérios do teste QFT®-Plus Qiagen e 34 testes cancelados sendo 32 devido a volume insuficiente para realização do estímulo, 1 coleta incorreta em tudo com adição de EDTA e 1 com presença de hemólise severa (tabela 10).

Tabela 10. Relação do resultado obtido de casos encaminhados para diagnóstico de ILTB segundo idade.

	Cancelado	Inconclusivo	Indeterminado	Não Reagente	Reagente
Total indivíduos	34	5	57	1663	238
Moda	*	57 anos	54 anos	54 anos	44 anos
Mediana	25 anos	53 anos	47 anos	47 anos	43.5 anos
Média	31 anos	44 anos	44 anos	45 anos	42 anos
Mínimo	2 anos	8 anos	2 anos	1 ano	2 anos
Máximo	77 anos	57 anos	73 anos	92 anos	93 anos

* Amostragem de resultados cancelados foi amodal.

Fonte: Produzido pelo autor, 2023.

Seguindo as análises considerando apenas os resultados obtidos como “Não reagente” e “Reagente” para ILTB subdividiu-se os dados em sexo feminino e masculino, em relação a faixa etária. Foram contabilizados 976 indivíduos do sexo feminino e 925 do sexo masculino (razão 1,05:1). A idade mínima de ambos os grupos foi de 1 ano e a máxima 92 anos sexo feminino e 93 anos sexo masculino (tabela 11).

Tabela 11. Relação do número de casos encaminhados para diagnóstico de ILTB segundo idade e sexo.

	FEMININO	MASCULINO
Total indivíduos	976	925
Moda	54 anos	42 anos
Mediana	50 anos	43 anos
Média	46 anos	42 anos
Idade mínima	1 ano	1 ano
Idade máxima	92 anos	93 anos

Fonte: Produzido pelo autor, 2023.

A maior frequência de exames encaminhados do sexo feminino foi localizada entre os 40 e 60 anos. Já para o sexo masculino, a maior densidade de encaminhamentos se inicia em 20 anos, seguindo com alta densidade até começar a decair após os 60 anos (figura 10).

Figura 10. Pirâmide etária de casos do sexo feminino e masculino encaminhados para realização do teste IGRATB do período de Maio de 2022 a Junho de 2023.

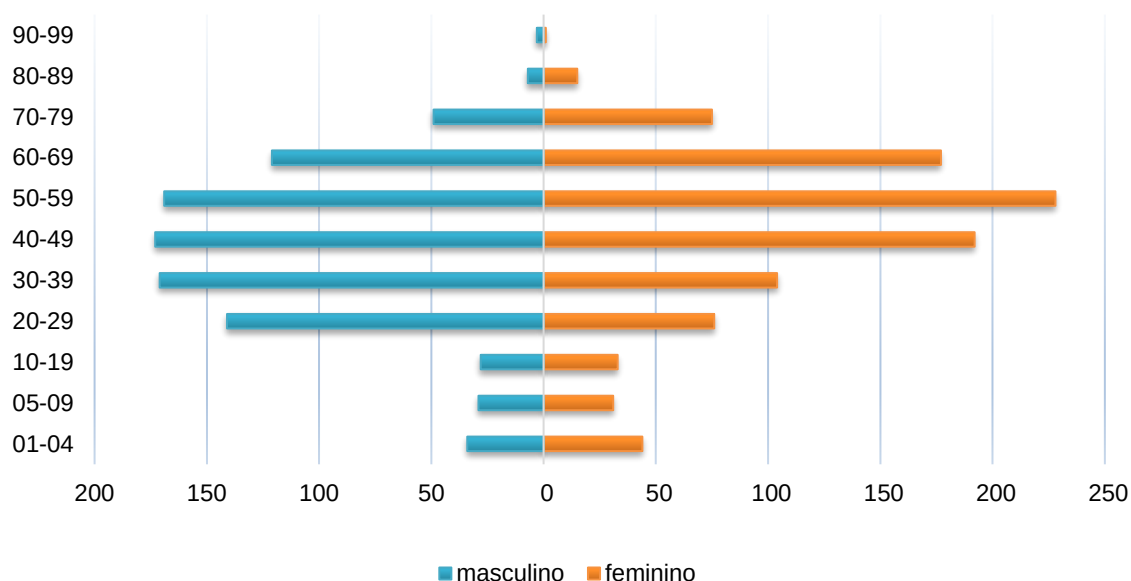


Figura 1. Pirâmide etária de casos do sexo feminino e masculino encaminhados para realização do teste IGRATB do período de Maio de 2022 a Junho de 2023.

Durante a descrição epidemiológica dos exames realizados, mostrou-se relevante também analisar qual o tipo de solicitação para realização do teste de ILTB, em relação a idade. O grande número de solicitações, girou em torno de pacientes que iriam iniciar o uso de imunobiológico com o total de 790 encaminhamentos, em segundo lugar pacientes portadores do vírus HIV no total de 754 testes, crianças 143, pacientes de transplante de medula e órgãos sólidos 37 notificações. Devido a falta do teste PPD durante o processo de implantação pacientes adultos sem a indicações dentro das populações de risco estabelecidas pelo Ministério da Saúde foram encaminhados 64 pacientes adultos descritos como contato ativo com pacientes portadores de TB ativa, e 113 não apresentaram nenhuma identificação na solicitação, inviabilizando a notificação desses resultados (tabela 12).

Tabela 12. Quantitativo em relação do tipo de solicitação encaminhados para diagnóstico de ILTB segundo idade.

	FALTA PPD	CRIANÇA HIV	IMUNO	NC	TRANSP	
Total indivíduos	64	143	754	790	113	37
Moda	27 anos	2 anos	29 anos	54 anos	48 anos	34 anos
Mediana	57 anos	4 anos	44 anos	53 anos	48 anos	58 anos
Média	54 anos	5 anos	44 anos	50 anos	47 anos	53 anos

Fonte: produzido pelo autor, 2023

Considerando o total de 1.901 testes divididos entre 238 considerados “reagente” e 1663 “não reagente”, pode-se afirmar que englobando as 5 regionais do estado de São Paulo atendidas durante a implantação do presente trabalho contabilizando 71 municípios, foi obtida a taxa 14,3% de positividade para casos de ILTB, distribuído nas regionais: DRS III- Araraquara/São Carlos, XIII- Ribeirão Preto, VIII- Franca, XV- São José do Rio Preto e V- Barretos (apêndice 01).

6) DISCUSSÕES

O estudo epidemiológico pode ser considerado uma importante ferramenta de auxílio a estratégias de contenção de casos de tuberculose em 5 regionais diferentes do estado de São Paulo, obtendo a taxa de 14,3 % de casos considerados positivos para ILTB nas regionais: DRS III- Araraquara/São Carlos, XIII- Ribeirão Preto, VIII- Franca, XV- São José do Rio Preto e V- Barretos. Resultados semelhantes já haviam sido apresentados MIRZAZADEH et al., 2021, afirmando que 13,9% de população habitante não nascida nos Estados Unidos é portadora de ILTB. O estudo também relevou a taxa de 13,7% da população da Europa positiva para ILTB, resultados semelhantes aqueles observados nesse estudo.

A Prevalência da Infecção Latente por TB no Oriente Médio e África foi relatada em 31 artigos científicos de dez países dessas regiões e relataram a prevalência de casos de ILTB em 41,78% das populações estudadas, sendo 33,12% e 32,65% em homens e mulheres, respectivamente, com prevalência de 0,44% em crianças, 3,37% adolescentes e 43,81% dos casos relatados em adultos. Já na região da Europa prevalência de ILTB foi estimada em 13,7% da população (BARRY, 2021; GUTHMANN; HAAS, 2019). Os dados epidemiológicos mundialmente encontrados reforçam a importância de continuidade de estudos para melhor entendimento da epidemiologia de tuberculose, auxiliando em ações públicas de prevenção e contação. Além da importância aplicada dos dados, os achados anteriores semelhantes fomentam a confiabilidade dos dados obtidos.

Até o momento da produção da discussão dessa dissertação, não foram encontrados em literatura trabalhos que descrevem a busca pela otimização tanto do tempo decorrente de toda a reação envolvida nos testes IGRA, demandando em média mais de 35 horas ao total do início ao último instante do resultado, como também a investigação de alternativas para diminuição de resultados inconclusivos e indeterminados. Essa falta de publicações nesse sentido traz a importância da realização de trabalhos nesse sentido, como desenvolvido durante esse projeto de mestrado.

Embora não tenham sido obtido resultados favoráveis ao tentar usar temperatura ambiente em oposição à incubação clássica a 37°C no teste IGRA, vale ressaltar que esta investigação proporcionou insights valiosos para otimizar o processo. Foi observada uma redução na dosagem de IFN- γ tanto em amostras negativas quanto positivas, afetando a precisão da reação e o desempenho das células linfocíticas e monocíticas na presença dos antígenos EAST-6 e CFP-10, assim como no controle positivo com mitógeno. Apesar das expectativas iniciais sugerirem que a agitação poderia promover um maior contato célula a célula, levando

a um aumento no processamento e apresentação de antígenos, com subsequente liberação de IFN- γ devido à sensibilização prévia de linfócitos CD4 e CD8, os testes demonstraram o oposto, resultando em um desempenho reduzido. Em sua busca por reduzir o tempo de incubação, realizando a curva de liberação de IFN- γ em intervalos de 30 minutos até um máximo de 24 horas de incubação, tornou-se evidente que já a partir das 4 horas, a dosagem de IFN- γ foi observada. Essas descobertas estão alinhadas com resultados semelhantes relatados por SUNGHYUN et al., sugerindo a viabilidade de investigações adicionais sobre a redução do tempo de incubação estabelecido comercialmente.

Apesar dos desafios encontrados, esta abordagem lhes oferece uma perspectiva otimista para futuras melhorias no processo de diagnóstico, destacando a importância contínua de explorar alternativas que possam tornar os testes mais eficientes e acessíveis. Os níveis crescentes de expressão de mRNA de IFN- γ obtidos por KIM et al., 2013, não foram reproduzidos no presente estudo, porém valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram mais expressivos nos grupos TB1, TB2 e MIT em comparação ao NIL, elucidando que RNAm de IFN- γ pode estar presente em maior expressão devido a ativação de células T frente a antígenos da ILTB, expressando em maior concentração RNAm de IFN- γ devido a síntese da citocina, independente do tempo avaliado.

Mesmo que os resultados obtidos irem em contrapartida a idealização de melhoria de desempenho e maior especificidade, esses são guias para novas ideias e novas propostas no sentido de otimização e novos horizontes na idealização de testes diagnósticos mais práticos, rápidos e acessíveis para casos de tuberculose latente. Apenas duas opções estão disponíveis em todos o mundo para a detecção da ILTB: o teste cutâneo do derivado de proteínas purificado do MT (PPD) que demanda mais de 72 horas para realização e gera inúmeros resultados falsos positivos pela previa sensibilização por bactérias tuberculosas não patogênicas, e o teste IGRA como citado acima com duração média de mais de 35 horas. É de extrema urgência e necessidade a proposta de alternativas mais práticas ao diagnóstico de ILTB.

7) CONCLUSÕES

- Os métodos utilizados para ajustar o valor da dosagem de IFN- γ em relação a população global de CD4 e CD8 em pacientes portadores do vírus HIV através da utilização de células PBMC não foram favoráveis. Deve-se adequar o médio de cultivo utilizado para manutenção das células in vitro.

- Não foram encontradas alternativas de processamento adequadas afim de primorar e otimizar a técnica de dosagem do IFN- γ , descartando falsos negativos e resultados inconclusivos, e facilitação do processamento. Todos os resultados gerados caminharam na contra mão da proposta.

- Análise de dados epidemiológicos através de banco de dados extraído do sistema GAL - Gerenciador de Ambiente Laboratorial trouxe elucidações importantes quanto a epidemiologia da tuberculose em boa parte do Estado de São Paulo.

- Padronizar a proposta de alternativa de diagnóstico de ILTB por meio de RT-qPCR pela amplificação de RNAm de IFN- γ , trouxe resultados favoráveis para implantação de nova metodologias e investigações mais aprofundadas em relação a expressão de RNAm de citocinas inflamatórias.

8) PERSPECTIVAS FUTURAS

O processo de padronização da técnica pode ser concluído durante o processo de mestrado juntamente com propostas para melhorias e otimizações. O método de extração e amplificação poderá ser mantido sem alterações, e adaptações são necessárias no processo de incubação das células PBMC, descartando a utilização de soro fetal bovino puro, repetindo o experimento para extração de RNAm com a utilização de meios de cultivos mais apropriados para células PBMC para obtenção de melhores resultados quando a quantificação de RNAm propriamente dito expressão na presença de antígenos de TB, para validação da técnica com a utilização de amostras aprovadas pelo CEP da cidade de São Carlos (apêndice 2).

Durante o processo de mestrado foi iniciada a primeira proposta do teste alternativo para casos por meio de RT-PCR buscando viabilizar e facilitar o processamento do teste convencional para a ILTB, como citado anteriormente, que demanda extenso tempo e processamento. O processo de padronização da técnica pode ser concluído durante o processo de mestrado, e em continuidade poderão ser realizadas melhorias em metodologias e validação sendo também responsável para elucidar novos caminhos que vão ser seguidos durante o decorrer do doutorado que irá conter também a proposta da padronização de nanosensor aplicado ao diagnóstico de ILTB também já em processo de escrita e estruturação.

9) BIBLIOGRAFIA

1. ANAND, P. K.; KAUL, D. Downregulation of TACO gene transcription restricts mycobacterial entry/survival within human macrophages. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, n. 1, p. 137–144, 2005.
2. BAÑULS, A. L. et al. *Mycobacterium tuberculosis*: Ecology and evolution of a human bacterium. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1261–1269, 2015.
3. BARBIER, M.; WIRTH, T. The evolutionary history, demography, and spread of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Tuberculosis and the Tubercle Bacillus: Second Edition**, 6.ed, n. 1, p. 453–473, 2017.
4. BARRY, M. Prevalence of Latent Tuberculosis Infection in the Middle East and North Africa: **A Systematic Review. Pulmonary Medicine**, v. 2021, 2021.
5. BEHR, M. A., E., DUFFIN, J., EDELSTEIN, P. H., & RAMAKRISHNAN, L. Latent Tuberculosis: Two Centuries of Confusion. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 204, n. 2, p. 142–148, 2021.
6. BENAVENTE, E. D. et al. PhyTB: Phylogenetic tree visualisation and sample positioning for *M. tuberculosis*. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 0–4, 2015.
7. BEUTLER, B. Innate immunity: An overview. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p. 845–859, 2004.
8. BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: An overview of pathophysiology. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, 2012.
9. BISHOP, P. J.; NEUMANN, G. The history of the ziehl-neelsen stain. **Occasional Survey**, v. 51, p. 196–206, 1970.
10. BOSHTAM, M et al. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. **Inflammation**, vol. 40, p. 340-349, 2017
11. BUCCINI, D. F.; CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Antimicrobial Peptides and Cell-Penetrating Peptides for Treating Intracellular Bacterial Infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. February, p. 1–8, 2021.
12. CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29–35, 2006.
13. CAMPOS, H. S. Manejo da doença micobacteriana não-tuberculosa. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, 2000.

14. CHURCHYARD, G. et al. What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 6, p. S629–S635, 2017.
15. COHEN, A. et al. The global prevalence of latent tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. **European Respiratory Journal**, v. 54, n. 3, p. 1–14, 2019a.
16. COHEN, S. B. et al. Tuberculosis Niche and Initiate Dissemination. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 3, p. 439–446, 2019b.
17. DE CHASTELLIER, C. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 526–542, 2009.
18. DELNESTE, Y.; BEAUVILLAIN, C.; JEANNIN, P. **Immunité naturelle. Médecine/Sciences**, v. 23, n. 1, p. 67–74, 2007.
19. DERRICK, S. C.; MORRIS, S. L. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1547–1555, 2007.
20. DING, C. et al. Prevalence trends of latent tuberculosis infection at the global, regional, and country levels from 1990–2019. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 122, p. 46–62, 2022.
21. DJELOUADJI, Z.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Epidemic bursts with a degrading genome. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 641–650, 2011.
22. DOS SANTOS SIMEÃO, F. C. et al. Cord factor detection and macroscopic evaluation of mycobacterial colonies: An efficient combined screening test for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex on solid media. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1212–1216, 2009.
23. FEDRIZZI, T. et al. Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–14, 2017.
24. GAGNEUX, S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 202–213, 2018.
25. GHANAVI, J et al. The role of interferon-gamma and interferon-gamma receptor in tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. **International journal of mycobacteriology**, v. 10,p. 349-357, 2021
26. GRADMANN, C. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. **Medical history**, v. 45, n. 1, p. 1–32, 2001.

27. GROTZKE, J. E.; LEWINSOHN, D. M. Role of CD8⁺ T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 4, p. 776–788, 2005.
28. GUTHMANN, J. P.; HAAS, W. Tuberculosis in the European Union/European economic area: Much progress, still many challenges. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 12, p. 1–3, 2019.
29. HENRY BOOM, W.; SCHAIBLE, U. E.; ACHKAR, J. M. The knowns and unknowns of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 3, 2021.
30. HOUBEN, R. M. G. J.; DODD, P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. **PLoS Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1–13, 2016.
31. HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 2021.
32. KIM, S. et al. Interferon gamma mRNA quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of latent tuberculosis: A novel interferon gamma release assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 1, p. 68–72, 2013.
33. KLAUTAU, G. B. et al. Interferon- γ release assay as a sensitive diagnostic tool of latent tuberculosis infection in patients with HIV: A cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.
34. KOCH, A.; MIZRAHI, V. *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 555–556, 2018.
35. KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.
36. LIN, P. L.; FLYNN, J. L. The End of the Binary Era: Revisiting the Spectrum of Tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 9, p. 2541–2548, 2018.
37. LIU, C. et al. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Advanced Science**, v. 8, n. 15, 2021.
38. MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. **New England Journal of Medicine**, v. 388, n. 5, p. 439–452, 2023.
39. MARTIN, C. J.; CAREY, A. F.; FORTUNE, S. M. A bug's life in the granuloma. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 213–220, 2016.

40. MIRZAZADEH, A. et al. State-level prevalence estimates of latent tuberculosis infection in the United States by medical risk factors, demographic characteristics and nativity. **PLoS ONE**, v. 16, n. 4 April, p. 1–15, 2021.
41. MOLINO, M. P. DEL et al. Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. **Medicina Integral**, v. 39, n. 5, p. 207–215, 2002.
42. NEEFJES, J. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2011.
43. O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, n. SUPPL. 1, p. 1–46, 1995.
44. ONYEAKA, H. et al. COVID-19 pandemic: A review of the global lockdown and its far-reaching effects. **Science Progress**, v. 104, n. 2, p. 1–18, 2021.
45. OPAL, S M; DEPALO, V A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, v. 117,4, p. 1162-72, 2022
46. PANG, Y. et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis among inpatients, China, 2008-2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 457–464, 2019.
47. PARRA-ORTEGA, I. et al. Detection and quantification of T-cell subpopulations and NK cells in peripheral blood from healthy individuals. **Boletín Medico del Hospital Infantil de Mexico**, v. 76, n. 2, p. 66–78, 2019.
48. POTTER, E. &. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.
49. RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352–366, 2012.
50. RAMANATHAN, K. et al. The intersecting pandemics of tuberculosis and COVID-19: population-level and patient-level impact, clinical presentation, and corrective interventions. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 10:603-22, n. march, p. 529–531, 2022.
51. RAMSUGIT, S.; PILLAY, M. Pili of *Mycobacterium tuberculosis*: current knowledge and future prospects. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 6, p. 737–744, 2015.
52. RAO, X. et al. An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. **Biostatistics, bioinformatics and biomathematics**, v. 3, n. 3, p. 71–85, 2013.
53. RODWELL, T. C. et al. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. suppl. 3, p. e129–e135, 2010.

54. ROLO, M. et al. Epidemiology and factors associated with Extra-pulmonary tuberculosis in a Low-prevalence area. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 32, n. May, p. 10–14, 2023.
55. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Doença pelo novo coronavírus – COVID-19**, 2023.
56. SILVA, D. R. et al. Consenso sobre o diagnóstico da tuberculose da sociedade Brasileira de pneumologia e tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 47, n. 2, p. 1–13, 2021.
57. SIQUEIRA, R. C.; ORÉFICE, F. The potential of the IGRA (Interferon Gamma Release Assay) test for the diagnosis of ocular tuberculosis. Review and comparative analysis with the tuberculosis skin test. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 78, n. 3, p. 202–209, 2019.
58. STEAD, W. W. The origin and erratic global spread of tuberculosis: How the past explains the present and is the key to the future. **Clinics in Chest Medicine**, v. 18, n. 1, p. 65–77, 1997.
59. SUNGHYUN, K et al. Interferon gamma mRNA quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of latent tuberculosis: a novel interferon gamma release assay *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 75, p. 68-72, 2023.
60. TURNER, P. C.; MCLENNAN, A. G.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. Instant notes in molecular biology. **Guildford Biddles**, p.307, 1997.

10) APÊNDICES

Bula do ELISA QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus)

 2 x 96

As respostas de medição de teste de sangue total IFN- γ
para os antígenos péptidos ESAT-6 e CFP-10



Para utilização em diagnóstico *in vitro*



622120



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ALEMANHA
Telefone: +49-2103-29-0

1083163PT Rev. 02



www.QuantiFERON.com



Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação do teste	4
Princípios do ensaio	5
Tempo necessário para execução do ensaio	6
Componentes e armazenamento	7
Materiais necessários mas não fornecidos	8
Armazenamento e manuseamento	8
Advertências e precauções	9
Advertências	9
Precauções	10
Colheita e manuseamento de amostras	13
Indicações de utilização	15
Cálculos e interpretação de testes	20
Geração de curva padrão	20
Controlo de qualidade do teste	21
Interpretação de resultados	21
Limitações	23
Características de desempenho	24
Estudos clínicos	24
Características de desempenho dos ensaios	30
Informações técnicas	35
Resultados indeterminados	35
Amostras de plasma coaguladas	35
Guia de resolução de problemas	36
Bibliografia	38
Símbolos	43
Informações de contacto	43
Procedimento abreviado do teste	44

Utilização prevista

O ensaio QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) é um teste de diagnóstico *in vitro* que usa um cocktail de péptidos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10 para estimular células em sangue total heparinizado. A detecção do interferão- γ (IFN- γ) por ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizada para identificar respostas *in vitro* aos antígenos péptidos associados com a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus é um teste indirecto para infecção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e destina-se a utilização conjunta com a avaliação de riscos, radiografia e outras avaliações médicas e de diagnóstico.

Resumo e explicação do teste

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por infecção por organismos do complexo *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), que tipicamente se espalham para novos hospedeiros através de núcleo de gotículas transportado por via aérea a partir de pacientes com tuberculose respiratória. Um indivíduo recém-infectado pode ficar doente com tuberculose em poucas semanas ou meses, mas a maioria dos indivíduos infectados permanece bem. A infecção tuberculosa latente (LTBI), uma doença não infecciosa assintomática, persiste em alguns, que poderão desenvolver tuberculose meses ou anos mais tarde. O principal objectivo de diagnosticar LTBI é o de considerar tratamento médico para prevenir a tuberculose. Até há pouco tempo, o teste cutâneo de tuberculina (TST) era o único método disponível para diagnosticar a LTBI. A sensibilidade cutânea à tuberculina desenvolve-se entre 2 a 10 semanas após a infecção. Contudo, alguns indivíduos infectados, incluindo aqueles com uma série de patologias que prejudiquem as funções imunitárias, mas também outros que não as tenham, não respondem à tuberculina. Por outro lado, alguns indivíduos com baixa probabilidade de estarem infectados com *M. tuberculosis* apresentam sensibilidade à tuberculina e denotam TST positivo após a vacinação com o bacilo Calmette-Guérin (BCG), infecção com outra micobactéria que não do complexo *M. tuberculosis*, ou por outros factores indeterminados.

Deve distinguir-se a LTBI da tuberculose, uma doença de notificação obrigatória que normalmente envolve os pulmões e o tracto respiratório inferior, embora outros sistemas orgânicos também possam ser afectados. A tuberculose é diagnosticada através de achados de historial clínico, físicos, radiológicos, histológicos e micobacterianos.

O QFT-Plus é um teste de respostas imunitárias mediadas por células (CMI) a antígenos péptidos que simulam proteínas micobacterianas. Estas proteínas, ESAT-6 e CFP-10, estão ausentes de todas as estirpes de BCG e da maioria das micobactérias não tuberculosas à excepção de *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1). Normalmente, os indivíduos infectados com organismos do complexo MTB possuem linfócitos no sangue que reconhecem estes e outros antígenos micobacterianos. Este processo de reconhecimento envolve a produção e secreção da citocina IFN- γ . A detecção e subsequente quantificação de IFN- γ forma a base deste teste.

Os antígenos utilizados no QFT-Plus são um cocktail de péptidos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10. Vários estudos demonstram que estes antígenos péptidos estimulam a resposta de IFN- γ nas células-T de indivíduos infectados com *M. tuberculosis*, mas, normalmente não em pessoas não infectadas ou vacinadas com BCG, sem a doença ou risco de LTBI (1–32). Porém, os tratamentos médicos ou as doenças que prejudicam as funções imunitárias podem potencialmente reduzir as respostas de IFN- γ . Os pacientes com certas infecções micobacterianas poderão também responder a ESAT-6 e CFP-10, uma vez que os genes que codificam essas proteínas estão presentes em *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1, 23). O QFT-Plus é um teste de LTBI e uma ajuda útil para diagnosticar uma infecção do complexo *M. tuberculosis* em pacientes doentes. Um resultado positivo suporta o diagnóstico de tuberculose, mas infecções por outra micobactéria (por ex., *M. kansasii*) podem também levar a resultados positivos. São necessárias outras avaliações clínicas ou de diagnóstico para confirmar ou excluir a tuberculose.

O QFT-Plus possui dois tubos de antígeno de TB distintos: Tubo de antígeno de TB 1 (TB1) e Tubo de antígeno de TB 2 (TB2). Ambos os tubos contêm antígenos péptidos dos antígenos associados ao complexo MTB, ESAT-6 e CFP-10. Ao passo que o tubo TB1 contém péptidos de ESAT-6 e CFP-10 que são concebidos para induzir respostas CMI de linfócitos T auxiliares CD4⁺, o tubo TB2 contém um conjunto adicional de péptidos que visam a indução de respostas CMI de linfócitos T citotóxicos CD8⁺. Na história natural da infecção com MTB, as células T CD4⁺ desempenham um papel fundamental no controlo imunológico através da secreção de citocina IFN- γ . As evidências atuais suportam um papel das células T CD8⁺ na defesa do hospedeiro contra a MTB produzindo IFN- γ e outros factores solúveis, que activam macrófagos para suprimir o crescimento da MTB, destruir células infectadas ou lisar a MTB intracelular directamente (33–35). As células CD8⁺ específicas de MTB foram detectadas em indivíduos com LTBI e com tuberculose activa em que podem ser frequentemente encontradas células CD8⁺ produtoras de IFN- γ (36–38). Além disso, os linfócitos T CD8⁺ específicos de ESAT-6 e CFP-10 são descritos como sendo detectados mais frequentemente em indivíduos com tuberculose activa relativamente a LTBI, e podem estar associados a exposição recente a MTB (39–41). Foram ainda detectadas células T CD8⁺ específicas de MTB produtoras de IFN- γ com indivíduos com tuberculose activa com co-infecção por HIV (42, 43) e em crianças com tuberculose (44).

Princípios do ensaio

O ensaio QFT-Plus utiliza tubos de colheita sanguínea especializados, que são usados para colher sangue total. A incubação do sangue ocorre em tubos durante 16 a 24 horas, após as quais o plasma é colhido e testado para presença de IFN- γ produzido em resposta aos antígenos péptidos.

O teste QFT-Plus é desempenhado em duas etapas. Em primeiro lugar, o sangue total é colhido para cada um dos tubos de colheita sanguínea QFT-Plus, que incluem um tubo de Nil, um tubo TB1, um tubo TB2 e um tubo de mitógeno. Em alternativa, o sangue pode ser colhido num

único tubo genérico para colheita de sangue contendo heparina de lítio como anticoagulante e, em seguida, transferido para os tubos QFT-Plus.

O tubo de mitógeno é utilizado com o teste QFT-Plus como um controlo positivo. Isso poderá ser importante caso existam dúvidas quanto ao estado imunitário do indivíduo. O tubo de mitógeno serve também de controlo para um manuseamento e incubação correctos do sangue.

Os tubos QFT-Plus devem, logo que possível, ser incubados a 37 °C após, no máximo, 16 horas depois da colheita. Após um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é removido e a quantidade de IFN- γ (UI/ml) é medida pelo ELISA.

Um ensaio QFT-Plus é considerado positivo para uma resposta de IFN- γ a qualquer dos tubos de antígeno de TB que esteja significativamente acima do valor de Nil IFN- γ UI/ml. A amostra de plasma do tubo de mitógeno serve como um controlo positivo de IFN- γ para cada amostra testada. Uma resposta baixa ao mitógeno (<0,5 UI/ml) indica um resultado indeterminado quando uma amostra sanguínea também tiver uma resposta negativa aos antígenos de TB. Este padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, actividade reduzida dos linfócitos devido a manuseamento inadequado da amostra, enchimento/mistura incorrecta do tubo de mitógeno ou incapacidade de os linfócitos do paciente gerarem IFN- γ . O tubo Nil ajusta-se aos efeitos de fundo (por ex., níveis excessivos de IFN- γ circulante ou presença de anticorpos heterófilos). O nível de IFN- γ do tubo de Nil é subtraído ao nível de IFN- γ do tubo de antígeno de TB e do de mitógeno.

Tempo necessário para execução do ensaio

O tempo necessário para executar o ELISA QFT-Plus é estimado em baixo, o tempo de teste de várias amostras quando em lote é também indicado:

Incubação a 37 °C de tubos de sangue: 16 a 24 horas

ELISA: Aprox. 3 horas para uma placa ELISA
(22 indivíduos)
<1 hora de trabalho

Adicione 10 a 15 minutos para cada placa extra

Componentes e armazenamento

Tubos de colheita sanguínea*		200 tubos	Embalagem individual para paciente
Ref. ^a		622526	622222
Número de testes/embalagem		50	10
QuantiFERON Nil Tube (tubo de Nil) (tampa cinzenta, anel branco)	Nil	50 tubos	10 tubos
QuantiFERON TB1 Tube (tubo TB1) (tampa verde, anel branco)	TB1	50 tubos	10 tubos
QuantiFERON TB2 Tube (tubo TB2) (tampa amarela, anel branco)	TB2	50 tubos	10 tubos
QuantiFERON Mitogen Tube (tubo de mitógeno) (tampa púrpura, anel branco)	Mitogen	50 tubos	10 tubos
Bula dos tubos de colheita sanguínea QFT-Plus		1	1
Componentes do ELISA[†]			Kit ELISA de 2 placas
Ref. ^a			622120
Tiras de microplaca (12 x 8 poços) revestidos com anticorpo monoclonal de murino anti-humano IFN-γ			2 conjuntos de tiras de microplaca de 12 x 8 poços
IFN-γ Standard, lyophilized (Padrão IFN-γ liofilizado) (contém IFN-γ humano recombinante, caseína bovina, Timerosal com 0,01% peso/volume)			1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (Diluyente Verde) (contém caseína bovina, soro normal de rato, Timerosal com 0,01% peso/volume)			1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Concentrado 100x de Conjugado liofilizado) (HRP de IFN-γ murino anti-humano, contém Timerosal com 0,01% peso/volume)			1 x 0,3 ml (quando reconstituído)
Wash Buffer 20x Concentrate (Concentrado 20x de tampão de lavagem) (pH 7,2, contém fracção volúmica de 0,05% de ProClin® 300)			1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato de enzimas) (contém H ₂ O ₂ , Tetrametilbenzidina 3,3', 5,5')			1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de paragem de enzimas) (contém 0,5 M de H ₂ SO ₄)			1 x 15 ml
Bula do QFT-Plus ELISA			1

* Não estão disponíveis todas as configurações de produto em todos os países. Consulte o atendimento ao cliente da QIAGEN (detalhes em www.qiagen.com) para mais informações acerca das configurações disponíveis para encomenda.

† Consulte a página 9 para verificar as precauções e advertências de perigo.

Materiais necessários mas não fornecidos

- Incubadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. CO_2 não necessário
- Pipetas* de volume calibrado variável para fornecimento de 10 μl a 1000 μl com pontas descartáveis
- Pipeta* calibrada multicanal com capacidade para fornecer entre 50 μl e 100 μl com pontas descartáveis
- Agitador de microplacas*
- Água desionizada ou destilada, 2 litros
- Lavadora de microplacas (recomendada lavadora automática)
- Leitor de microplacas* equipado com filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 a 650 nm

Armazenamento e manuseamento

Tubos de colheita sanguínea

- Armazene os tubos de colheita sanguínea entre $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Reagentes do kit

- Armazene os reagentes do kit entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Mantenha a solução de substrato de enzimas sempre protegida de luz solar directa.

Reagentes reconstituídos e não utilizados

Para instruções sobre como reconstituir os reagentes, consulte a página 16.

- O padrão reconstituído do kit pode ser guardado durante 3 meses, se a temperatura for de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Anote a data na qual o padrão do kit foi reconstituído.
- Uma vez reconstituído, o Concentrado 100x de Conjugado não utilizado tem de ser novamente armazenado entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e tem de ser utilizado no prazo de 3 meses.
Anote a data na qual o conjugado foi reconstituído.
- O conjugado funcional tem de ser utilizado num prazo de 6 horas após a preparação.
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado a temperatura ambiente durante 2 semanas.

* Certifique-se de que os equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Advertências

- Um resultado QFT-Plus negativo não exclui a possibilidade de infecção por *M. tuberculosis* ou de tuberculose: os falsos negativos podem ocorrer devido ao estágio da infecção (por ex., amostra obtida antes do desenvolvimento da resposta imunitária celular), comorbidade com doenças que afectam as funções imunitárias, manuseamento incorrecto dos tubos de colheita sanguínea após a punção venosa, execução incorrecta do ensaio, ou outras variáveis imunológicas.
- Um resultado QFT-Plus negativo não deve ser a base única ou definitiva para determinar a infecção por *M. tuberculosis*. A execução incorrecta do ensaio pode causar falsos positivos.
- Um resultado QFT-Plus positivo deve ser seguido por uma avaliação médica e diagnóstica mais aprofundada de tuberculose activa (por ex., esfregaço e cultura de Ácido-álcool resistência (AFB), radiografia ao peito).
- Embora as proteínas ESAT-6 e CFP-10 estejam ausentes de todas as estirpes de BCG e da maioria das micobactérias não tuberculosas conhecidas, é possível que ocorra um resultado positivo do QFT-Plus devido à infecção por *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. Em caso de suspeita das referidas infecções, dever-se-ão investigar métodos alternativos.

Precauções

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (SDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as SDS de cada kit QIAGEN e componente do kit.



ATENÇÃO: Manuseie o sangue e o plasma humanos como sendo potencialmente infecciosos. Respeite as directrizes relevantes relativas ao manuseamento de sangue e de seus produtos. Elimine as amostras e os materiais que entrem em contacto com sangue ou seus produtos em conformidade com a legislação local.

As seguintes advertências de precaução e de perigo aplicam-se aos componentes do ELISA QuantiFERON-TB Gold.

Advertências de perigo



QuantiFERON Conjugate (Conjugado QuantiFERON)

Contém: ácido bórico. Perigo! Pode prejudicar a fertilidade ou o feto. Eliminar o conteúdo/recipiente numa central de eliminação de resíduos homologada. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consultar um médico. Obter instruções específicas antes da utilização. Armazenar em local seguro. Usar luvas protecção/vestuário de protecção/óculos de protecção/máscara de protecção.



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

(Solução de paragem de enzimas QuantiFERON)

Contém: ácido sulfúrico. Perigo! Provoca queimaduras graves na pele e danos oculares. Pode ser corrosivo para metais. Eliminar o conteúdo/recipiente numa central de eliminação de resíduos homologada. EM CASO DE CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Remover lentes de contacto, se presentes e se forem de remoção fácil. Retomar enxaguamento. EM CASO DE CONTACTO COM A PELE (ou cabelo): Remover/despir imediatamente todo o vestuário contaminado. Enxaguar a pele com água/tomar duche. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Armazenar em local seguro. Usar luvas protecção/vestuário de protecção/óculos de protecção/máscara de protecção.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

(Solução de substrato de enzimas QuantiFERON)

Aviso! Provoca irritação cutânea ligeira. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.



QuantiFERON Green Diluent
(Diluyente verde QuantiFERON)

Contém: 5-Hidroxi-1-(4-sulfofenil)-4-(4-(sulfofenil)azo)pirazole-3-carboxilato de trissódio. Aviso! Pode provocar uma reacção alérgica na pele. Eliminar o conteúdo/recipiente numa central de eliminação de resíduos homologada. Despir os vestuário contaminado e lavar antes de voltar a utilizar. Em caso de irritação ou erupção cutânea: consultar um médico. Usar luvas protecção/ vestuário de protecção/óculos de protecção/máscara de protecção.



QuantiFERON IFN- γ Standard
(Padrão QuantiFERON IFN- γ)

Contém: ácido bórico. Perigo! Pode prejudicar a fertilidade ou o feto. Eliminar o conteúdo/recipiente numa central de eliminação de resíduos homologada. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consultar um médico. Obter instruções específicas antes da utilização. Armazenar em local seguro. Usar luvas protecção/ vestuário de protecção/óculos de protecção/máscara de protecção.



QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate
(Concentrado 20x de tampão de lavagem QuantiFERON)

Contém: mistura de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona e 2-metil-2H-isotiazole-3-ona (3:1). Aviso! Pode provocar uma reacção alérgica na pele. Usar luvas protecção/ vestuário de protecção/óculos de protecção/máscara de protecção.

Advertências de precaução

Obter instruções específicas antes da utilização. Usar luvas protecção/ vestuário de protecção/óculos de protecção/máscara de protecção. EM CASO DE CONTACTO COM A PELE (ou cabelo): Remover/despir imediatamente todo o vestuário contaminado. Enxaguar a pele com água/tomar duche. **EM CASO DE CONTACTO COM OS OLHOS:** enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Remover lentes de contacto, se presentes e se forem de remoção fácil. Retomar enxaguamento. Em caso exposição ou suspeita de exposição: consultar um médico. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTI- VENENOS ou um médico. Em caso de irritação ou erupção cutânea: consultar um médico. Despir os vestuário contaminado e lavar antes de voltar a utilizar. Armazenar em local seguro. Eliminar o conteúdo/recipiente numa central de eliminação de resíduos homologada.

Informações adicionais

Fichas de dados de segurança: www.qiagen.com/safety

- Divergências em relação à *bula do QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA* podem produzir resultados errados. Leia as instruções cuidadosamente antes da utilização.
- Não utilize o kit se qualquer um dos frascos de reagente apresentar sinais de dano ou fuga antes da utilização.

- Não misture nem utilize as tiras de microplaca, o IFN- γ padrão, o Diluente Verde, ou o Concentrado 100x de Conjugado de diferentes lotes de kits QFT-Plus. Os outros reagentes (Concentrado 20x de tampão de lavagem, solução de substrato de enzimas e solução de paragem de enzimas) podem ser trocados entre kits contanto que os reagentes estejam dentro do seu período de validade e que os detalhes do lote sejam registados. Elimine os reagentes e amostras biológicas não utilizados em conformidade com a legislação em vigor.
- Não utilize os tubos de colheita sanguínea QFT-Plus ou o kit ELISA QFT-Plus após a data de validade.
- Certifique-se de que o equipamento laboratorial foi calibrado e homologado para utilização.

Colheita e manuseamento de amostras

O QFT-Plus utiliza os seguintes tubos de colheita:

1. QuantiFERON Nil Tubes (tubos de Nil) (tampa cinzenta com anel branco)
2. QuantiFERON TB1 Tubes (tubos TB1) (tampa verde com anel branco)
3. QuantiFERON TB2 Tubes (tubos TB2) (tampa amarela com anel branco)
4. QuantiFERON Mitogen Tubes (tubos de mitógeno) (tampa púrpura com anel branco)

Siga as instruções para tubos com heparina de lítio abaixo.

Os antigénios foram desidratados e afixados à parede interna dos tubos de colheita sanguínea, de modo que é essencial que o conteúdo dos tubos seja bem misturado com o sangue. Os tubos QFT-Plus devem, logo que possível, ser transferidos para uma incubadora a 37 °C após, no máximo, 16 horas depois da colheita.

Para obter resultados ideais, devem ser respeitados os seguintes procedimentos:

1. Rotule os tubos adequadamente.

Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen) é identificável pelo rótulo ou por outro meio após remoção da tampa.

2. Colha 1 ml de sangue por doente através de punção venosa directamente para dentro de cada um dos tubos de colheita sanguínea QFT-Plus. Este procedimento deve ser desempenhado por um flebotomista qualificado.

Nota importante: Os tubos devem encontrar-se a uma temperatura entre 17 e 25 °C aquando do enchimento.

Os tubos de colheita sanguínea QFT-Plus podem ser utilizados até uma altitude de 810 metros acima do nível do mar.

Uma vez que os tubos de 1 ml colhem sangue relativamente devagar, mantenha o tubo na agulha durante 2 a 3 segundos após o tubo aparentar estar cheio. Isto irá garantir que é colhido o volume correto.

A marca preta na parte lateral do tubo indica o intervalo validado de 0,8 a 1,2 ml. Se o nível de sangue em qualquer tubo estiver fora do intervalo da marca indicadora, deve ser obtida uma nova amostra sanguínea.

Se for utilizada uma agulha escalpe para colher sangue, deve ser utilizado um tubo de "purga" para garantir que a tubagem é enchida com sangue antes da utilização dos tubos QFT-Plus.

Se utilizar tubos de colheita sanguínea QFT-Plus a uma altitude superior a 810 metros, ou se ocorrer um baixo volume de colheita sanguínea, os utilizadores podem colher sangue com uma seringa e transferir imediatamente 1 ml para cada um dos 4 tubos. Por razões de segurança, recomenda-se executar este procedimento removendo a agulha da seringa, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo as tampas dos 4 tubos QFT-Plus e adicionando 1 ml de sangue a cada tubo (até ao centro da marca

preta na parte lateral do rótulo do tubo). Volte a colocar as tampas em segurança e misture conforme descrito em baixo.

Em alternativa, o sangue pode ser colhido num único tubo genérico para colheita de sangue contendo heparina de lítio como anticoagulante e, em seguida, transferido para os tubos QFT-Plus. **Utilize apenas a heparina de lítio** como anticoagulante sanguíneo, uma vez que os outros anticoagulantes interferem com o ensaio. Encha um tubo de colheita sanguínea (volume mínimo de 5 ml) e misture suavemente invertendo o tubo várias vezes para dissolver a heparina. O sangue deve ser conservado à temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) antes de ser transferido para os tubos QFT-Plus para incubação, que **tem de ser** iniciada no máximo 16 horas após a colheita do sangue. Se o sangue tiver sido colhido num tubo de heparina de lítio, as amostras devem ser bem misturadas, invertendo-as suavemente antes de transferir para tubos QFT-Plus. A transferência deve ser executada em condições assépticas, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo as tampas dos 4 tubos QFT-Plus e adicionando 1 ml de sangue a cada um (até ao centro da marca preta na parte lateral do rótulo do tubo). Volte a colocar as tampas dos tubos em segurança e misture conforme descrito em baixo.

3. **Agite os tubos dez (10) vezes imediatamente após os encher de forma a garantir que toda a superfície interna do tubo fica revestida de sangue. Este procedimento dissolverá os antigénios da parede do tubo.**

Nota importante: os tubos devem encontrar-se a uma temperatura entre 17 e 25 °C aquando da agitação. Uma agitação demasiado vigorosa poderá causar ruptura do gel e levar a resultados anómalos.

4. **Após a etiquetagem, o enchimento e a agitação, os tubos devem, logo que possível, ser transferidos para uma incubadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em menos de 16 horas após a colheita. Antes da incubação, conserve os tubos à temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).**

Indicações de utilização

Etapa 1 – incubação do sangue e colheita do plasma

Materiais fornecidos

- Tubos de colheita sanguínea QFT-Plus (consulte a Secção 3).

Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Consulte a Secção 3.

Procedimento

1. Se o sangue não for incubado imediatamente após a colheita, é necessário efectuar uma nova mistura dos tubos, invertendo-os 10 vezes, antes da incubação.
2. Incubar os tubos na VERTICAL a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO_2 nem de humidificação.
3. Após a incubação a 37 °C , os tubos de colheita sanguínea poderão ser mantidos entre 4 °C e 27 °C durante até 3 dias antes da centrifugação.
4. Após a incubação dos tubos a 37 °C , a colheita é facilitada centrifugando os tubos durante 15 minutos entre 2000 a 3000 x g RCF (g). O tampão de gel separará as células do plasma. Caso isso não ocorra, dever-se-á centrifugar novamente os tubos.
É possível colher o plasma sem centrifugação, mas são necessários cuidados adicionais para remover o plasma sem perturbar as células.
5. **As amostras de plasma apenas devem ser colhidas utilizando uma pipeta.**

Nota importante: após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.

As amostras de sangue podem ser carregadas directamente dos tubos de colheita sanguínea centrifugados para dentro da placa QFT-Plus ELISA, inclusive quando forem utilizadas as estações de trabalho automatizadas ELISA.

As amostras de plasma podem ser armazenadas durante 28 dias a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C ou, se colhidas, inferior a -20 °C para períodos mais prolongados.

Para obter amostras de teste adequadas, colha no mínimo 150 µl de plasma.

Etapa 2 – ELISA IFN- γ

Materiais fornecidos

- Kit QFT-Plus ELISA (consulte a Secção 3).

Materiais necessários mas não fornecidos

- Consulte a Secção 3.

Procedimento

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, excepto o Concentrado 100x de Conjugado, têm de ser colocados à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de utilizados. Aguarde, no mínimo, 60 minutos para alcançar o equilíbrio térmico.
2. Remova da estrutura as tiras que não sejam necessárias, sele a bolsa de folha de alumínio e volte a colocar no frigorífico para armazenar até ser necessária.

Deixe pelo menos 1 tira para os padrões QFT-Plus e tiras suficientes para o número de indivíduos a ser testados (consulte a Figura 2). Após a utilização, conserve a estrutura e a tampa para utilizar com as tiras restantes.

3. Reconstitua o padrão IFN- γ com o volume de água desionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco. Misture suavemente para minimizar a espuma e para garantir a solubilização completa. A reconstituição do padrão com o volume declarado produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/ml.

Nota importante: o volume de reconstituição do padrão do kit será diferente de lote para lote.

Utilize o padrão reconstituído do kit para produzir uma diluição 1 em 2 seguida de uma série de diluição 1 em 4 de IFN- γ em Diluente Verde (GD) (consulte a Figura 1). P1 (Padrão 1) contém 4,0 UI/ml, P2 (Padrão 2) contém 1,0 UI/ml, P3 (Padrão 3) contém 0,25 UI/ml, e P4 (Padrão 4) contém 0 UI/ml (apenas GD). Os padrões devem ser testados, pelo menos, em duplicado. Prepare novas diluições do padrão do kit para cada sessão do ELISA.

Procedimento recomendado para padrões em duplicado

- Rotule os 4 tubos "P1", "P2", "P3", "P4".
- Adicionar **150 µl** de GD a P1, P2, P3, P4.
- Adicionar **150 µl** do padrão do kit a P1 e misturar bem.
- Transferir **50 µl** de P1 para P2 e misturar bem.
- Transferir **50 µl** de P2 para P3 e misturar bem.
- Apenas GD** serve como padrão zero (P4).

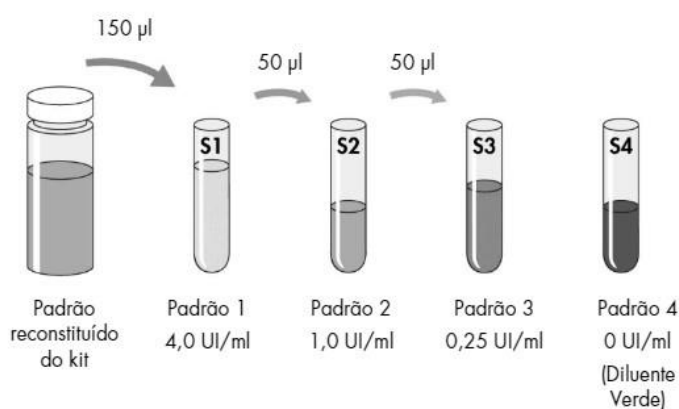


Figura 1. Preparação de curva padrão.

- Reconstitua o Concentrado 100x de Conjugado liofilizado com 0,3 ml de água desionizada ou destilada. Misture suavemente para minimizar a espuma e para garantir a solubilização completa do conjugado.**

O conjugado funcional é preparado diluindo a quantidade necessária de Concentrado 100x de Conjugado reconstituído em Diluente Verde (Tabela 1. Preparação de conjugado). Volte a colocar qualquer Concentrado 100x de Conjugado não utilizado entre 2 e 8 °C imediatamente após a utilização. Utilize apenas Diluente Verde.

Tabela 1. Preparação de conjugado

Número de tiras	Volume de Concentrado de conjugado 100x	Volume de Diluente Verde
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Relativamente às amostras de plasma colhidas dos tubos de colheita sanguínea e subsequentemente congeladas ou armazenadas, misture bem antes de adicionar ao poço ELISA.

Nota importante: se pretender adicionar as amostras de plasma directamente a partir dos tubos QFT-Plus centrifugados, deve evitar misturar, de modo algum, o plasma. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.

6. Adicione 50 µl de conjugado funcional recém-preparado aos poços ELISA necessários utilizando uma pipeta multicanal.
7. Adicione 50 µl de amostra de plasma para teste aos poços adequados utilizando uma pipeta multicanal (consulte o esquema recomendado da placa na Figura 2). Por fim, adicione 50 µl a cada um dos Padrões 1 a 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	P1	P1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	P2	P2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
C	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	P3	P3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	P4	P4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 TB2	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
G	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Figura 2. Esquema recomendado das amostras (22 testes por placa).

- P1 (Padrão 1), P2 (Padrão 2), P3 (Padrão 3), P4 (Padrão 4)
- 1 N (Amostra 1. plasma de Nil), 1TB1 (Amostra 1. plasma de TB1),
1 TB1 (Amostra 1. plasma de TB2), 1 M (Amostra 1. plasma de mitógeno)

8. Cubra cada placa com uma tampa e misture bem o conjugado e as amostras/padrões de plasma utilizando um agitador de microplacas, durante 1 minuto. Evitar salpicos.
9. Cubra cada placa com uma tampa e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 120 ± 5 minutos.
Durante a incubação, as placas não devem estar expostas a luz solar directa.
10. Durante a incubação, dilua uma parte de Concentrado 20x de tampão de lavagem com 19 partes de água desionizada ou destilada, e misture bem. É fornecido Concentrado 20x de tampão de lavagem suficiente para preparar 2 litros de tampão de lavagem funcional. Poços de lavagem com 400 µl de tampão de lavagem funcional para pelo menos 6 ciclos. Recomenda-se uma lavadora de placas automática.
Uma lavagem exaustiva é muito importante para o desempenho do ensaio. Certifique-se de que cada um dos poços está **completamente cheio** com tampão de lavagem até ao topo do poço em cada um dos ciclos de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo.
Deve ser adicionado desinfetante normal de laboratório ao reservatório efluente, e devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.
11. Bata nas placas, viradas para baixo sobre uma toalha absorvente e com poucos fiapos, para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100 µl de solução de substrato de enzimas e cubra placa com uma tampa e misture bem, utilizando um agitador de microplacas.
12. Cubra cada placa com uma tampa e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos.
Durante a incubação, as placas não devem estar expostas a luz solar directa.

- 13. Após os 30 minutos de incubação, adicione 50 µl de solução de paragem de enzimas a cada um dos poços e misture.**

A solução de paragem de enzimas deve ser adicionada aos poços na mesma ordem e, aproximadamente, à mesma velocidade que o substrato no passo 11.

- 14. Meça a absorvância (OD) de cada poço até no máximo 5 minutos após a paragem da reacção utilizando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e um filtro de referência de 620 a 650 nm. Os valores de OD são utilizados para calcular os resultados.**

Cálculos e interpretação de testes

O software de análise QFT-Plus pode ser utilizado para analisar dados não processados e para calcular resultados. Está disponível em www.QuantiFERON.com. Certifique-se de que é utilizada a versão mais recente do software de análise QFT-Plus.

O software executa uma avaliação de controlo de qualidade do ensaio, gera uma curva padrão, e fornece um resultado de teste para cada indivíduo, conforme detalhado na secção Interpretação de resultados.

Como alternativa à utilização do software de análise QFT-Plus, é possível determinar os resultados segundo o seguinte método.

Geração de curva padrão

(Se o software de análise QFT-Plus não for utilizado)

Determine os valores médios de OD das réplicas de padrão de kit de cada placa.

Construa uma curva padrão de $\log_{10}$ - $\log_{10}$ traçando o $\log_{10}$ da OD média (eixo Y) de encontro ao $\log_{10}$ da concentração de IFN- γ dos padrões em UI/ml (eixo X), omitindo destes cálculos o padrão zero. Calcule a linha de melhor adequação da curva padrão através de análise de regressão.

Utilize a curva padrão para determinar a concentração de IFN- γ (UI/ml) de cada uma das amostras de plasma do teste, utilizando o valor de OD de cada amostra.

Estes cálculos podem ser efectuados utilizando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas, e com software padrão de folha de cálculo ou estatístico (tal como o Microsoft® Excel®). Recomendamos que se utilize estes pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (%CV) dos padrões e o coeficiente de correlação (r) da curva padrão.

Controlo de qualidade do teste

A exactidão dos resultados de teste está dependente da geração de uma curva padrão precisa. Por conseguinte, os resultados derivados dos padrões têm de ser examinados antes que os resultados da amostra de teste possam ser interpretados.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de OD médio do Padrão 1 tem de ser $\geq 0,600$.
- A %CV dos valores de OD replicados do Padrão 1 e do Padrão 2 tem de ser $\leq 15\%$.
- Os valores de OD replicados do Padrão 3 e do Padrão 4 não podem variar mais do que 0,040 valores de absorvância desde a média.
- O coeficiente de correlação (r) calculado a partir dos valores médios de absorvância dos padrões tem de ser $\geq 0,98$.

O software de análise QFT-Plus calcula e relata estes parâmetros de controlo de qualidade.

Se os critérios acima não forem satisfeitos, a execução é inválida e tem de ser repetida.

O valor de OD médio do Padrão Zero (Diluyente Verde) deve ser $\leq 0,150$. Se o valor de OD médio for $> 0,150$, o procedimento de lavagem da placa deverá ser investigado.

Interpretação de resultados

Os resultados de QFT-Plus são interpretados utilizando os seguintes critérios:

Nota importante: diagnosticar ou excluir a tuberculose, e avaliar a probabilidade de LTBI, requer uma combinação de achados epidemiológicos, de historial clínico, médicos e de diagnóstico que devem ser tidos em conta ao interpretar os resultados de QFT-Plus (Tabela 2).

Tabela 2. Interpretação dos resultados do QFT-Plus

Nil (IU/ml)	TB1 menos Nil (UI/ml)	TB2 menos Nil (UI/ml)	Mitógeno menos Nil (UI/ml)	Resultado do QFT-Plus	Relatório/Interpretação
≤8.0	≥ 0,35 e ≥ 25% de Nil	Qualquer	Qualquer	Positivo†	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> provável
	Qualquer	≥ 0,35 e ≥ 25% de Nil			
	< 0,35 OU ≥ 0,35 e < 25% de Nil		≥ 0,5	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> IMPROVÁVEL
			< 0,5	Indeterminado‡	Não é possível determinar a probabilidade de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i>
>8.0§	Qualquer				

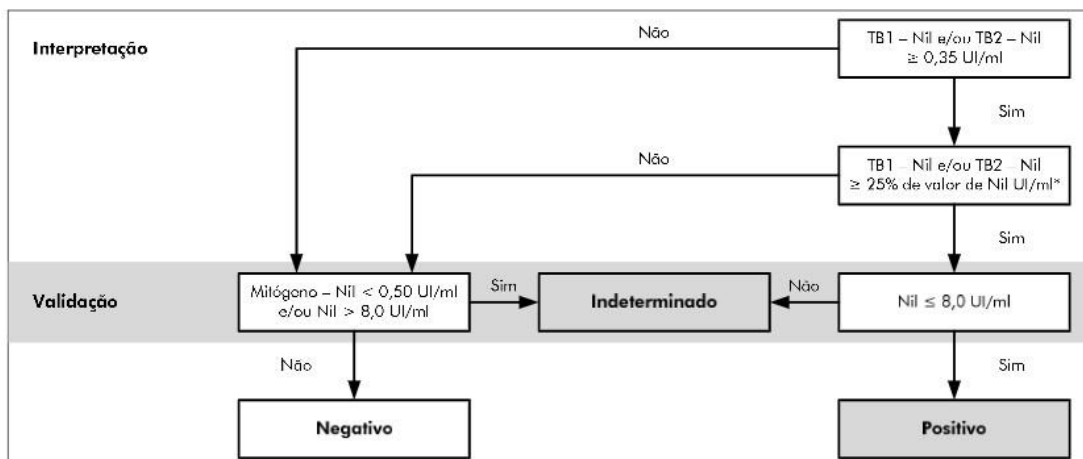
* As respostas ao controlo positivo de mitógeno (e, ocasionalmente, de antígeno de TB) podem ficar fora do alcance do leitor de microplacas. Isso não tem qualquer impacto nos resultados do teste.

† Quando não houver suspeitas de infecção por *M. tuberculosis*, é possível confirmar resultados inicialmente positivos voltando a testar as amostras originais de plasma em duplicado no QFT-Plus ELISA. Se o teste de repetição de um ou mais duplicados for positivo, o indivíduo deve ser considerado como tendo testado positivo.

‡ Consulte a secção "Resolução de problemas" para saber quais as possíveis causas.

§ Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos indivíduos possuíam níveis de IFN-γ > 8,0 UI/ml do valor de Nil.

A magnitude do nível medido de IFN-γ não pode ser correlacionada com o estágio ou grau de infecção, nível de capacidade de resposta imunitária ou com a probabilidade de progressão da doença activa. Uma resposta de TB positiva em indivíduos negativos ao mitógeno é rara, mas já se verificou em pacientes com tuberculose. Isso indica que a resposta do IFN-γ ao antígeno de TB é superior à resposta do mitógeno, o que é possível uma vez que o nível de mitógeno não estimula ao máximo a produção IFN-γ por linfócitos.



* Para que TB1 menos Nil ou TB2 menos Nil seja válido, a quantidade $\geq 5\%$ UI/ml de valor de Nil deve ser proveniente do mesmo tubo que o resultado $\geq 0,35$ UI/ml original.

Figura 3. Fluxograma interpretativo do QFT-Plus.

Limitações

Os resultados dos testes QFT-Plus têm de ser utilizados em conjunto com o historial epidemiológico, o estado clínico actual e outras avaliações de diagnóstico de cada um dos indivíduos.

Os indivíduos com valores de Nil superiores a 8,0 UI/ml são classificados como “indeterminados”, uma vez que uma resposta 25% mais elevada aos antígenos de TB pode ficar fora do intervalo de medição do ensaio.

Podem ocorrer resultados duvidosos ou indeterminados devido a:

- Desvios do procedimento descrito na presente bula
- Níveis excessivos de IFN- γ em circulação ou presença de anticorpos heterófilos
- Mais de 16 horas entre a colheita da amostra sanguínea e a incubação a 37 °C

Características de desempenho

Estudos clínicos

Uma vez que não existe um teste padrão definitivo de LTBI, não é possível avaliar, na prática, uma estimativa de sensibilidade e especificidade do QFT-Plus. A especificidade do QFT-Plus foi calculada de forma aproximada, avaliando as taxas de falsos positivos nas pessoas com baixo risco (sem factores de risco conhecidos) de infecção por tuberculose. A sensibilidade foi calculada de forma aproximada, avaliando os grupos de pacientes com tuberculose activa confirmada por cultura.

Especificidade

Foi conduzido um estudo avaliativo da especificação do QFT-Plus 409 indivíduos. As informações demográficas e os factores de risco de exposição a TB foram determinados utilizando um inquérito padronizado aquando do teste.

Num resumo dos resultados dos 2 grupos de pacientes com baixo risco (sem factores de risco conhecidos) de infecção com tuberculose, a especificidade geral do QFT-Plus foi de 97,6% (399/409) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Resultados do estudo de especificidade do QFT-Plus por local

Estudo	Positivo	Negativo	Indeterminado	Especificidade (IC de 95%)
Japão	4	203	0	98% (95–100)
Austrália	6	196	0	97% (94–99)

Tabela 4. Resultados do estudo de especificidade do QFT-Plus por tubo de antígeno de TB

	TB1	TB2	QFT-Plus
Positivo	5	10	10
Negativo	404	399	399
Indeterminado	0	0	0
Especificidade (IC de 95%)	98,8% (97,2–99,6)	97,6% (95,6–98,8)	97,6% (95,6–98,8)

Sensibilidade de TB activa

Embora não exista um teste padrão definitivo para LTBI, uma substituto adequado é a cultura microbiológica de *M. tuberculosis*, uma vez que os pacientes com a doença estão, por definição, infectados. Os suspeitos de tuberculose de quatro locais de estudo na Austrália e Japão, que mais tarde se confirmou por cultura estarem infectados com *M. tuberculosis*, foram testados para avaliar a sensibilidade do QFT-Plus (Tabelas 5 e 6). Os pacientes haviam recebido menos de 14 dias de tratamento antes da colheita sanguínea para o teste QFT-Plus.

Num resumo dos resultados do 4 grupos de pacientes com cultura positiva de *M. tuberculosis*, a sensibilidade geral do QFT-Plus relativamente à tuberculose foi de 95,3% (164/172). Nos 4 grupos, 159 pacientes revelaram-se positivos nos tubos TB1 e TB2, 1 paciente revelou-se positivo apenas no tubo TB1 e 4 apenas no tubo TB2. Um total de 1,1% (2/174) dos resultados foi inconclusivo. O resultado de TB2 identificou correctamente 1 paciente confirmado por cultura que teria tido resultado negativo (mitógeno baixo) se apenas testado com TB1 (consulte as Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Resultados do estudo de sensibilidade do QFT-Plus por local

Locais de estudo	Positivo	Negativo	Indeterminado	Sensibilidade de QFT-Plus (IC de 95%)
Local 1 do Japão	36	7	0	84% (69-93)
Local 2 do Japão	53	1	2	98% (90-100)
Local 3 do Japão	54	0	0	100% (93-100)
Local da Austrália	21	0	0	100% (84-100)

* A sensibilidade baseia-se no número total de testes válidos, excluindo os resultados inconclusivos.

Tabela 6. Resultados do estudo de sensibilidade do QFT-Plus por tubo de antígeno de TB

	TB1	TB2	QFT-Plus
Positivo	160	163	164
Negativo	11	9	8
Indeterminado	3	2	2
Sensibilidade [†] (IC de 95%)	93,6% (88,8-96,7)	94,8% (90,3-97,6)	95,3% (90,9-97,9)

[†] A sensibilidade baseia-se no número total de testes válidos, excluindo os resultados inconclusivos.

Distribuições de respostas observadas – estratificadas por risco

Observou-se uma gama de respostas de IFN- γ aos tubos TB1, TB2 e de controlo em ensaios clínicos, sendo as mesmas estratificadas por risco de infecção com *M. tuberculosis* (Figuras 4–7). O grupo de risco misto consiste de indivíduos representativos de uma população de teste geral, incluindo indivíduos com e sem factores de risco de exposição a TB, em que presença de tuberculose activa é improvável (ou seja, LTBI).

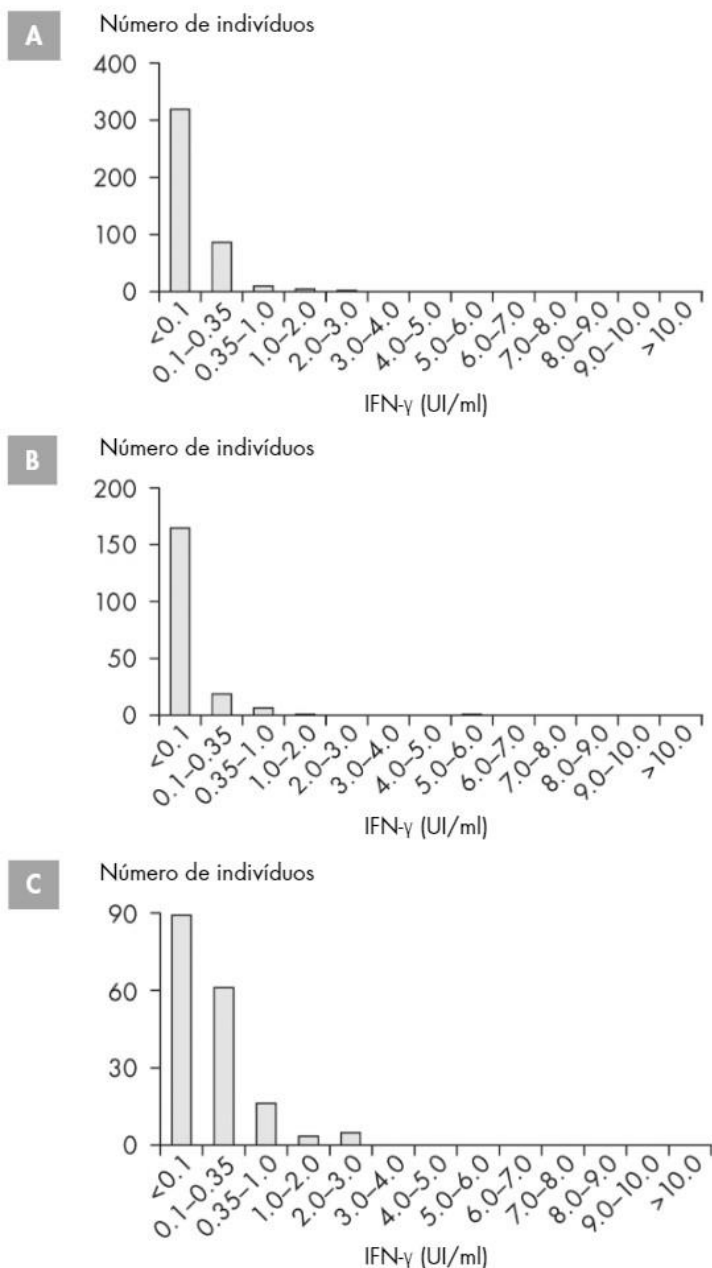


Figura 4. Distribuição de Nil. **A.** Distribuição de valores de Nil em população de baixo risco (n = 409). **B.** Distribuição de valores de Nil em população de risco misto (n = 194). **C.** Distribuição de valores de Nil em infecção com *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n = 174).

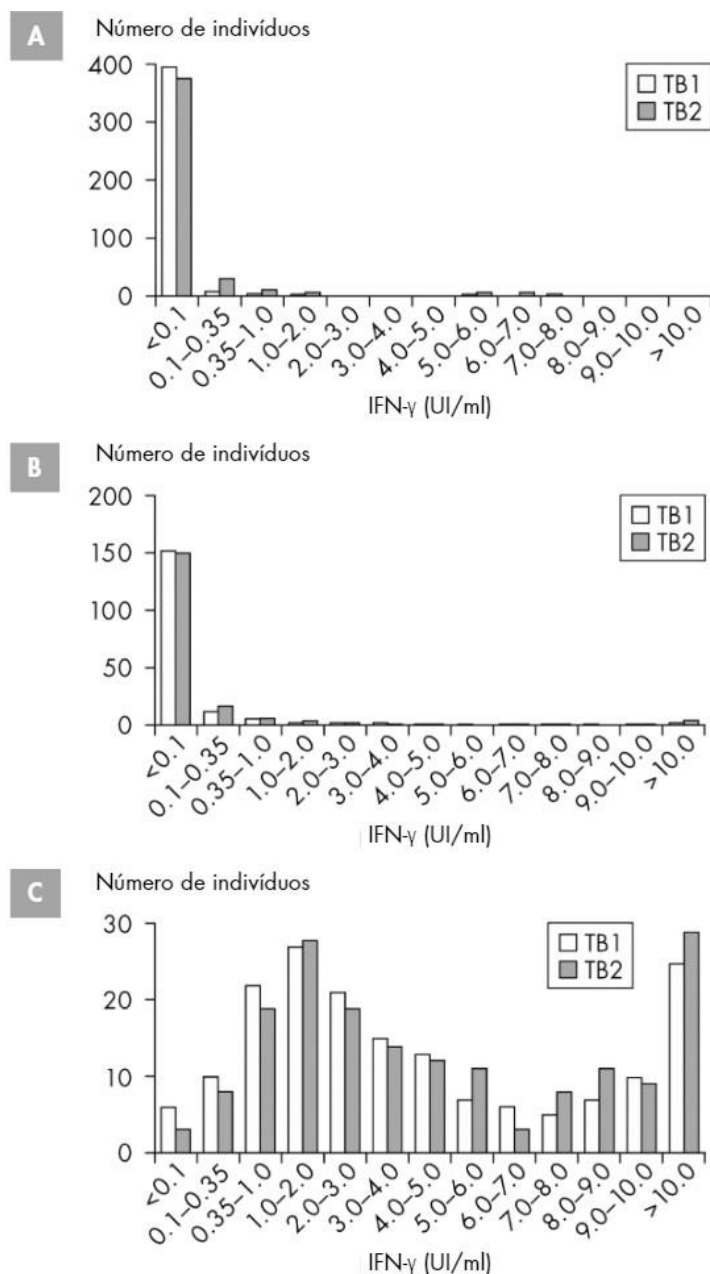


Figura 5. Distribuição de TB1 e TB2 (Nil subtraído). **A.** Distribuição de valores de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em população de baixo risco (n = 409). **B.** Distribuição de valores de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em população de risco misto (n = 194). **C.** Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em infecção com *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n = 174).

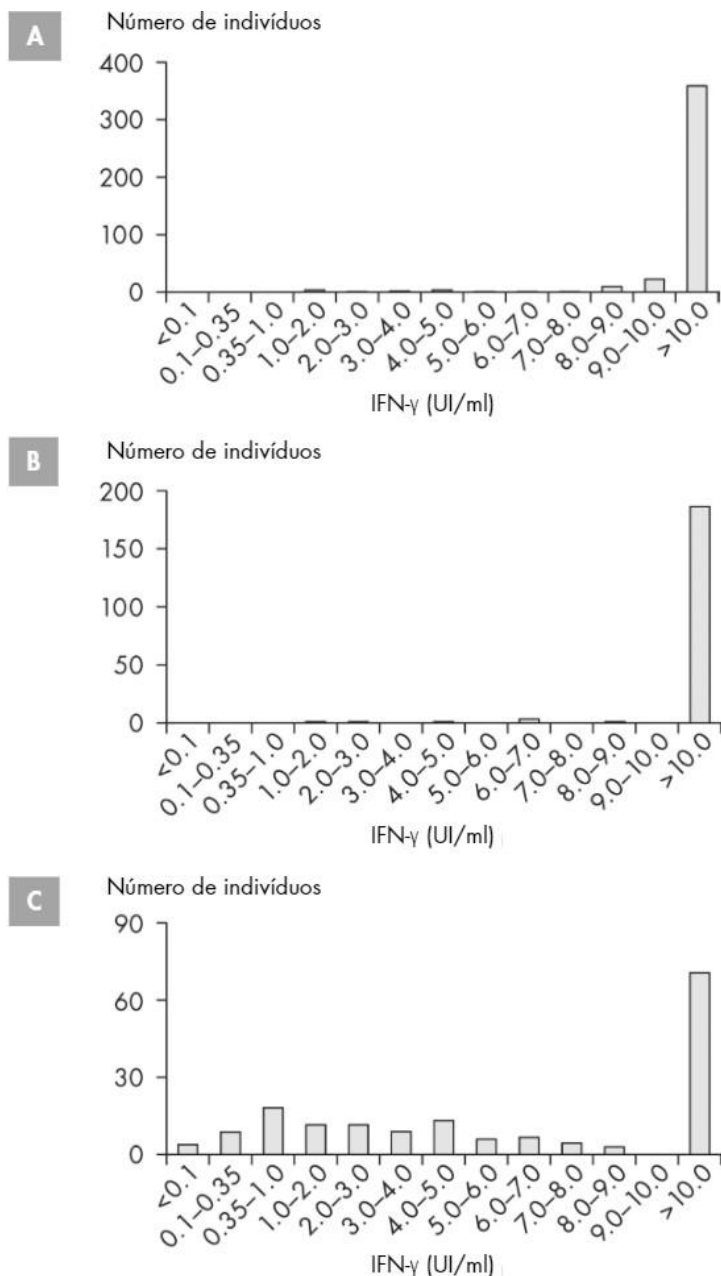


Figura 6. Distribuição de mitógeno (Nil subtraído). **A.** Distribuição de valores de valores de mitógeno (Nil subtraído) em população de baixo risco (n = 409). **B.** Distribuição de valores de valores de mitógeno (Nil subtraído) em população de risco misto (n = 194). **C.** Distribuição de valores de valores de mitógeno (Nil subtraído) em infecção com *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n = 169).

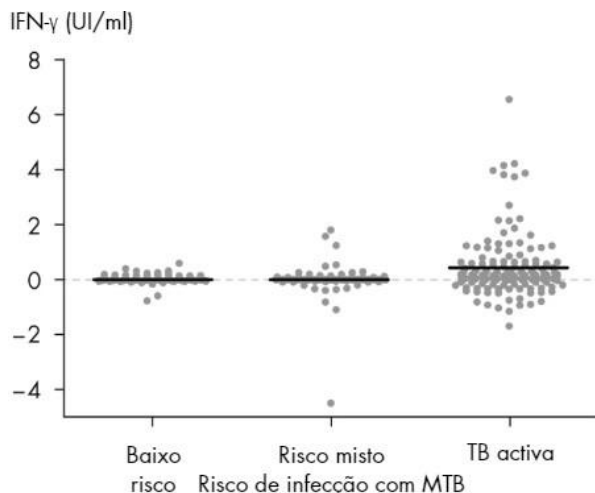


Figura 7. Diferença observada entre valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído), estratificados por risco. População de baixo risco ($n = 409$), população de risco misto ($n = 189$) e população com infecção com *M. tuberculosis* confirmada por cultura ($n = 141$). Os valores de TB1 foram subtraídos aos valores de TB2. Os indivíduos com valores de TB1 ou TB2 de $> 10,0$ UI/ml foram excluídos por estarem fora do intervalo linear do ensaio.

Características de desempenho dos ensaios

Demonstrou-se que o ELISA QFT-Plus ELISA é linear colocando aleatoriamente 5 réplicas de 11 pools de plasma de concentrações conhecidas de IFN- γ placa do ELISA. A linha regressão linear possui uma inclinação de $1,002 \pm 0,011$ e um coeficiente de correlação de 0,99 (Figura 8).

O limite de detecção do ELISA QFT-Plus ELISA é de $= 0,05$ IU/ml, não existindo evidências de um efeito de prozona com concentrações de IFN- γ até 10 000 UI/ml.

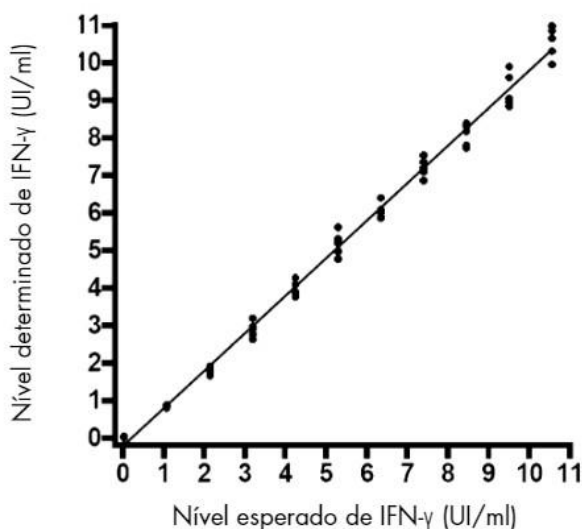


Figura 8. Perfil de linearidade do ELISA QFT-Plus.

A imprecisão intra e interensaio (% CV) do ELISA QFT-Plus ELISA foi estimada testando 20 amostras de plasma com concentrações variáveis de IFN- γ em réplicas de 3, em 3 laboratórios diferentes, em 3 dias não consecutivos e realizados por 3 operadores diferentes. Deste modo, cada amostra foi testada 27 vezes em 9 execuções de ensaio independentes. Uma amostra era um controlo Nil e tinha uma concentração calculada de IFN- γ de 0,08 UI/ml (CI de 95%: 0,07–0,09). Das 19 amostras de plasma restante, as concentrações eram de 0,33 (IC de 95%: 0,31–0,34) to 7,7 UI/ml (IC de 95%: 7,48–7,92).

A imprecisão dentro da execução ou intraensaio foi estimada calculando a média de %CV para cada teste de plasma contendo IFN- γ de cada execução da placa ($n = 9$), estando a imprecisão entre 4,1 e 9,1% CV. A co-variância média dentro da corrida ($\pm$ IC de 95%) foi de 6,6% $\pm$ 0,6%. A média do plasma com zero IFN- γ foi de 14,1% CV.

A imprecisão total ou interensaio foi determinada através da comparação de 27 concentrações calculadas de IFN- γ por cada plasma para teste. A imprecisão interensaio estava entre 6,6 e 12,3% CV. A %CV média geral ($\pm$ IC de 95%) foi de 8,7% $\pm$ 0,7%. O plasma com zero IFN- γ apresentou 26,1% CV. Este nível de variação é expectável uma vez que a concentração calculada de IFN- γ é baixa e a variação em torno de uma estimativa baixa de concentração será maior de que para concentrações mais altas.

A reprodutibilidade do teste QFT-Plus foi determinada utilizando amostras sanguíneas de 102 indivíduos com factores de risco misto relativamente a infecção com *M. tuberculosis*. Foram avaliados três diferentes operadores e condições laboratoriais.

Foram efectuadas 3 determinações de diagnóstico para cada indivíduo e 306 no total para todos os indivíduos. Reprodutibilidade geral do diagnóstico foi de 99% (IC de 95%: 97,2–99,7), em que o resultado de diagnóstico foi concordante em 303 de 306 determinações. Os resultados de 3 indivíduos que estavam próximos do cut-off totalizaram toda a variação.

Diagnóstico de LTBI

Foi publicado um número de estudos que demonstram o desempenho do QFT, o precursor do QFT-Plus, em várias populações em risco de MTB. Os principais achados de alguns dos estudos seleccionados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Estudos publicados seleccionados sobre QFT

População/estado	Resultados e achados	Número total de estudos publicados
Pediatria	Desempenho comprovado em crianças, incluindo crianças com menos de 5 anos de idade (45–46) com precisão superior ao IGRA baseado em ELISpot (8). O maior estudo até à data comparando QFT com TST em crianças do Vietname, Filipinas e México sustenta o uso de QFT em detrimento de TST no teste de crianças estrangeiras relativamente a LTBI (46). Um estudo de contacto limitado demonstra um melhor valor preditivo que o TST em crianças (47) e um risco de progressão da TB 8 vezes superior no prazo de dois anos em conversores QFT em comparação com não conversores (48). A discordância QFT negativo/TST positivo é alta em crianças vacinadas contra a tuberculose (46, 49), mas não existe impacto na resposta ao mitógeno em crianças com menos de 5 anos de idade (49) e nas taxas reduzidas de “inconclusivo” no rastreio de rotina de crianças imigrantes (46).	152
Gravidez	Num cenário de carga reduzida, o QFT é executado com igual eficácia em cada trimestre da gravidez com resultados comparáveis a mulheres não grávidas, é muito mais específico, pelo menos tão sensível, e pode ser um melhor indicador de progressão da doença do que o TST (50). Num cenário de carga elevada, o QFT foi mais estável ao longo da gravidez e aproximou mais a prevalência de fundo de LTBI em comparação com o TST, embora os autores tenham concluído que a gravidez afecta o QFT e o TST (51).	6
HIV/SIDA	Tanto os IGRA como o TST são afectados pela infecção com HIV, e o conjunto de evidências sugere que devem ser tomados cuidados ao interpretar resultados com contagens de CD4 ⁺ < 200 (52). Foi demonstrado que o QFT é menos afectado que o IGRA e TST baseados em ELISpot (53–55). Uma única consulta de IGRA supera a questão de taxas de retorno baixas nesta população (53).	101

População/estado	Resultados e achados	Número total de estudos publicados
Terapêuticas imunossupressoras	O QFT é menos afectado por terapêuticas imunossupressoras do que o TST e correlaciona-se melhor com os factores de risco de TB (23, 27). QFT tem sensibilidade elevada em pacientes com reumatismo (23, 56, 57) e especificidade superior ao TST, minimizando os falsos positivos e reduzindo o tratamento desnecessário que ocorria com o TST (23, 57, 58).	112
Profissionais de saúde	Foi demonstrado como sendo mais específico e como tendo menos falsos positivos do que o TST, e mais rentável do que o TST (59–62). A variabilidade em redor do limiar foi um resultado esperado nos testes em série, devido ao ponto de corte dicotómico e à variabilidade inerente de um teste biológico (63). Os estudos demonstraram taxas de conversão/reversão superiores do que no TST em testes em série de profissionais de saúde de baixo risco (64, 65). Os CDC (Centers for Disease Control and Prevention) dos EUA reconhecem que os critérios tolerantes que definem a conversão de GRA podem produzir mais conversão do que a observada com os critérios quantitativos mais rigorosos do TST, e foi demonstrado que as estratégias de repetição de testes são eficazes na gestão do fenómeno conversão/reversão (65–68).	111
Contactos com TB	PPV e NPV mais elevados do que no TST (47); conveniência de consulta única para aqueles cujo regresso é improvável (63), melhor correlação à exposição (69), o que é especialmente notório em pessoas vacinadas contra a tuberculose e em populações de países onde é administrada a vacina (70, 71).	89
Transplantação	Demonstrado como sendo pelo menos tão eficaz como o TST, mas menos afectado por doença terminal dos órgãos (22).	23

População/estado	Resultados e achados	Número total de estudos publicados
Diabetes	Resultados contraditórios de um número reduzido de publicações com número limitado de indivíduos. Um estudo de uma área de carga reduzida concluiu que a sensibilidade do QFT não é comprometida pela diabetes em pacientes com TB (72). Um estudo da Tanzânia, um cenário de carga elevada, sugerindo um impacto negativo da diabetes na produção de IFN- γ , não tomou em consideração factores de confusão como as infecções com HIV ou verminoses (73). Em estudos vietnamitas, em 838 diabéticos auto-relatados com suspeitas de TB devido a radiografia de tórax anormais ou confirmados por cultura como tendo tuberculose activa (n = 128), a positividade do QFT foi igual ou superior aos ponto de corte de TST de 10 e 15 mm (74).	9
Doença renal terminal	Os resultados positivos do QFT correlacionam-se com os factores de risco de TB melhor do os do TST e são menos associados à BCG (75).	45
Imigrantes	Os estudos demonstram que o QFT não afectado pela BCG e pela idade, ao contrário do TST (74). O QFT foi demonstrado como sendo o método mais rentável (76). Em cenários de carga reduzida, a maioria da TB é proveniente de estrangeiros e da reactivação de TB latente após a chegada (77). O maior estudo até à data comparando QFT com TST em crianças imigrantes sustenta o uso de QFT em detrimento de TST no teste de crianças estrangeiras relativamente tuberculose latente (46).	29

Informações técnicas

Resultados indeterminados

Os resultados indeterminados são pouco comuns e podem estar relacionados com o estado imunitário do indivíduo testado, mas também com um número de factores técnicos, caso as instruções de utilização anteriormente descritas não sejam seguidas.

Se suspeitar de problemas técnicos no armazenamento de reagente, na colheita sanguínea ou no manuseamento das amostras sanguíneas, repita todo o teste QFT-Plus com uma nova amostra sanguínea. É possível repetir o teste ELISA de plasmas estimulados caso suspeitar de lavagem inadequada ou de qualquer outro desvio processual ao teste ELISA. Não se espera que os testes indeterminados que resultam de valores baixos de mitógeno ou de valores elevados de Nil se alterem com a repetição, a menos que tenha ocorrido algum erro no teste ELISA. Os resultados indeterminados devem ser reportados como tal. Os médicos podem optar por colher uma nova amostra ou efectuar outros procedimentos conforme acharem adequado.

Amostras de plasma coaguladas

Se ocorrerem coágulos de fibrina nas amostras de plasma de armazenamento de longo-prazo, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para mais informações, consulte também as informações técnicas disponibilizadas em: www.QuantiFERON.com. Para informações de contacto, consulte a contracapa.

Resolução de problemas ELISA

Desenvolvimento cromático não específico

Causa possível	Solução
a) Lavagem incompleta da placa	Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, em função da lavadora utilizada. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo.
b) Contaminação cruzada dos poços ELISA	Tome cuidado ao pipetar e a misturar as amostras para minimizar os riscos.
c) O prazo de validade do kit/ componentes expirou	Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Concentrado 100x de Conjugado são utilizados antes de três meses após a data de reconstituição.
d) A solução de substrato de enzimas está contaminada	Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos.
e) Mistura do plasma nos tubos QFT-Plus antes da colheita	após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.

Leituras baixas da absorvância dos padrões

Causa possível	Solução
a) Erro de diluição do padrão	Certifique-se de que as diluições do padrão do kit são preparadas correctamente conforme a presente bula.
b) Erro de pipetagem	Certifique-se de que as pipetas estão calibradas e de que são utilizadas de acordo com as instruções do fabricante.
c) Temperatura de incubação demasiado baixa	A incubação do ELISA deve ser efectuada a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).
d) Tempo de incubação demasiado curto	A incubação da placa com o conjugado, com os padrões e com as amostras deve durar 120 ± 5 minutos. A solução de substrato de enzimas é incubada na placa durante 30 minutos.
e) Utilizado um filtro de leitor de placas incorrecto	A placa deve ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm.

Resolução de problemas ELISA

- | | |
|--|--|
| f) Os reagentes estão demasiados frios | Todos os reagentes, exceptuando o Concentrado 100x de Conjugado, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isso leva, aproximadamente, uma hora. |
| g) O prazo de validade do kit/ componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Concentrado 100x de Conjugado são utilizados antes de 3 meses após a data de reconstituição. |

Plano de fundo alto

- | Causa possível | Solução |
|---|---|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, em função da lavadora utilizada. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Temperatura de incubação demasiado elevada | A incubação do ELISA deve ser efectuada a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). |
| c) O prazo de validade do kit/ componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Concentrado 100x de Conjugado são utilizados antes de 3 meses após a data de reconstituição. |
| d) A solução de substrato de enzimas está contaminada | Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos. |

Curva padrão não linear e variabilidade de duplicados

- | Causa possível | Solução |
|---|---|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, em função da lavadora utilizada. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Erro de diluição do padrão | Certifique-se de que as diluições do padrão são preparadas correctamente conforme a presente bula. |
| c) Mistura mal efectuada | Misture bem os reagentes, invertendo ou misturando suavemente em vórtex, antes de os adicionar à placa. |
| d) Técnica inconsistente ou interrupção da pipetagem durante a preparação do ensaio | A adição de amostras e de padrões deve ser efectuada de um modo contínuo. Todos os reagentes devem ser preparados antes de iniciar o ensaio. |

As informações dos produtos e os guias técnicos são disponibilizados gratuitamente pela QIAGEN, através do seu fornecedor, ou visitando www.QuantiFERON.com.

Bibliografia

Encontra uma lista exhaustiva de referências de QFT-Plus e de QFT na Gnowee — a biblioteca de referências QuantiFERON, disponível em www.gnowee.net.

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* **356**, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* **12**, 645.
3. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur. Respir. J.* **33**, 586.
4. Bocchino, M. et al. (2008) Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 907.
5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir. Res.* **7**, 56.
6. Chun, J.K. et al. (2008) The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**, 389.
7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* **3**, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.
8. Detjen, A.K. et al. (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 322.
9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* **135**, 1010.
10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN-γ assay for the development of active TB disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 1164.
11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir. Res.* **7**, 77.
12. Dogra, S. et al. (2007) 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.* **54**, 267.
13. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* **4**, e55.
14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology* **13**, 270.
15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J. Infect.* **56**, 348.
16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 33.

17. Kang, Y.A. et al. (2005) Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* **293**, 2756.
18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 1146.
19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss. Med. Wkly.* **138**, 267.
20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 737.
21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* **146**, 761.
22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am. J. Transplant.* **7**, 2797.
23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 84.
24. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 513.
25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. *Emerging Infect. Dis.* **12**, 1383.
26. Pai, M. et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA* **293**, 2746.
27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) 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.* **35**, 776.
28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur. Respir. J.* **32**, 524.
29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **3**, 981.
30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2799.
31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin. Biochem.* **40**, 913.
32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 681.
33. Turner, J. et al. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. *Immunology* **87**, 339.
34. Brookes, R.H. et al. (2003) CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. *Eur. J. Immunol.* **33**, 3293.
35. Stenger, S. et al. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**, 121.

36. Lalvani, A. et al. (1998) Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**, 270.
37. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. J. Immunol. **166**, 439.
38. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. PLoS Pathol. **3**, 1240.
39. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. J. Immunol. **187**, 2222.
40. Rozot, V. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur. J. Immunol. **43**, 1568.
41. Nikolova, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **75**, 277.
42. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.009. Epub.
43. Ongaya, A. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis **93**, S60.
44. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **185**, 206.
45. Long, G., Ji-Chun, M., Min, Jin-Long, L., Jin-Hui, T. (2014) Interferon- γ release assay for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis. Clin. Pediatr.
46. Howley, M.M. et al. (2014) Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and tuberculin skin tests among immigrant children being screened for latent tuberculosis infection. Ped. Infect. Dis.
47. Diel, R., Loddenkemper, R., Niemann, S., Meywald-Walter, K., and Nienhaus, A. (2011) Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon- γ release assay for developing active tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **183**, 88.
48. Machingadaize, S. et al. (2012) Predictive value of recent QuantiFERON conversion for tuberculosis disease in adolescents. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **186**, 1051.
49. Riazi, S. et al. (2012) Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children using interferon-gamma release assays (IGRAs). Allergy Asthma Proc. **33**, 217.
50. Lighter-Fisher, J. and Surette, A-M. (2012) Performance of an interferon-gamma release assay to diagnose latent tuberculosis infection during pregnancy. Obstet. Gynecol. **119**, 1088.
51. Mathud, J.S. et al. (2014) Pregnancy differentially impacts performance of latent tuberculosis diagnostics in a high-burden setting. PLoS ONE **9**, e92308.
52. Hoffman, M. and Ravn, P. (2010) The use of interferon-gamma release assays in HIV-positive individuals. Eur. Infect. Dis. **4**, 23.
53. Cheallaigh, C.N. et al. (2013) Interferon gamma release assays for the diagnosis of latent TB infection in HIV-infected individuals in a low TB burden country. PLoS ONE **8**, e53330.
54. Ramos, J. M. et al. (2012) Contribution of interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: A comparison of QuantiFERON-TB gold in tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test. BMC Infect. Dis. **12**, 169.

55. Wolf, T. et al. (2013) Tuberculosis skin test, but not interferon- γ releasing assays is affected by BCG vaccination in HIV patients. *J. Infect.* **66**, 376.
56. Hsia, E.C. et al. (2012) Interferon- γ release assay versus tuberculin skin test prior to treatment with golimumab, a human anti-tumor necrosis factor antibody, in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, or ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **64**, 2068.
57. Garcovich, S. et al. (2011) Clinical applicability of QuantiFERON-TB-Gold testing in psoriasis patients during long-term anti-TNF-alpha treatment: a prospective, observational study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Ven.*
58. Kwakernaak, A.J. et al. (2011) A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor α inhibitor. *Clin. Rheumatol.* **30**, 505.
59. Vinton, P. et al. (2009) Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and tuberculin skin test for identification of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthcare staff and association between positive test results and known risk factors for infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **30**, 215.
60. de Perio, M.A., Tsevat, J., Roselle, G.A., Kralovic, S.M., and Eckman, M.H. (2009) Cost-effectiveness of interferon gamma release assays vs tuberculin skin tests in health care workers. *Arch. Intern. Med.* **169**, 179.
61. Nienhaus, A. et al. (2008) Evaluation of the interferon- γ release assay in healthcare workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **81**, 295.
62. Nienhaus, A. et al. (2011) Systematic review of cost and cost-effectiveness of different TB-screening strategies. *BMC Health Serv. Res.* **11**, 247.
63. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Updated guidelines for using interferon-gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection — United States, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* **59 (RR-5)**, 1.
64. Dorman, S.E. et al. (2014) Interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 77.
65. Fong, K.S. et al. (2012) Challenges of interferon-gamma release assay conversions in serial testing of health care workers in a tuberculosis control program. *Chest* **142**, 55.
66. Thanassi, W., Noda, A., Hernandez, B., Newell, J., Terpeluk, P., Marder, D. and Yesavage, J.A. (2012) Delineating a retesting zone using receiver operating characteristic analysis on serial QuantiFERON tuberculosis test results in US healthcare workers. *Pulm. Med.* doi: 10.1155/2012/291294. Epub.
67. Behrman, A. et al. (2013) Protecting Health Care Workers from Tuberculosis, 2013: ACOEM Medical Center Occupational Health Section Task Force on Tuberculosis and Health Care Workers. *J. Occup. Environ. Med.* **55**, 985.
68. Nienhaus, A., Ringshausen, F.C., Costa, J.T., Schablon, A., and Tripodi, D. (2013) IFN- γ release assay versus tuberculin skin test for monitoring TB infection in healthcare workers. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **11**, 37.
69. Arend S.M. et al. (2007) Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing TB contact. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 618.

70. Mandalakas, A.M., Detjen, A.K., Hesselning, A.C., Benedetti, A., and Menzies, D. (2011) Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **15**, 1018.
71. Grinsdale, J.A., Ho, C.S., Banouvong, H., Kwamura, L.M. (2011) Programmatic impact of using QuantiFERON-TB Gold in routine contact investigation activities. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **15**, 1614.
72. Walsh, M.C. et al. (2011) Sensitivity of interferon- γ release assays is not compromised in tuberculosis patients with diabetes. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **15**, 179.
73. Faurholt-Jespén, D. et al. (2014) Diabetes is associated with lower tuberculosis antigen-specific interferon gamma release in Tanzanian tuberculosis patients and non-tuberculosis controls. *Scand. J. Infect. Dis.* **46**, 384.
74. Painter, J.A. et al. (2013) Tuberculosis screening by tuberculosis skin test or QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay among an immigrant population with a high prevalence of tuberculosis and BCG vaccination. *PLoS ONE* **8**, e82727.
75. Rogerson, T.E. et al. (2012) Tests for latent tuberculosis in people with ESRD: a systematic review. *Amer. J. Kidney Dis.* **61**, 33.
76. Pareek, M. et al. (2013) Community-based evaluation of immigrant tuberculosis screening using interferon γ release assays and tuberculin skin testing: observational study and economic analysis. *Thorax*. **68**, 230.
77. WHO Global Tuberculosis Report, 2013. <http://www/who.int/iris/handle/10665/91355>
Acedido em 14 de Julho de 2013.

Símbolos

 2 x 96	Suficiente para 2 x 96 preparações de amostra
	Fabricante legal
	Assinalado com o símbolo CE-IVD
	Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código do lote
	Ref. ^a
	Global Trade Item Number
	Prazo de validade
	Limites de temperatura
	Consultar instruções de utilização
	Não reutilizar
	Manter afastado da luz solar

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, contacte-nos gratuitamente através do número 00800-22-44-6000, consulte o nosso Centro de Assistência Técnica em www.qiagen.com/contact ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica (consulte a contracapa ou visite www.qiagen.com).

Procedimento abreviado do teste

Etapa 1 – incubação do sangue

1. Colha o sangue do paciente para dentro de tubos de colheita sanguínea e misture, agitando os tubos dez (10) vezes após os encher de forma a garantir que toda a superfície interna do tubo fica revestida de sangue. Este procedimento dissolverá os antígenos da parede do tubo.
2. Incubar os tubos na vertical a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 16 a 24 horas.
3. Após a incubação, centrifugue os tubos durante 15 minutos a 2000 a 3000 x g RCF (g) para separar o plasma e os glóbulos vermelhos.
4. Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.

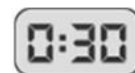
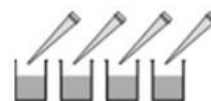


Etapa 2 – ELISA IFN- γ

1. Coloque os componentes do ELISA, à exceção d Concentrado 100x de Conjugado, à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante, no mínimo, 60 minutos.
2. Reconstitua o padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou desionizada. Prepare quatro (4) diluições padrão.
3. Reconstitua o Concentrado 100x de Conjugado liofilizado com água destilada ou desionizada.
4. Prepare conjugado funcional em Diluente Verde e adicione 50 μl a todos os poços.
5. Adicione 50 μl de amostras de plasma de teste e 50 μl de padrão aos poços adequados. Misture utilizando um agitador.
6. Incube durante 120 ± 5 minutos a temperatura ambiente.



7. Lave os poços, no mínimo, 6 vezes com 400 μ l/poço de tampão de lavagem.
8. Adicione 100 μ l de solução de substrato de enzimas aos poços. Misture utilizando um agitador.
9. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.
10. Adicione 50 μ l de solução de paragem de enzimas a todos os poços. Misture utilizando um agitador.
11. Leia os resultados a 450 nm com um filtro de referência de 620 a 650 nm.
12. Analise os resultados.



Esta página foi deixada intencionalmente em branco.

Marcas registadas: QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (Grupo QIAGEN); Microsoft®, Excel® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Acordo de licença limitada para o ELISA QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e na presente bula e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo descrito nos protocolos fornecidos com o produto e na presente bula.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados ou ser objecto de revenda, salvo indicação contrária por parte da QIAGEN.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou facilitar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.

© 2014–2015, QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific | techservice-ap@qiagen.com

Europe | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Middle East/Africa | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Latin America (not including Brazil or Mexico) | techservice-latam@qiagen.com



Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_2203092.pdf	15/11/2023 17:11:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_IGRA_v2.pdf	15/11/2023 17:10:55	Sigrid De Sousa dos Santos	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	Carta_Resposta_versao1.pdf	15/11/2023 17:10:32	Sigrid De Sousa dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_v2.pdf	15/11/2023 17:09:52	Sigrid De Sousa dos Santos	Aceito
Outros	Coparticipante.pdf	12/11/2023 16:37:59	Sigrid De Sousa dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_assinado_assinado.pdf	04/09/2023 23:19:59	Sigrid De Sousa dos Santos	Aceito
Outros	Questionario.pdf	31/08/2023 22:25:39	Sigrid De Sousa dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO CARLOS, 06 de Dezembro de 2023

11) ANEXO

Relação entre faixa etária, município solicitante e resultado para investigação de ILTB

