



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**ACURÁCIA E VALOR PREDITIVO DO QUANTIFERON-
TB GOLD-PLUS NA TUBERCULOSE ATIVA
CONFIRMADA**

**MARIA CECÍLIA BORGES
ANDRADE CABRAL**

MANAUS

2019

**MARIA CECÍLIA BORGES
ANDRADE CABRAL**

**ACURÁCIA E VALOR PREDITIVO DO
QUANTIFERON-TB GOLD-PLUS NA
TUBERCULOSE ATIVA CONFIRMADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, como requisito parcial para obtenção grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos**

Co-orientadores: **Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa e Dra. Anete Trajman**

MANAUS

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e saúde nesta caminhada e pela oportunidade de aprender e crescer tanto profissionalmente e como pessoa.

A toda minha família, que se faz sempre presente em todos os momentos da minha vida, com tanto amor, força e compreensão. Especialmente minha mãe, Juliana, meu porto seguro e exemplo maior.

Aos meus amigos, vocês são a minha segunda família que construí em Manaus. Obrigada por tanto!

Aos meus colegas e amigos de trabalho, obrigada pela compreensão, amizade e parceria durante todo este desafio, que foi o mestrado. Quando se trabalha em equipe, com responsabilidade, empatia e honestidade, tudo é mais leve e melhor.

A minha turma de mestrado! Foi bem mais divertido compartilhar todas as etapas da pós graduação e os desafios deste período com todos vocês. Especialmente Najibe e Lívia, pela cumplicidade, apoio, carinho e amizade.

A todos os professores do PPGMT por todos os ensinamentos. A Dona Conceição e Iza, por toda paciência, acolhimento, ajuda e carinho desde sempre, desde o primeiro dia. Muito obrigada.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Cordeiro, com quem eu pude contar em todos os momentos. E a todo meu grupo de pesquisa, dos laboratórios à equipe clínica, envolvidas neste trabalho. Obrigada por toda parceria e dedicação.

Sem vocês nada disso seria possível.

DECLARAÇÃO DE AGENCIAS FINANCIADORAS

O projeto foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio de bolsa de estudo, durante os 24 meses de execução do projeto e a empresa Protein Logics Ltda no auxílio financeiro dos insumos utilizados.

RESUMO

O tratamento empírico desnecessário para tuberculose (TB) é frequentemente iniciado em pessoas vivendo com HIV (PVHIV) ou com doença extrapulmonar porque a confirmação bacteriológica da doença é difícil e os resultados são frequentemente adversos nessa população. O objetivo deste estudo foi avaliar acurácia e valor preditivo do QuantiFERON® TB-Gold-Plus (QFT-Plus) para TB. Métodos: Pacientes com suspeita de TB foram submetidos prospectivamente a testes de diagnóstico (cultura para *M. tuberculosis*, exame histopatológico de Xpert®MTB / Rifor de amostras apropriadas) conforme rotina e o sangue foi retirado para QFT-Plus. Os resultados do QFT-Plus foram analisados de acordo com as características demográficas e clínicas. Resultados: Dos 408 participantes elegíveis, 23 eram indeterminados e foram excluídos das análises. 385 haviam determinado os resultados do QFT-Plus e foram incluídos. Desses, 88 tinham TB pulmonar e nove tinham TB extrapulmonar. Entre os 288 pacientes nos quais a TB foi descartada, o QFT-Plus foi negativo em 203 (70,5%). O teste então mostrou em pacientes com TB confirmada para VPN de 87,1% (IC 95%: 83,8-90,5), PVH 99,5% (IC 95%: 98,7-100), ETB 96,6 (IC 95%: 93,3-99,8). Perda de peso (OR: 2,70 [IC: 1,39-5,23], P = 0,03), PLWH (OR: 1,84 [IC: 0,99-3,41] P = 0,052), Não ETB (OR: 30,87 [IC: 3,57-266,51] P = 0,002) foram características associadas ao teste negativo. A avaliação quantitativa do teste mostrou diferença significativa na TB1 entre os grupos PTB e ETB (p = 0,0496), TB2 também com diferença significativa (p = 0,0397). O QFT-Plus possui um alto valor preditivo negativo, especialmente em PVHS e nos casos de tuberculose extrapulmonar, podendo ser útil para evitar tratamento empírico desnecessário.

Palavras-chave: tuberculose ativa, triagem, ensaios de liberação de interferon-gama, valor preditivo negativo.

ABSTRAC

Unnecessary empirical treatment for tuberculosis (TB) is often initiated in people living with HIV (PLHIV) or extrapulmonary disease because a bacteriological reaction of the disease is difficult and results are often adverse in this population. The aim of this study was to evaluate the accuracy and predictive value of QuantiFERON® TB-Gold-Plus (QFT-Plus) for TB. Methods: Patients with suspected TB were prospectively submitted to diagnostic tests (culture for *M. tuberculosis*, Xpert®MTB/Rif or histopathological examination of appropriate samples) as per routine and blood was withdrawn for QFT-Plus. QFT-Plus results were analyzed according to demographic and clinical characteristics. Results: Of 408 eligible participants, of these, 23 were undetermined and were excluded from the analyzes. 385 had determined QFT-Plus results and were included. Of those, 88 had pulmonary TB and 9 had extrapulmonary TB. Among 288 patients in whom TB was ruled-out, QFT-Plus was negative in 203 (70.5%). The test then showed in patients with confirmed TB a NPV of 87.1% (95% CI: 83.8-90.5), PLWH 99.5% (95% CI: 98.7-100), ETB 96.6 (95% CI: 93.3-99.8). Weight loss (OR: 2.70 [CI: 1.39-5.23], $P=0.03$), PLWH (OR: 1.84 [CI: 0.99-3.41] $P=0.052$), Non-ETB (OR: 30.87 [CI: 3.57-266.51] $P=0.002$) were characteristics associated with test negative. The quantitative evaluation of the test showed significant difference in TB1 between the PTB and ETB groups ($p = 0.0496$), TB2 also with significant difference ($p = 0.0397$). Conclusion: QFT-Plus has a high negative predictive value, especially in PLWH and in cases of extrapulmonary tuberculosis and may be useful to avoid unnecessary empirical treatment.

Keywords: active tuberculosis, screening, interferon-gamma release assays, predictive negative value

RESUMO LEIGO

A tuberculose (TB) é uma das doenças que mais mata no mundo. Por ser tão grave, muitas vezes o tratamento sem a confirmação laboratorial é iniciado quando se tem suspeita da doença. Porém o tratamento sem necessidade pode trazer complicações. O objetivo deste trabalho foi verificar o desempenho de um teste, o QuantiFERON-TB Gold-Plus (QTF-Plus) na TB, para saber se ele pode auxiliar a descartar a doença em alguns casos. Principalmente nas pessoas que vivem com o vírus HIV e em quem tem suspeita de TB em outros órgãos, fora do pulmão (tuberculose extrapulmonar – TBEP). Os pacientes com suspeita da doença realizaram o QTF e o método de diagnóstico tradicional e esses resultados foram comparados. O teste mostrou ter boa capacidade de descartar a TB em quem vive com o HIV e nos casos de TBEP.

LISTA DE FIGURAS

1. Taxa de incidência estimada de TB no mundo, em 2017.....	2
2. Estimativa da prevalência do HIV em casos novos de TB em 2017.....	3
3. Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil habitantes), Brasil, 2009 a 2018.....	5
4. Coeficiente de mortalidade por tuberculose (por 100 mil habitantes, Brasil, 2008 a 2017.....	6
5. Transmissão e patogênese da TB.....	10
6. Fluxograma da população do estudo.....	32
7. Concentração de IFN- γ em TB1 e TB2 entre os grupos estudados.....	35
8. Fatores associados ao resultado negativo do QTF-Plus.....	36

LISTA DE TABELAS

1. Características clínicas e demográficas dos pacientes incluídos, distribuídos entre os grupos TBP, EPTB e Não-TB.....33
2. Desempenho diagnóstico do QTF-Plus para tuberculose ativa em diferentes grupos.....34

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

AIDS – Síndrome da imunodeficiência humana adquirida

BAAR – Bacilo álcool ácido resistente

BRICS - Brasil, Federação Russa, Índia, China e África do Sul

BK – Bacilo de Koch

CFP-10- Culture Filtrate Protein 10

ELISA – Ensaio imunoenzimático

ESAT-6 - Early Secretory Target 6 (ESAT-6)

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

INF- γ – Interferon-gama

MITOGEN – Tubo de sangue com mitógeno (controle positivo)

MS: Ministério da Saúde

M. tb: Mycobacterium tuberculosis

NIL – Tubo de sangue sem estímulo (controle negativo)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PVHIV – Pessoas que vivem com HIV

QTF-Plus – QuantiFERON-TB Gold-Plus

REDCap – Research Eletronic Data Capture

SUS - Sistema Único de Saúde

TB – Tuberculose

TBEP – Tuberculose extrapulmonar

TB1 e TB2 – Tubos de sangue com antígenos de *M. tuberculosis*

TB-MDR - Tuberculose multidroga resistente

TB-XDR - Tuberculose extensivamente resistente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Distribuição da doença e mortalidade.....	1
1.2 O agente etiológico.....	7
1.3 Transmissão e patogênese da TB.....	8
1.4 Formas e manifestações clínicas da TB	11
1.4.1 TB Pulmonar.....	12
1.4.2 TB Extrapulmonar.....	13
1.5 O Tratamento da TB	17
1.6 Diagnóstico da TB.....	19
1.6.1 Exames de imagem.....	19
1.6.2 Histopatologia.....	20
1.6.3 Baciloscopia.....	20
1.6.4 Cultura.....	21
1.6.5 Teste Rápido – Gene Xpert.....	22
1.6.6 Ensaio de liberação de interferon-gama (IFN- γ) (IGRAs).....	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos.....	26
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO.....	27
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS.....	40
5. CONCLUSÃO.....	40
6. REFERÊNCIAS.....	41
7. APÊNDICES.....	48
7.1 Apêndice 1.....	48
7.2 Apêndice 2.....	52
7.3 Apêndice 3.....	54
7.4 Apêndice 4.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose: distribuição da doença e mortalidade

A tuberculose (TB) é uma doença antiga e já foi uma sentença de morte. Tratamentos medicamentosos eficazes tornaram-se disponíveis pela primeira vez na década de 1940 e, em combinação com o desenvolvimento social e econômico, permitiram que países da Europa Ocidental, América do Norte e algumas outras partes do mundo reduzissem sua carga de TB para níveis muito baixos. Entretanto, para a maior parte do globo, o “fim” da TB como uma epidemia e um grande problema de saúde pública continua sendo uma aspiração e não uma realidade (1–3).

A doença está entre as 10 principais causas de morte no mundo e ainda é a principal causa de morte por um único agente infeccioso, ficando acima do HIV/AIDS. Em 2017 cerca de 10 milhões de casos novos foram registrados no mundo (mais em adultos que crianças e mais homens do que mulheres) (1,2).

Globalmente, a tuberculose está concentrada em países de baixa a média renda (Figura 1). Os cinco países - Brasil, Federação Russa, Índia, China e África do Sul - que compõem o grupo dos BRICS respondem por 46% de casos no mundo e 40% da mortalidade relacionada à TB (1,4).

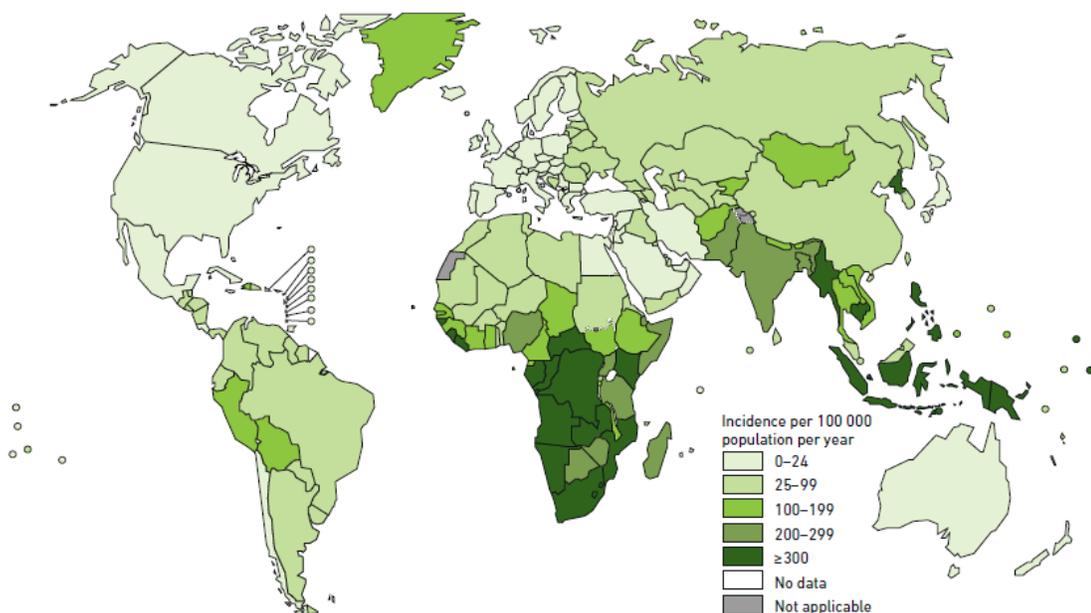


Figura 1 Taxa de incidência estimada de TB no mundo, em 2017.

Fonte: WHO. Global Tuberculosis Report 2018. 37p.

Em todo o mundo 6,7 milhões de novos casos de TB foram notificados oficialmente aos programas nacionais de TB e relatados a Organização Mundial de Saúde (OMS), eles representam 67% de casos reportados dos 10,0 milhões de novos casos estimados que ocorreram em 2017. Este número vem aumentando desde 2013, após 4 anos (2009–2012), nos quais 5,7–5,8 milhões de novos casos foram notificados anualmente. Este aumento é explicado principalmente pelo aumento das notificações na Índia (+ 44% entre 2013 e 2017) e na Indonésia (+ 21% entre 2016 e 2017) (1).

O desenvolvimento da doença ativa durante a vida ocorrer de 3 a 15% dos 1,7 bilhões de pessoas infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*), o agente causador da doença. São fatores de risco para desenvolvimento da doença: desnutrição, diabetes, tabagismo, o consumo de álcool, uso de outras drogas e a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, sigla do inglês Human Immunodeficiency Vírus) (1,5).

O HIV, desde a década de 1980, tem sido um dos principais fatores que contribuíram para o ressurgimento da TB, tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. Estima-se que 9% dos casos de TB incidentes em 2017 ocorreram entre pessoas vivendo com HIV (PVHIV). O risco de desenvolver TB nos 37 milhões de PVHIV é 20 vezes maior do que o risco no resto da população mundial. A proporção de casos de coinfeção TB/HIV foi mais alta em países da África (1,6). A África do Sul é responsável por cerca de 30% dos casos incidentes de coinfeção TB/HIV (4).

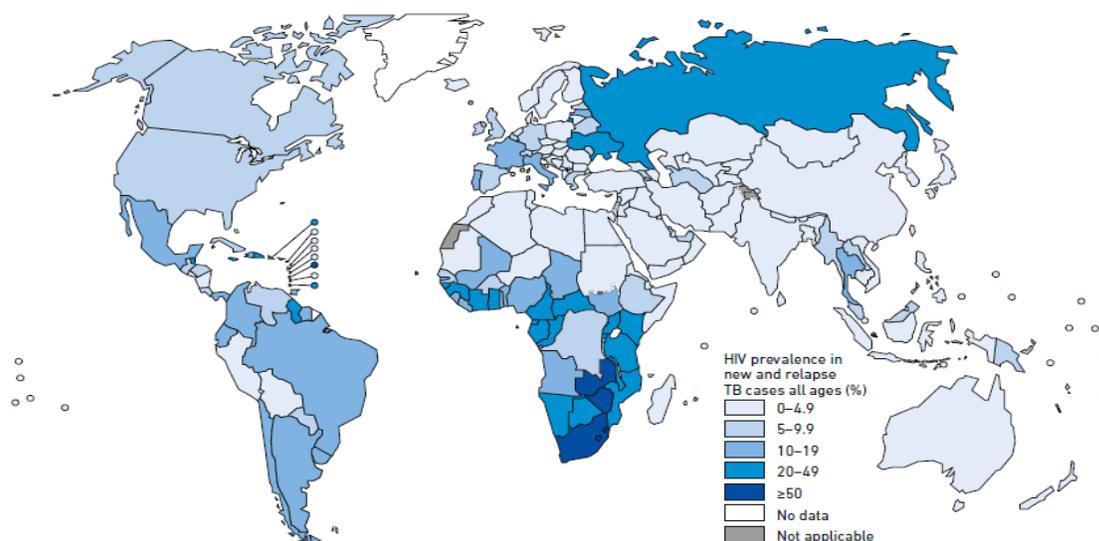


Figura 2 Estimativa da prevalência do HIV em casos novos de TB em 2017.

Fonte: WHO. Global Tuberculosis Report 2018. 38p.

Em 2017, a TB causou cerca de 1,3 milhões de mortes em pessoas soronegativas e houve um aumento adicional de 300.000 mortes por tuberculose (entre 266.000 e 335.000) entre as pessoas soropositivas. O diagnóstico e tratamento bem sucedido podem evitar milhões de mortes a cada ano (estima-se que 54 milhões no período de 2000 a 2017), mas ainda existem grandes lacunas na detecção e no tratamento (1).

Uma das principais ameaças emergentes na epidemia de TB envolve o aumento significativo da incidência de resistência aos medicamentos (6). A TB multidroga

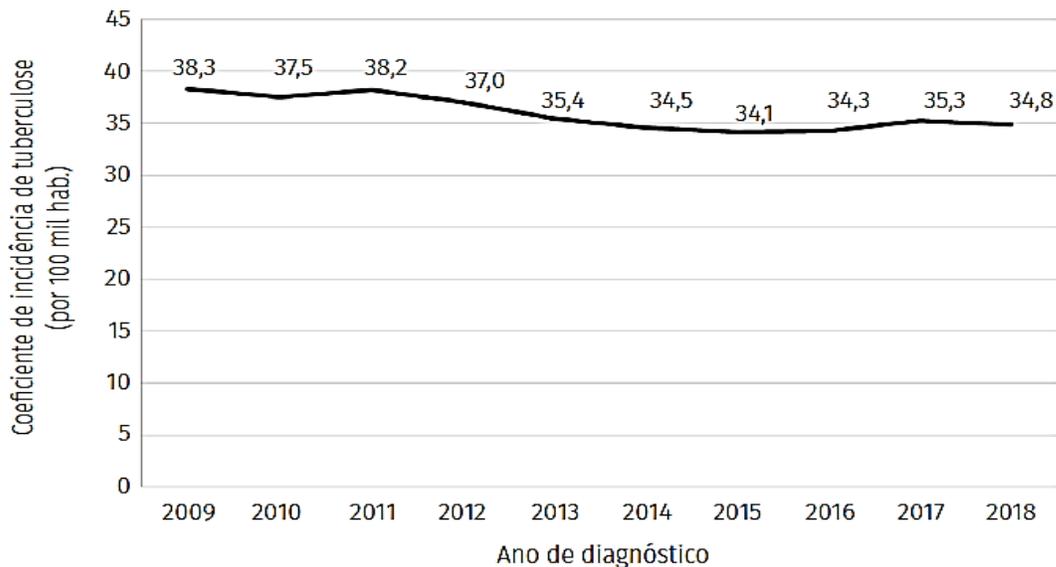
resistente (TB-MDR) é causada pelo *M. tb* resistente à rifampicina e à isoniazida, enquanto que, na TB extensivamente resistente (TB-XDR), o bacilo apresenta resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos três medicamentos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) (7).

A TB-MDR é especialmente elevada nos países em desenvolvimento, incluindo os BRICS (1). A China, a Índia e a Federação Russa, juntas, representam mais da metade - 56% - da carga global estimada. O Brasil sozinho responde por cerca de um terço das cargas estimadas de TB e TB-MDR do hemisfério ocidental (4). Estima-se que ocorram cerca de 350 000 novos casos por ano, uma média de 20,5% dos doentes com tuberculose e 3,5% dos que nunca foram tratados (8).

Fatores associados ao risco de desenvolvimento de TB-MDR são: pacientes com idade igual ou superior a 40 anos, desempregados, sem plano de saúde, com baciloscopia positiva, histórico de tratamento incompleto para TB e também tratamento prévio de TB, reação adversa aos medicamentos, PVHIV, ter Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), infecção por *M. tuberculosis Beijing*, prisão, uso de drogas intravenosas e ser profissional de saúde (9,10).

Em 2015, após um amplo processo de consulta, a OMS definiu três listas de países prioritários com alta carga da doença para o período 2016-2020: uma para TB, uma para TB-MDR e uma para TB/HIV. Eles são definidos como os 20 principais países com maior número absoluto de casos incidentes estimados, mais os 10 países adicionais com o fardo mais grave em termos de taxas de incidência per capita que ainda não aparecem no top 20 e que atingem um limiar mínimo em termos do seu número absoluto de casos incidentes (10 000 por ano para TB e 1000 por ano para TB/ HIV e TB-MDR) (1,2).

O Brasil encontra-se em duas dessas listas, ocupando a 20ª posição quanto à carga de TB e a 19ª no que se refere à coinfeção TB-HIV (11). No Brasil, desde 2003, a doença é considerada como prioritária na agenda política do Ministério da Saúde (MS) (1,11). Em 2018, foram diagnosticados 72.788 casos novos de TB, o que corresponde a um coeficiente de incidência de 34,8 casos/100 mil hab. (Figura 4). Embora, de 2009 a 2018, tenha sido observada uma queda média anual de 1,0%, o coeficiente de incidência aumentou nos anos de 2017 e 2018 em relação ao período de 2014 a 2016 (12).



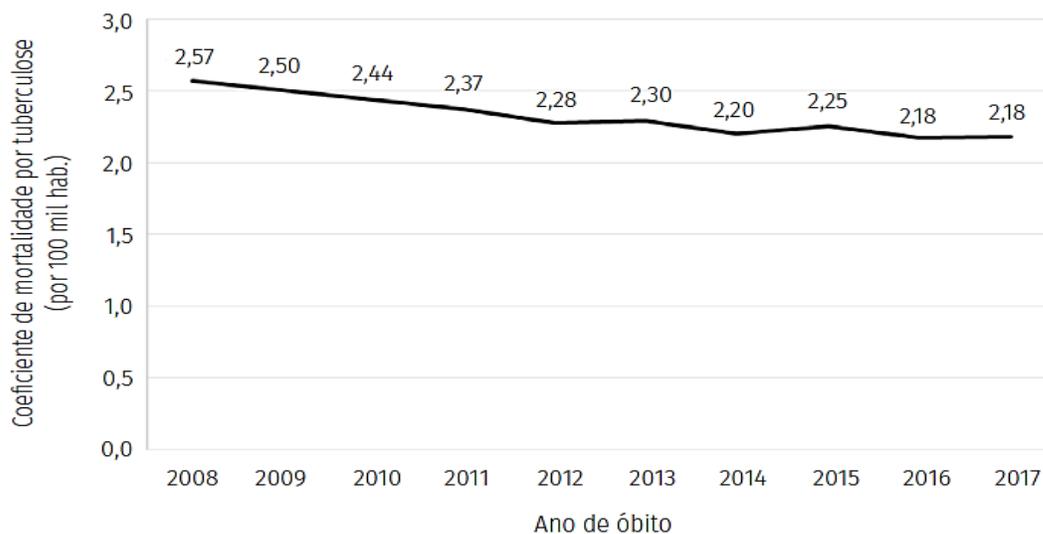
Fonte dos dados: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretarias Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

^aDados sujeitos a alteração.

Figura 3: Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil habitantes), Brasil, 2009 a 2018.

Fonte: Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil 2 | Volume 50 – 2019.

Em 2017, foram registrados 4.534 óbitos pela doença, o que equivale ao coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/100 mil hab., o mesmo obtido no ano anterior. De 2008 a 2017, o decréscimo médio anual do indicador foi igual a 2,1%, com queda de 2008 a 2012 e posterior estabilização (Figura 5)(12).



Fonte dos dados: Sistema de Informação de Mortalidade/Secretarias Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

*Dados sujeitos a alteração.

Figura 4: Coeficiente de mortalidade por tuberculose (por 100 mil habitantes), Brasil, 2008 a 2017.

Fonte: Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil 2 | Volume 50 – 2019

Quanto aos estados brasileiros em 2018, assim como em 2017, os maiores coeficientes de incidência foram registrados no Amazonas (72,9 casos/100 mil hab.), no Rio de Janeiro (66,3 casos/100 mil hab.) (12,13). Amazonas e Rio de Janeiro também estão entre os estado com maiores coeficientes de mortalidade, junto com os estados de Pernambuco e Pará (3,0 óbitos/100 mil hab.) (12).

As capitais brasileiras com maior coeficiente de incidência da tuberculose foram Manaus e Rio de Janeiro, com 102,6 casos/100 mil hab. e 89,9 casos/100 mil hab, respectivamente (12). A situação da tuberculose nas capitais do país exige atenção, uma vez que 70,4% (19 capitais) delas apresentam coeficiente de incidência superior ao registrado no país (13).

Na Amazônia, os casos de tuberculose têm sido registrados desde o final do século XIX, época em que a doença foi a segunda maior causa de morte na população (14). Reduzir a incidência e a mortalidade da tuberculose no Amazonas, o estado com a maior área geográfica do país, é um grande desafio devido aos obstáculos únicos da região, como a grande dispersão territorial da população e baixa densidade populacional, mas com casos de TB registrados em todos os municípios (15).

1.2 O agente etiológico

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, da família *Mycobacteriaceae*, subordem *Corynebacterium*, ordem *Actinomyces*, e tem como principal espécie causadora de tuberculose em humanos o *Mycobacterium tuberculosis* que junto de outras espécies compõe um grupo chamado de *complexo M. tuberculosis* (16).

O complexo *M. tuberculosis* é composto pelas espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin, cepa vacinal), *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* (1). A identificação do complexo *M.tb* é essencial para o diagnóstico e diferenciação das espécies, necessária para a seleção da terapêutica adequada e para fins epidemiológicos (17).

O *Mycobacterium tuberculosis* foi detectado em múmias egípcias, o que comprova que ele já comprometia o homem 3.400 anos antes de Cristo. Foi descrito por Robert Koch, bacteriologista alemão, em 1882, sendo, por isso, também chamado de bacilo de Koch (BK), em sua homenagem. O *M. tb* é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não esporulado, não encapsulado, que mede de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura, sendo a propriedade morfotintorial da álcool-ácido resistência a mais importante (18).

Uma peculiaridade importante é o agrupamento dos bacilos em forma de ramos alongados e tortuosos, conhecidos como cordas. A observação de cordas à

baciloscopia é uma indicação de que se trata de bactéria do complexo *M. tb*. O BK apresenta um alto conteúdo lipídico em sua parede celular, responsável por importantes efeitos biológicos, como a indução da formação de granuloma (18,19).

1.3 Transmissão e patogênese da TB

A transmissão da doença é direta, de pessoa a pessoa, principalmente através do ar. Ao falar, espirrar ou tossir, o doente com tuberculose pulmonar (TBP) ou laríngea ativa lança gotículas no ar, de tamanhos variados, contendo o bacilo. As gotículas mais pesadas caem no solo e as mais leves podem ficar suspensas no ar por diversas horas. A infecção é iniciada pela inalação de núcleos de gotículas com diâmetro de 1 a 5µm, contendo o *M. tb*, que conseguem atingir os bronquíolos e alvéolos e então iniciar a multiplicação (20). Alguns relatos de outras vias de infecção já foram descritas no passado, como a ingestão de leite ou outros materiais de bovinos infectados, mais raramente, infecção por via cutânea e infecção por via genital (21).

O bacilo possui a capacidade de se multiplicar e viver dentro das células fagocitárias do organismo e encontra no pulmão um meio altamente propício para seu desenvolvimento já que necessita de nutrientes e oxigênio para crescer. Devido às características de sua parede celular as micobactérias possuem uma grande resistência as mais adversas situações, porém podem ser destruídas por agentes físicos como calor, raios ultravioleta e radiações ionizantes, sendo assim, não sobrevivem por muito tempo em ambientes externos (18).

A infecção primária pode: (1) progredir para a doença ativa (pós-primária ou secundária); (2) ficar contida como infecção latente; (3) ser erradicada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Menos de 10% dos indivíduos infectados desenvolvem tuberculose ativa durante sua vida, permanecendo com a infecção latente (19). A infecção latente pelo *M. tb* (ILTB) ocorre quando o bacilo permanece inativo durante algum tempo e ao encontrar condições favoráveis, como desnutrição, etilismo, idade

avançada, estresse, HIV/AIDS, diabetes, insuficiência renal crônica, terapia com fator de necrose tumoral (TNF) de pacientes com doenças inflamatórias crônicas, tumores, uso de medicações imunodepressoras, dentre outras imunossupressões, poderá se multiplicar e provocar a doença ativa (19,22).

A OMS estima que um quinto da população mundial tenha ILTB. Estes indivíduos não apresentam nenhum sintoma e não transmitem a doença, mas são reconhecidos por testes que detectam a imunidade contra o bacilo (3). Eles também são o reservatório da doença (23).

Normalmente, no processo de infecção, parte dos bacilos inalados será retida pelos mecanismos físicos de defesa do aparelho respiratório – cílios nasais, reflexo da tosse e depuração mucociliar. Outra parte pode transpassar esses mecanismos de defesa e atingir o pulmão. O BK para se instalar no organismo humano por meio de diferentes moléculas em sua superfície, pode ligar-se a uma grande variedade de receptores celulares, dando início à infecção tuberculosa (18).

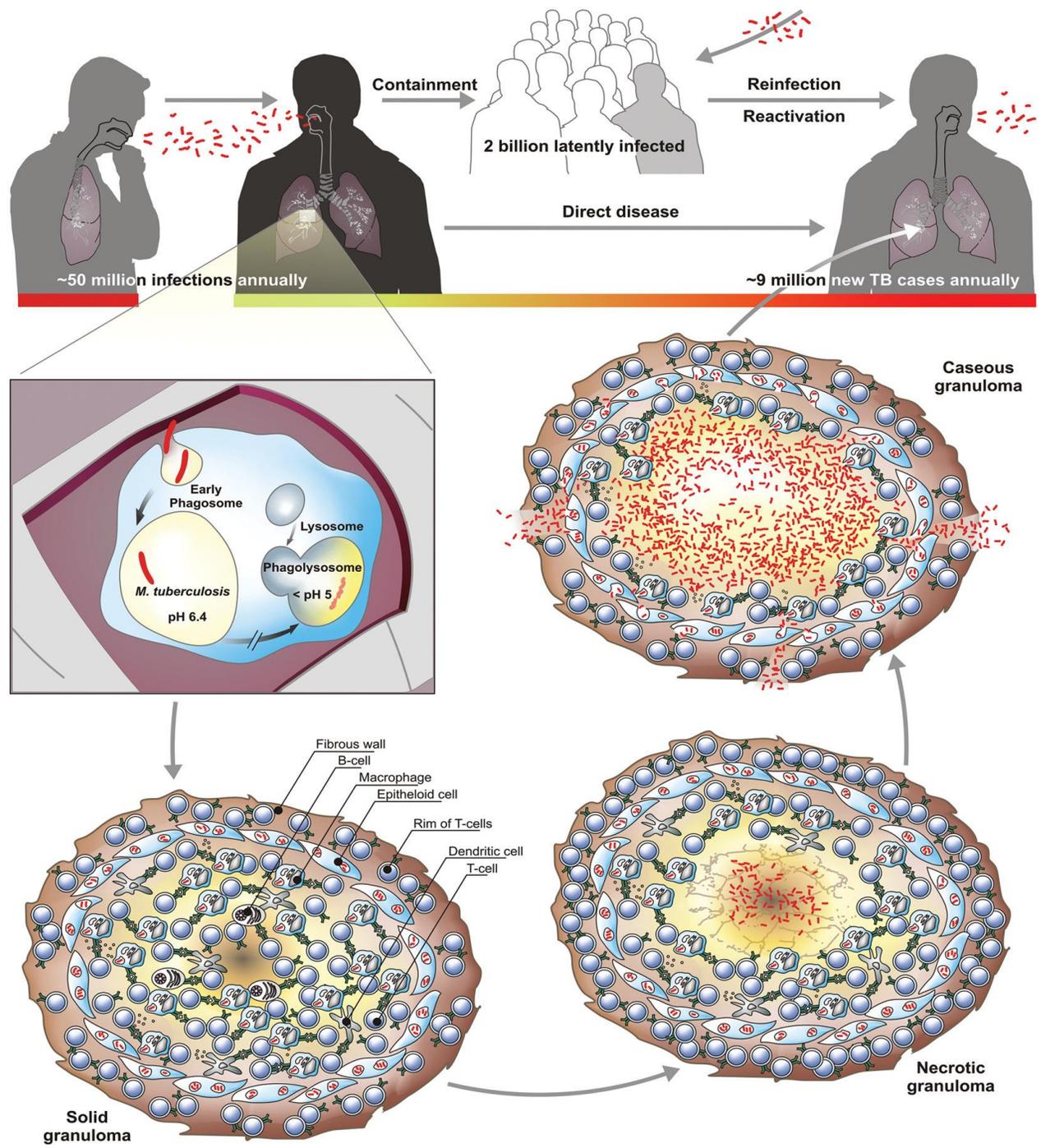


Figura 4: Transmissão e patogênese da TB.

Fonte: Martin Gengenbacher SHEK. *Mycobacterium tuberculosis* : Success through dormancy.

2013;36(3):514–32.

Por inalação de gotículas, o patógeno atinge as vias aéreas do pulmão e é fagocitado pelos macrófagos alveolares. A célula hospedeira infectada leva à produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, o que resulta no recrutamento de células imunes adicionais para o local, incluindo monócitos que se diferenciam em macrófagos e neutrófilos. As células dendríticas nas vias aéreas e o parênquima fagocitam os bacilos de *M. tuberculosis* e migram para os linfonodos que drenam os pulmões, que também são infectados. Nos gânglios linfáticos, é gerada uma resposta das células T (CD4 e CD8). Como as células T CD4, as células T CD8 são capazes de produzir citocinas IL2, IFN- γ e TNF, conhecidas por terem funções críticas durante a infecção por *M. tb*. É importante ressaltar que as células T CD8 têm funções citolíticas para matar células infectadas por *M. tb* (23).

As células T migram de volta para o local da infecção nos pulmões e participam da formação de granuloma. Granulomas são a marca patológica da tuberculose. São estruturas esféricas, organizadas e complexas que consistem em macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Figura 4). Frequentemente, o centro do granuloma é necrótico, denominado necrose caseosa. Esta estrutura é o resultado da tentativa de controlar e limitar a infecção (19,23).

1.4 Formas e manifestações clínicas da tuberculose

A TB normalmente afeta os pulmões, mas também pode afetar qualquer local ou sistema do organismo, ocasionando a tuberculose extrapulmonar (TBEP) (1). Pode haver também concomitância da lesão extrapulmonar com a pulmonar ativa (24). Desta forma, além da tosse prolongada, outros sinais e sintomas que dependem do tipo da apresentação de TB, podem ocorrer e devem ser valorizados na investigação diagnóstica individualizada (25).

1.4.1 TB pulmonar

O pulmão é o órgão mais comumente afetado, cerca de 79 a 87% das infecções por TB (26). A apresentação na forma pulmonar, além de ser a mais frequente, é a mais relevante para saúde pública, pois é a responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença, assim como a forma laríngea da doença (27,28).

Entre os sinais e sintomas clássicos da TB pulmonar (TBP) estão a tosse persistente superior a três semanas, seca ou produtiva, a expectoração, que pode ser mucóide, purulenta ou sanguinolenta, febre vespertina sem calafrios, sudorese noturna, emagrecimento, dor torácica e dispneia (26,29). Em crianças, comumente a forma primária manifesta-se de maneira insidiosa e o paciente apresenta irritabilidade, febre, sudorese noturna e inapetência (29). Usualmente, até que a doença esteja moderada ou muito avançada, os sintomas podem ser mínimos e muitas vezes atribuíveis a outras causas, como tabagismo excessivo, trabalho árduo, gravidez ou outras condições (26).

A TBP pós-primária ou secundária, ocorre devido à reativação endógena da tuberculose latente, e é geralmente localizada nos segmentos apicais e posteriores dos lobos superiores, onde a alta concentração de oxigênio promove o crescimento de micobactérias (30).

A TB miliar refere-se a um aspecto radiológico pulmonar específico, que pode ocorrer tanto na forma primária quanto na forma secundária da TB. É uma forma grave da doença, que é mais comum em pacientes imunocomprometidos, como PVHIV em fase avançada de imunossupressão. A apresentação clínica pode ser aguda ou subaguda, com maior frequência em crianças e em adultos jovens. De uma forma mais incomum, a TB miliar apresenta-se como doença crônica (idosos) ou mesmo febre de origem obscura. Os sintomas como febre, astenia, emagrecimento e tosse ocorrem em 80% dos casos (25).

1.4.2 TB extrapulmonar

A TBEP é complexa e multifacetada, constituindo uma proporção significativa da carga global de TB (31). O acometimento extrapulmonar ocorre em aproximadamente 10-20% dos casos de TB e em PVHIV até 60%, especialmente entre aqueles com imunocomprometimento grave (32,33). As formas extrapulmonares da tuberculose desenvolvem-se em órgãos com maior suprimento sanguíneo e, portanto, de oxigênio, sendo que alguns desses não apresentam condições tão ideais quanto o pulmão, na maior parte das vezes essa forma de TB é, em geral, paucibacilar, de instalação insidiosa e de evolução mais lenta (33).

A TBEP é de apresentação subaguda a crônica e não existe sinal ou sintoma específico em quaisquer de suas localizações, assim como nenhum aspecto radiológico também é patognomônico. Com isso, a doença deve ser sempre incluída no diagnóstico diferencial de qualquer quadro clínico, especialmente em países de alta prevalência, como o Brasil. Todo esforço para a composição diagnóstica deve ser feito o mais precocemente possível (32).

As formas ganglionares e pleurais são as mais frequentemente observadas, seguidas das formas que acometem os sistemas osteoarticular, urogenital, gastrointestinal, sistema nervoso central (SNC) e a forma cutânea (34–36). Como as lesões são paucibacilares e de difícil acesso, a obtenção de um diagnóstico de certeza é difícil e o tratamento pode começar com argumentos presuntivos (37,38).

A forma disseminada de TB tem sido observada há séculos, mas sua incidência exata não é conhecida. É definida como uma infecção por tuberculose que envolve a corrente sanguínea, a medula óssea, o fígado ou dois ou mais locais ou sistemas não contíguos e inclui a tuberculose miliar, que envolve os pulmões. Com seus sinais e sintomas inespecíficos, ela pode mimetizar uma variedade de doenças, exigindo um alto índice de suspeita para o diagnóstico precoce (39)

A tuberculose ganglionar (TBG) decorre da progressão dos focos bacilares e, embora qualquer cadeia linfonodal possa estar comprometida, localiza-se com maior frequência na cadeia cervical anterior, com leve predomínio à direita. O acometimento geralmente é unilateral e de vários gânglios na mesma cadeia. No início, os gânglios têm crescimento lento e são indolores e móveis; posteriormente, aumentam de volume e tendem a coalescer e fistulizar. O quadro clínico costuma ser insidioso, com febre moderada, inapetência e emagrecimento. (40). A involução espontânea é frequente, o que faz com que a história de quadro anterior semelhante torne obrigatório considerar a etiologia tuberculosa na investigação de linfonomegalias, particularmente em adultos jovens (37).

Já na tuberculose pleural, ocorre a ruptura de um pequeno foco caseoso subpleural, não detectável ao exame radiológico, e/ou a abordagem dos folhetos pleurais por disseminação hematogênica, ocasionando uma reação de linfócitos T, com liberação de diferentes linfocinas, facilitando o acúmulo de líquido no espaço pleural e a formação de granulomas (41). É a mais comum forma de TB extrapulmonar em indivíduos HIV soronegativos e ocorre mais em jovens. Cursa com dor torácica do tipo pleurítica. A tríade: astenia, emagrecimento e anorexia ocorre em 70% dos pacientes e febre com tosse seca, em 60%. Eventualmente, apresenta-se clinicamente simulando pneumonia bacteriana aguda, e a dispneia pode aparecer apenas nos casos com maior tempo de evolução dos sintomas. A cultura, associada ao exame histopatológico do fragmento pleural, permite o diagnóstico em até 90% casos. Os rendimentos da baciloscopia e da cultura do líquido pleural são respectivamente menores que 5% e 40% (18).

A TB no sistema nervoso central (SNC) é a manifestação mais grave da doença e é responsável por cerca de 5 a 10% de todos os casos de TBEP e aproximadamente 1% de todos os casos de TB (42). Seus sintomas podem incluir sinais neurológicos focais, dores de cabeça, distúrbios visuais, hidrocefalia, paralisia e hemiparesia de membros; e sinais de doença avançada, como estupor, coma, convulsões, paralisia múltipla e hemiplegia (43).

A doença pode começar com pequenos tubérculos caseosos que podem se formar em todo o cérebro, medula espinhal e meninges (44). A manifestação mais comum da TB do SNC é a meningite tuberculosa (TBM), que se manifesta quando os bacilos tuberculosos entram no espaço subaracnóideo (43). A aplicação da tomografia computadorizada (TC) e da ressonância magnética (RM) facilitou muito a avaliação e o manejo de pacientes com TB no SNC. Esses estudos são úteis para definir a presença e extensão da aracnoidite basal, edema cerebral e infarto, e a presença e evolução da hidrocefalia (41,42).

A TB osteoarticular é responsável por 10 a 15% das localizações extrapulmonares. Resulta, na maioria das vezes, da disseminação hematogênica do BK, e inicialmente afeta as zonas ósseas subcondrais, estendendo-se gradualmente em direção ao envelope sinovial, à cartilagem e ao espaço articular. Também pode ocorrer por disseminação linfática ou por contiguidade de acometimento ósseo local. O envolvimento ósseo e articular da TB são comumente mais encontrados em crianças e idosos. A radiografia de tórax mostra tuberculose pulmonar em metade dos pacientes com tuberculose osteoarticular (37,38).

A coluna vertebral é a localização osteoarticular mais comum (38). Nas vértebras, o segmento frequentemente envolvido pelo *M. tb* é a coluna torácica. A infecção usualmente começa no osso esponjoso do corpo vertebral, nas suas porções central e anterior ou logo abaixo da placa cartilaginosa. A evolução do processo determina estreitamento do espaço entre os dois corpos vertebrais adjacentes, que são progressivamente destruídos. Com a desintegração da vértebra, ocorre o rompimento cortical ósseo e o cáseo penetra nos tecidos moles vizinhos, dando origem a um abscesso paravertebral que pode se exteriorizar e progredir entre os tecidos moles paravertebrais. O conjunto dessas alterações caracteriza a espondilite tuberculosa, também designada “Mal de Pott” (32,37).

A tuberculose geniturinária (TBGU) é um tipo de TBEP que exerce um efeito deletério na função renal, podendo causar calcificação renal e estenose uretral (45). Embora a

TBGU seja uma forma rara de TBEP, ela é uma causa importante da doença renal crônica progressiva (DRC) (46). Os rins são o local mais comum da TBGU, com bactérias se espalhando de forma hematogênica. Os bacilos tuberculosos podem levar à formação de granuloma nos glomérulos e entrar no interstício medular. Posteriormente, a destruição da papila renal pode se desenvolver devido à ulceração dos cálices renais e envolvimento do sistema coletor. Essa destruição pode se estender em direção ao urotélio e induzir a formação de estenoses, resultando em hidroureter e hidronefrose. A calcificação renal na TBGU é comum e os pacientes podem desenvolver também contratura da bexiga (46,47).

Em um estudo, apenas 50% os pacientes com TBGU eram sintomáticos e apenas 18% haviam recebido um diagnóstico clínico (47). As manifestações clínicas da TBGU são inespecíficas. Assim, o diagnóstico é frequentemente atrasado e a progressão da TBGU pode levar à DRC devido à destruição do parênquima e à uropatia obstrutiva (32).

Na TB gastrointestinal a evolução pode adquirir caráter agudo em consequência de obstrução ou de perfuração intestinal, mas também pode evoluir insidiosamente. Os sintomas mais comuns são dor abdominal, localizada ou difusa, e episódios de diarreia ou constipação. Às vezes, pode haver sangramento digestivo pouco volumoso, especialmente sob a forma de enterorragia, nas lesões do cólon esquerdo e do retossigmóide. Ao exame físico, podem ser detectadas tumorações abdominais e, nas formas obstrutivas, distensão abdominal e peristaltismo visível (37).

A doença pode afetar qualquer parte do trato digestivo do esôfago para o reto. Tem sido relatado que as mulheres são mais frequentemente afetadas que os homens (48). O diagnóstico da tuberculose entérica baseia-se no exame radiográfico e na histopatologia de material obtido por biópsia (37).

1.5 O tratamento da TB

A apresentação farmacológica do esquema preconizado pela OMS e utilizado na maioria dos países, para adultos e adolescentes é em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos: Rifampicina (R), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z) e Etambutol (E), nas seguintes dosagens: R 150mg, H 75mg, Z 400mg e E 275mg (33). Pelo período mínimo de 6 meses, diariamente e sem nenhuma interrupção, mesmo com o desaparecimento dos sintomas. Para as crianças (abaixo de 10 anos), permanece a recomendação do esquema RHZ (49).

A combinação dos fármacos anti-TB com doses fixas no mesmo comprimido tem sido recomendada como uma medida adicional com o objetivo de aumentar a adesão ao tratamento pela diminuição do número de comprimidos a serem ingeridos (50).

O tratamento das formas extrapulmonares (exceto a meningoencefálica) também tem a duração de seis meses e usa as mesmas drogas que as formas pulmonares, assim como o tratamento em PVHIV, independentemente da fase de evolução da infecção viral. Para as formas de TB no SNC a duração do tratamento é de nove a 12 meses. A cirurgia complementar pode ser necessária em formas complicadas (33,38).

A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos para o tratamento, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando a cura do paciente. Atenção especial deve ser dada ao tratamento dos grupos considerados de alto risco para toxicidade, constituído por pessoas com mais de 60 anos, em mau estado geral, alcoolistas, PVHIV, em uso concomitante de medicamentos anticonvulsivantes e pessoas que manifestem alterações hepáticas. A R interfere na ação dos contraceptivos orais, devendo as mulheres, em uso deste medicamento, receberem orientação para utilizar outros métodos anticoncepcionais (33). O uso irregular dos fármacos e a infecção pelo HIV são fatores de risco independentes para a recidiva da TB curada com primeiro esquema de tratamento (51).

As reações adversas mais frequentes ao esquema básico são: mudança da coloração da urina (ocorre universalmente), intolerância gástrica (40%), alterações cutâneas (20%), icterícia (15%) e dores articulares (4%). Deve ser ressaltado que quando a reação adversa corresponde a uma reação de hipersensibilidade grave como plaquetopenia, anemia hemolítica, insuficiência renal etc., o medicamento suspeito não pode ser reiniciado após a suspensão, pois na reintrodução a reação adversa é ainda mais grave (33).

O paciente deve ser orientado da ocorrência dos principais efeitos adversos e da necessidade de retornar ao serviço de saúde na presença de algum sintoma que identifique como possivelmente associado ao uso dos medicamentos. O monitoramento laboratorial com hemograma e bioquímica (função renal e hepática) deve ser realizado mensalmente em pacientes com sinais ou sintomas relacionados e em pacientes com maior risco de desenvolvimento de efeitos adversos (28).

O tratamento diretamente observado (TDO) é uma importante estratégia que representa o cuidado às pessoas com tuberculose (52). Nele, o profissional de saúde tem o papel fundamental de garantir a supervisão de todo o tratamento e evitar as intercorrências que favoreçam o abandono, a recidiva, a falência e a tuberculose resistente, garantindo a adesão dos pacientes e um tratamento bem-sucedido (28). A cura dos pacientes diagnosticados com tuberculose é uma das principais estratégias para redução da morbimortalidade da doença (11).

1.6 Diagnóstico da Tuberculose

O diagnóstico de um indivíduo com suspeita de TB inclui uma avaliação clínica detalhada e exames e técnicas que têm sofrido importantes avanços nas últimas décadas (53). Em locais com elevadas taxas de incidência de TB, toda pessoa que procura a unidade de saúde devido à tosse prolongada (busca passiva) deve ter a TB incluída na sua investigação diagnóstica (25,33). No Brasil, cerca de 26,7% dos pacientes são tratados sem confirmação para tuberculose pulmonar, com base apenas no quadro clínico radiológico, essa dificuldade no diagnóstico ocorre devido alguns sintomas não serem tão específicos e a apresentação radiológica padrões diversificados (54).

1.6.1 Exames de imagem

Os exames de imagem, radiografia de tórax e tomografia computadorizada (TC) são as tecnologias mais propostas para o diagnóstico de TB ativa e podem auxiliar no diagnóstico de tuberculose pulmonar atípica ou extrapulmonar, frequente em PVHIV (33).

Na radiografia de tórax, a tuberculose pulmonar ativa pode manifestar-se sob a forma de consolidações, cavitações, padrões intersticiais (reticulares/retículo-nodulares), linfonomegalias hilares ou mediastinais e derrame pleural. Imagens compatíveis com doença ativa, como nódulos centrolobulares de distribuição segmentar, cavidades de paredes espessas, espessamento de parede brônquica ou bronquiolar, bronquiectasias e linfonomegalias, podem ser observadas pela tomografia computadorizada do tórax; cavidades de paredes finas, bronquiectasias de tração e estrias são imagens sugestivas de seqüela da doença, assim como o enfisema e o aspecto em mosaico do parênquima pulmonar (29).

O estudo da imagem traz informações importantes para o estabelecimento do diagnóstico da TBEP, embora em nenhuma de suas localizações haja padrões radiológicos específicos. Apenas em algumas poucas formas há concomitância com tuberculose pulmonar ativa e raramente se consegue observar evidência da passagem do bacilo pelo pulmão. Ainda assim, a radiografia de tórax é obrigatória, visto que a evidência de lesões de primoinfecção constitui um bom indicativo para o diagnóstico (55).

A tomografia computadorizada do tórax também pode ser utilizada na suspeita clínica de tuberculose pulmonar e tem se mostrado superior à radiografia do tórax na avaliação inicial da doença, dentre seus principais achados estão, baixa atenuação no centro dos linfonodos com realce das bordas periféricas devido à necrose, broncopneumonia tanto em lobos superiores e inferiores, presença de cavidades com paredes espessas, um importante sinal de doença ativa, lesões apicais fibrocalcificadas, consolidações, nódulos centrolobulares de distribuição segmentar que tendem a se fundir e formar nódulos maiores, consolidações lobares ou segmentares associadas a linfonomegalia hilar ou mediastinal, espessamento da parede brônquica, derrame pleural, bronquiectasias e pneumotórax (56).

1.6.2 Histopatologia

O diagnóstico histopatológico é um método empregado na investigação das formas extrapulmonares, ou nas formas pulmonares que se apresentam radiologicamente como doença difusa, por exemplo, na TB disseminada, ou em indivíduos imunossuprimidos. Nos pacientes não imunossuprimidos, a baciloscopia do tecido usualmente é negativa e a presença de um granuloma, com necrose de caseificação, é compatível com o diagnóstico de TB. Nos pacientes imunossuprimidos, é menos frequente a presença de granuloma com necrose caseosa, mas é mais frequente a positividade da baciloscopia no material de biopsia (28,33).

1.6.3 Baciloscopia

A baciloscopia de escarro (pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente – BAAR) é a técnica mais utilizada em nosso meio e foi desenvolvida há mais de 100 anos. Esta técnica requer o exame de amostras de expectoração usando um microscópio para determinar a presença de bactérias (1). Por ser um método simples e seguro, deve ser realizado por todo laboratório público de saúde e pelos laboratórios privados tecnicamente habilitados. Quando executada corretamente em todas as suas fases, permite detectar de 60% a 80% dos casos de TBP, o que é importante do ponto de vista epidemiológico, já que os casos bacilíferos são os responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão (33).

A baciloscopia trata-se de uma técnica simples, de fácil execução e baixo custo, é realizada por meio de um esfregaço em lâmina a partir de uma amostra pulmonar ou extrapulmonar, com posterior coloração de Ziehl-Neelsen, Kinyoun modificada ou auramina-O e rodamina, sendo que a mais empregada para o diagnóstico de TB é a de Ziehl-Neelsen, nesta técnica, a amostra é primeiramente corada com fucsina de Ziehl-Neelsen, depois descorada com álcool-ácido e, posteriormente, contracorada com azul de metileno (57).

É importante lembrar que um BAAR presente não é específico para o *Mycobacterium tuberculosis*. Outras micobactérias, tanto patogênicas saprofitas quanto potenciais, podem ser ácidas rápidas. Assim, a cultura do *M. tb* é a única maneira de confirmar o diagnóstico (26).

1.6.4 Cultura

A cultura do *M. tb* é o padrão de referência atual; a técnica exige mais capacidade laboratorial desenvolvida e pode demorar até 12 semanas para fornecer resultados (1). A cultura é um método de elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico da TB. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar

em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença (33).

Existem vários meios de cultura para as micobactérias, entre eles estão: Löwenstein-Jensen – (LJ, mais utilizado), com resultado positivo por volta de 28 dias e negativos ao final de oito semanas; o Mycobacteria Growth Indicator Tube – MGIT, em que a detecção do crescimento bacteriano tem por base a sensibilidade do rutênio ao consumo de O₂ com tempo médio de positividade de dez dias; o BACTEC-MGIT 960, com positividade em torno de dez dias (Becton Dickinson, s/d) e o meio de cultura Ogawa-Kudoh, com resultado semelhante ao meio Löwenstein-Jensen. Leitura após 48 horas de incubação e posteriormente de sete em sete dias (leituras semanais) até completar oito semanas (28,57).

Dada a natureza paucibacilar de casos de TB, extrapulmonares e em PVHIV, com cultura negativa, um exame de sangue com alto valor preditivo poderia ajudar a selecionar e descartar pacientes na triagem (por exemplo, em 24 h), o que resolveria uma grande necessidade clínica e que foi priorizada pela OMS (32,58,59).

1.6.5 Teste rápido - GeneXpert

O primeiro teste rápido para diagnóstico de TB recomendado pela OMS é o teste GeneXpert® MTB / RIF (Cepheid, EUA). Ele fornece resultados dentro de 2 horas e inicialmente recomendado (em 2010) para diagnóstico de TB pulmonar em adultos. Desde 2013, também foi recomendado para uso em crianças e diagnosticar formas específicas de TB extrapulmonar. A precisão do teste é maior que a baciloscopia de escarro (1)

No Brasil, Em 2012, duas cidades com alto coeficiente de incidência da doença, Rio de Janeiro e Manaus, participaram de um estudo para avaliação do teste quanto à sua operacionalidade (uso nas condições de rotina dos laboratórios), custo-efetividade e aceitação entre profissionais de saúde e pacientes. Com o estudo piloto foi possível observar que o TRM-TB aumentou a detecção de casos em 43,0% quando comparado

à baciloscopia. Esses resultados subsidiaram a tomada de decisão para a sua implantação no SUS (17).

O TRM-TB foi submetido à Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologia (CONITEC/MS) para inclusão no SUS, sendo esta aprovada em março de 2013 e a portaria publicada no Diário Oficial de 11 de setembro de 2013 (60)

Em Março de 2017 a OMS recomendou o uso em todos os ambientes de um teste Xpert® MTB / RIF de próxima geração (chamado Xpert® MTB / RIF Ultra) como substituto do atual cartucho Xpert MTB / RIF®. As alterações dentro do cartucho Ultra, incluem uma câmara maior para amplificação de DNA (ou seja, uma maior quantidade de escarro é usada para amplificação e detecção de DNA) e dois alvos moleculares adicionais para detectar a TB. Estas modificações explicam em grande parte o aumento da sensibilidade do Ultra, tendo melhorado a capacidade do ensaio em detectar baixos números de bacilos (16 bacilos por ml de expectoração em comparação com 131 por ml para o Xpert® MTB / RIF) (61).

Para a melhoria do diagnóstico, o MS promoveu a expansão da Rede de Teste Rápido da Tuberculose (RTR-TB), com a distribuição de 70 novos equipamentos em 2017 e 2018. A seleção dos municípios se deu com a participação das UFs, a partir de critérios epidemiológicos e operacionais. Essa expansão abre novas frentes de atendimento à população, permitindo o diagnóstico mais rápido da doença, bem como a identificação precoce dos casos de resistência à rifampicina, principal medicamento utilizado para o tratamento da tuberculose (13).

Os avanços no diagnóstico molecular, na última década, como o ensaio GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA), melhoraram a velocidade e a precisão do diagnóstico microbiológico e possibilitaram a previsão da suscetibilidade a antibióticos. No entanto, embora esses testes tenham alta especificidade (o que é importante para determinar a tuberculose), eles têm sensibilidade insuficiente para descartar a tuberculose e requerem amostras clínicas de locais de doença anatômica, que são frequentemente

obtidas com procedimentos invasivos de uso intensivo de recursos (62).

1.6.6 Ensaios de liberação de interferon-gama (IFN- γ) (IGRAs)

Os ensaios de laboratório baseados na liberação de interferon-gama (IFN- γ) foram desenvolvidos a fim de substituir o Teste de Sensibilidade (TS) no diagnóstico de infecção latente por *M. tb*. Eles baseiam-se na observação de que a infecção por micobactérias induz uma forte resposta imune do tipo Th1 (63).

A comparação de genomas de diferentes micobactérias levou à identificação de uma região diferencial (RD1) que está presente no *M.tb* e no *Mycobacterium bovis*, mas está ausente na BCG devido às múltiplas passagens que a cepa utilizada para a vacina sofreu. Os antígenos codificados por essa região formam a base dos testes que medem a secreção de IFN- γ pelos linfócitos T e que não reagem de forma cruzada com BCG. Nos seres humanos, dois antígenos foram estudados em maior detalhe, o Early Secretory Target 6 (ESAT-6) e o Culture Filtrate Protein 10 (CFP-10) (64). Outras vantagens do teste, consistem no resultado não sujeito ao viés do leitor e no fato de o teste ser realizado em amostra biológica, o que reduz o risco de efeitos adversos. Além disso, os iGRAs possuem vantagens operacionais, pois, ao requerer apenas uma visita do paciente, o retorno para a leitura do teste não é necessário (25).

Os testes no mercado usam uma combinação de ESAT-6 e CFP-10, baseados em uma técnica de ensaio imunoenzimático SPOT (ELISPOT) chamada T-SPOT-TB (Oxford Immunotec, Abingdon, UK), ou em um ensaio imunoenzimático (QuantiFERON-TB Gold in Tube, Cellestis, Carnegie, Austrália). O primeiro kit foi aprovado para uso na Europa e o segundo, nos Estados Unidos, para diagnosticar tuberculose ativa ou latente (65).

A utilidade clínica dos IGRAs existentes na doença ativa - T-SPOT.TB e QFT-GIT - e IGRAs de segunda geração incorporando novos antígenos de *M. tuberculosis*. em pacientes com suspeita de tuberculose em hospitais ingleses. IGRAs comercialmente disponíveis não têm precisão suficiente para a avaliação diagnóstica de suspeita de

tuberculose. Os IGRAs de segunda geração têm maior sensibilidade e valor preditivo negativo, o que pode ajudar a descartar o diagnóstico de tuberculose em situações clínicas com uma prevalência baixa a moderada (66).

A sensibilidade diagnóstica do QFT-Plus permaneceu inalterada em comparação com QFT--GIT para o diagnóstico de tuberculose pulmonar em um país onde a prevalência de TB é baixa. Pesquisas futuras podem revelar se maiores taxas de positividade entre pacientes com TB. Neste estudo, apenas quatro pessoas imunocomprometidas foram inscritas, o que não permitiu resultados conclusivos sobre QFTG-Plus e imunossupressão (67).

O QuantiFERON® TB-Gold-Plus (QFT-Plus), um IGRA disponível comercialmente, lançado em 2015, foi desenvolvido para aumentar a sensibilidade do teste em comparação às gerações anteriores, adicionando um tubo que estimula as células CD8 + a secretar interferon-gama quando estimulado com os peptídeos ESAT-6 e CFP-10, diferentemente dos antecessores, que estimulavam as células CD4 +.

Vários estudos já descreveram os valores de sensibilidade do QFT-Plus em pacientes com TB ativa e concordância entre as versões anteriores dos IGRAs e QFT-Plus. O ensaio mostrou valores de sensibilidade semelhantes quando comparado às versões anteriores, QuantiFERON-TB Gold in Tube e T-SPOT.TB (68–70). Os valores de sensibilidade do teste para pacientes adultos com tuberculose ativa confirmada variaram de 83% a 98,9% (68–71). No estudo de Nguyen (72), realizado em suspeitos de TB com menos de 18 anos de idade, a sensibilidade do estudo em pacientes com tuberculose pulmonar foi de 84,2% e ETB 14,3%. No entanto, seu valor em PVHIV e em pacientes com TB extrapulmonar foi pouco explorado.

As pessoas tratadas para tuberculose possuem risco maior de mortalidade após o tratamento, em comparação com a população em geral ou com controles pareados. Estes achados, sustentam a necessidade de mais pesquisas para entender e abordar os fatores biomédicos e sociais que afetam o prognóstico a longo prazo dessa

população (73). Assim como, algumas mortes após o tratamento da tuberculose provavelmente ocorreram em pessoas que nunca tiveram tuberculose e cujo diagnóstico incorreto pode ter negado o tratamento correto e que potencialmente poderia salvar de vidas.

O QFT-Plus ainda se mostra uma ferramenta insuficiente para confirmar o diagnóstico da TB, sozinho. No entanto, o teste pode fazer parte de um conjunto de ferramentas em combinação com avaliações clínicas, biológicas e radiológicas e pode ser um novo método para auxiliar a descartar TB e evitar tratamento empíricos desnecessários. Nosso objetivo foi explorar a acurácia e o valor preditivo do QFT-Plus em uma população com uma alta proporção de infecção pelo HIV. Também foram exploradas variáveis associadas ao resultado negativo e resultados quantitativos do teste.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estimar acurácia e o valor preditivo do QuantiFERON-TB Gold-Plus (QTF-Plus) nos casos de tuberculose confirmada

2.2 Específicos

- Explorar acurácia e valores preditivos do QTF-Plus nos casos de Tuberculose Pulmonar (TBP) e Extrapulmonar (TBEP) e em PVHIV e HIV negativo
- Descrever os valores quantitativos do teste entre os pacientes com TB confirmada x não-TB, TBP x TBEP, PVHIV e HIV negativo
- Verificar associação de características clínicas e laboratoriais com o resultado negativo do QTF-Plus

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

QuantIFERON-TB Gold-Plus as a rule-out test for active tuberculosis: a prospective accuracy study

Maria Cecília Borges-Cabral^{1,2}, Anete Trajman^{3,4}, Brenda Karoline Souza Carvalho^{1,2}, Alexandra Souza Brito^{1,2}, Renata Spener-Gomes^{1,2}, Jaqueline Silva Jesus^{1,2}, Vanderson Souza Sampaio^{1,2,5}, Daniel Barros de Castro⁵, Allyson Guimarães Costa^{1,2,6,7,8}, Marcelo Cordeiro-Santos^{1,2,9}

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
2. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brazil;
3. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;
4. McGill International TB Centre, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
5. Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Brazil;
6. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;
7. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
8. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil.
9. Universidade Nilton Lins, Manaus, Brazil

**Corresponding Author.*

Allyson Guimarães Costa¹

Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Av. Pedro Teixeira, 25, Dom Pedro, Manaus, AM, Zip code 69040-000, Brazil.

Email: allyson.gui.costa@gmail.com

Running Title: High negative predictive value of QFT-Plus for TB**Abstract**

Background: Unnecessary empirical treatment for tuberculosis (TB) is frequently started in persons living with HIV (PLWH) or with extrapulmonary tuberculosis (ETB) because bacteriological confirmation of the disease is difficult and outcomes are often adverse in this population. The aim of this study was to evaluate the value of QuantiFERON® TB-Gold-Plus (QFT-Plus) to rule-out TB in a HIV reference center in Brazil.

Methods: Patients with suspected TB were prospectively submitted to diagnostic tests (culture for *M. tuberculosis*, Xpert®MTB/Rif or histopathological examination of appropriate samples) as per routine and blood was withdrawn for QFT-Plus. QFT-Plus results were analyzed according to demographic and clinical characteristics.

Results: Of 408 eligible participants, of these, 23 were undetermined and were excluded from the analyzes. 385 had determined QFT-Plus results and were included. Of those, 88 had pulmonary TB and 9 had ETB. Among 288 patients in whom TB was ruled-out, QFT-Plus was negative in 203 (70.5%). The test then showed in patients with confirmed TB a NPV of 87.1% (95% CI: 83.8-90.5), PLWH 99.5% (95% CI: 98.7-100), ETB 96.6 (95% CI: 93.3-99.8).

Conclusion: QFT-Plus has a high negative predictive value, especially in PLWH and in cases of ETB and may be useful to avoid unnecessary empirical treatment.

Keywords: active tuberculosis, screening, interferon-gamma release assays, negative predictive value

Introduction

Tuberculosis (TB) is responsible for about 1.4 million deaths worldwide. People living with HIV (PLWH) are at increased risk of TB. TB is also the leading opportunistic infection contributing with about one-third of deaths in this population [1,2]. However, TB diagnosis may be difficult in this population because they frequently have extrapulmonary disease or paucibacillary pulmonary involvement. Thus, due to the high TB-case fatality rate in PLWH, empirical treatment is frequently started when TB is suspected, many times unnecessarily and delaying diagnosis of other conditions.

Interferon-Gamma Release Assays (IGRA) have been developed as a diagnostic alternative for tuberculin skin testing (TST) for latent TB infection (LTBI) detection. QuantiFERON® TB-Gold-Plus (QFT-Plus), a commercially available IGRA introduced in 2015, was developed to increase the sensitivity of the test compared to its previous generations by adding a tube that stimulates CD8+ cells to secrete interferon-gamma when stimulated with ESAT-6 and CFP-10 peptides [3], unlike the predecessors, that stimulated CD4+ cells. The sensitivity of QFT-Plus remained similar to other IGRA tests in immunocompetent persons. However, its value in PLH and in patients with extrapulmonary TB was poorly explored [4–8].

We aimed to explore the accuracy and predictive value of QFT-Plus in a population with a high proportion of HIV infection. We also explored variables associated with negative result and quantitative results of the test.

Methods

Ethical aspects

Ethics approval for the study was obtained from National Commission of Research Ethics, registration number, conducted in FMT-HVD (CEP/FMT-HVD process 2.525.182.). The study was conducted according to National Health Council Resolutions 466/2012 and 441/2011. All included patients signed an informed consent.

Study design and population

This was an observational prospective study. Patients 18 years or older presenting with symptoms suggestive of tuberculosis at Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD, a tropical disease and HIV reference center) and Fundação Cardoso Fontes (FCF, a TB reference center), in Manaus, Amazonas State, Brazil, were eligible and invited to participate. Those who accepted to participate signed an informed consent and were submitted to diagnostic tests for TB, as per routine, and were offered rapid HIV testing. In addition, blood was withdrawn for future testing with QFT-Plus and frozen stimulated serum. QFT-Plus results were not available for clinicians' decision on diagnosis and treatment. Those with any definitive diagnosis and with a valid QFT-Plus result were included. Patients under chemotherapy or immunosuppressive therapy and those who had received TB treatment for more than 7 days were excluded. Participants were classified as having bacteriologically confirmed pulmonary TB if sputum Xpert®MTB/Rif or culture for *M. tuberculosis* was positive, confirmed extrapulmonary TB (bacteriological confirmation in appropriate specimens or presence of caseous necrosis in histopathological examination) or other diseases.

Data collection and sources

Clinical and demographic information was gathered through a questionnaire carried out after participants signed the informed consent. Information on educational level and patient income was also collected. Laboratorial information regarding TB diagnosis was collected prospectively in electronic medical records and in the laboratory. For PLWH, CD4+ cell count and viral load information was also collected in electronic medical records. All chest radiographs (CR) were evaluated by the study team in the hospital imaging system. The presence of abnormality were considered suggestive of TB.

QTF-Plus technique and interpretation

Venous blood for testing with QFT-Plus was collected in four tubes (nil, TB1, TB2 and mitogen), and incubated at 37°C for 16–24 h. Processing and interpretations were performed according to the manufacturer's recommendations [3]. Results were analyzed

by a QFT-Plus Analysis Software (available from www.quantiferon.com). The software performs a quality control assessment of the assay, generates a standard curve and provides a test result for each subject. QFT-Plus was considered positive if TB1-nil and/or TB2-nil were ≤ 0.35 IU/ml. Results were considered negative if nil ≤ 8.0 IU/ml with either antigen-nil values < 0.35 IU/ml IFN- γ or $< 25\%$ of nil. Results were considered indeterminate if the nil value was > 8.0 IU/ml regardless of other tube values, or nil ≤ 8.0 IU/ml in the setting of mitogen-nil < 0.5 IU/ml and antigen-nil either < 0.35 IU/ml or $< 25\%$ of the nil value if ≥ 0.35 IU/ml. The mean difference of IFN- γ values in TB tubes and nil tubes were compared between participants with and without a final diagnosis of TB, between pulmonary and extrapulmonary TB and between PLH and those with a negative HIV result.

Data analysis

Proportions and their 95% confidence intervals (CI) were calculated. Mean IFN- γ values in different groups were compared using the nonparametric Mann-Whitney analysis. To describe factors associated with QTF-Plus negative, univariate regression was initially performed with clinical and demographic variables. Variables with $p < 0.2$ were kept in the model. The final model was defined once all remaining variables had a P-value of ≤ 0.05 . For statistical analyzes Stata, v.13.0 (USA) and Graphpad Prism version 5.0 software were used.

Results

Four hundred and eight patients were recruited. Were excluded 23 patients with indeterminate QFT-Plus results and they were not considered for the analyzes. Of the 385 included, 97 were classified as confirmed TB and 288 other diseases (Fig 1). No other exclusion criteria was observed. Among the 306 who accepted to be tested for HIV, 120 were positive, 10, 6 and 106 had PTB, ETB and other diseases respectively.

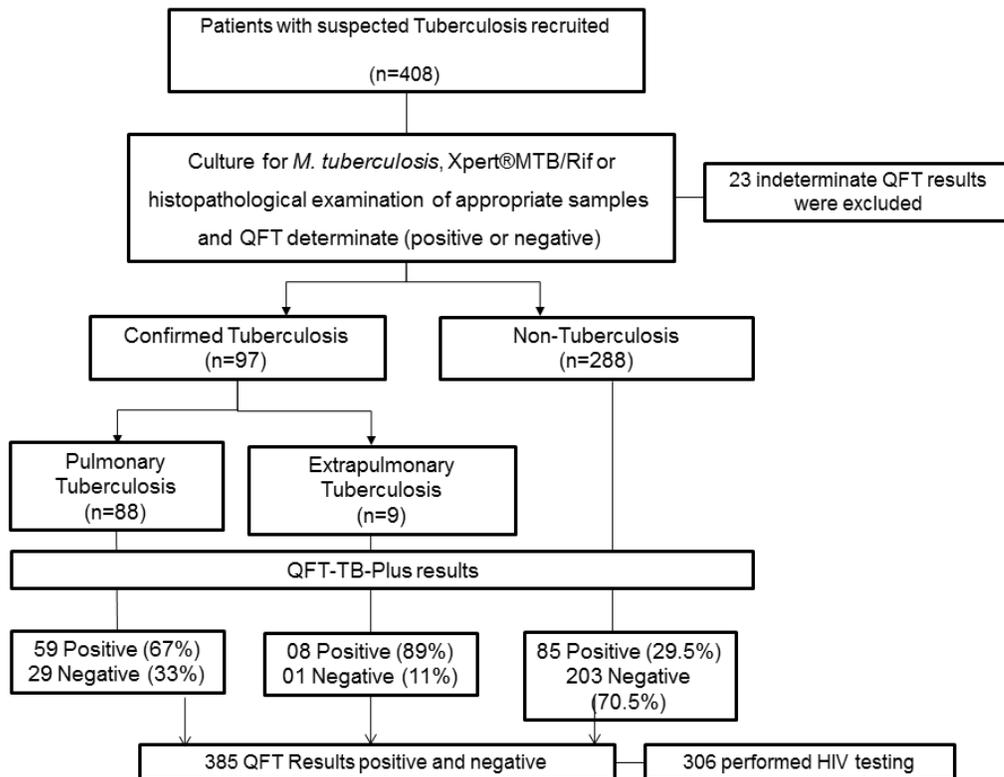


Figure 3. Flowchart of the study population

Socio-demographic and clinical characteristics of the participants according to the diagnosis are presented in Table 1. Most of the patients were of mixed ethnicity, literate and earned more than one minimum wage. The most common clinical characteristics in the PTB group were: chest radiograph abnormalities (92%), cough (96%), fatigue (71%) and weight loss (78%). In the ETB group were weight loss (67%) and fever (78%). Those who had other diseases had more cough (89%).

Table 1. Demographical and clinical characteristics of the included patients, distributed among the groups Pulmonary TB, Extrapulmonary TB and non-TB.

Characteristics	Pulmonary TB		Extrapulmonary TB		Non-TB	
	88	(%)	9	(%)	288	(%)
Age (median [IQR])	34 [26-51]		32 [28-38]		39.5 [30-51]	
Gender						
Male	63	(72)	5	(56)	170	59
Ethnicity						
Mixed	68	(78)	6	(67)	205	(71)
Caucasian	10	(12)	2	(22)	44	(15)
Others	9	(10)	1	(11)	33	(14)
Educational						
Literate	86	(98)	9	(100)	273	(95)
Income						
Minimum wage	55	(63)	5	(56)	187	(65)
Habits						
Smoking	48	(55)	3	(33)	152	(53)
Drinking	76	(86)	7	(78)	222	(71)
Other substance use	34	(39)	2	(22)	78	(27)
Clinical						
Chest radiograph	81	(92)	5	(56)	117	(41)
Cough	84	(96)	3	(33)	233	(89)
Hemoptysis	29	(33)	0	(0)	35	(12)
Night sweats	52	(59)	3	(33)	72	(25)
Fatigue	71	(81)	5	(56)	98	(34)
Dyspnea	35	(40)	2	(22)	96	(33)
Fever	56	(64)	6	(67)	93	(32)
Chest pain	69	(78)	2	(22)	114	(40)
Weight loss	78	(89)	7	(78)	140	(49)
HIV Status						
Positive	10	(13)	4	(44)	106	(48)
Negative	68	(87)	5	(56)	116	(52)

The minimum wage in 2018 was US\$246,2.

Table 2 Summarizes QFT-Plus characteristics in different groups. Overall NPV was highest in PLWH (96.6%) and in extrapulmonary TB (99.5%).

Table 2: Diagnostic performance of QTF-Plus for active tuberculosis in different groups.

	Prevalence % (95CI)	Accuracy % (95CI)	Sensitivity % (95CI)	Specificity % (95CI)	PPV % (95CI)	NPV % (95CI)
Cases of confirmed TB (n=97)	25.3 (20.9-29.6)	70.1 (65.4-74.5)	69.1 (64.5-73.7)	70.7 (66.18- 75.3)	44.4 (39.4-49.3)	87.1 (83.8-90.5)
Pulmonary Tuberculosis (n=88)	23.5 (19.2-27.8)	69.7 (64.9-74.1)	67.1 (62.3-71.8)	70.7 (66.1-75.3)	41.3 (36.3-46.2)	87.5 (84.2-90.9)
Extrapulmonary Tuberculosis (n=9)	3.0 (1.1-5.0)	71.0 (65.6-75.9)	88.9 (85.3-92.5)	70.7 (65.6-75.9)	8.7 (5.5-11.9)	99.5 (98.7- 100)
PLWH (n=14)	11.7 (5.9-17.4)	79.2 (71.1-85.5)	78.6 (71.2-85.9)	79.3 (72.0-86.5)	33.3 (24.9-41.8)	96.6 (93.3-99.8)
PLWH, CD4 count ≤ 350 (n=12)	15.0 (7.2-22.8)	83.8 (74.2-90.3)	75.0 (65.5-84.5)	85.3 (77.5-93.1)	47.4 (36.4-58.3)	95.1 (90.3-99.8)
HIV Negative (n=73)	38.8 (31.9-45.8)	65.1 (58.0-71.5)	65.8 (59.0-72.5)	65.2 (58.4-72.0)	54.6 (47.4-61.7)	75.0 (68.8- 81.2)

Quantitative QFT-Plus results in the studied groups between TB1 and TB2

Regarding assessing concentrations of IFN- γ in TB1 and TB2 (TB1-nil and TB2-nil) within the groups studied (Fig 2), the median TB1 in the confirmed TB group was 0.42 (IQR 0.1-2.47) and non-TB 0.01 (IQR 0.00-0.33) IU/ml, while in TB2 for the confirmed TB group it was 0.67 (IQR 0.13-2.5) and non-TB 0.02 (IQR 0.00-0.31) IU/ml. Differences in concentration in both TB1 and TB2 presented significant differences between the groups ($p < 0.001$). For TB1 of the PTB group the median was 0.43 (IQR 0.12-2.46) whereas in the ETB it was 2.25 (IQR 1.00-4.00) with $p = 0.0496$. In TB2 of the PTB group it was 0.69 (IQR 0.17-2.80) and ETB 2.35 (IQR 1.07-4.37), also with significant difference ($p = 0.0397$). In the HIV positive group, the median in TB1 was 1.02 (IQR 0.26-2.32) and HIV negative 0.43 (IQR 0.11-3.08). In TB2 of the HIV positive group 0.86 (IQR 0.23-2.76) and HIV negative 0.59 (IQR 0.16-3.24), showing no statistically significant difference between the concentration of TB1 and TB2.

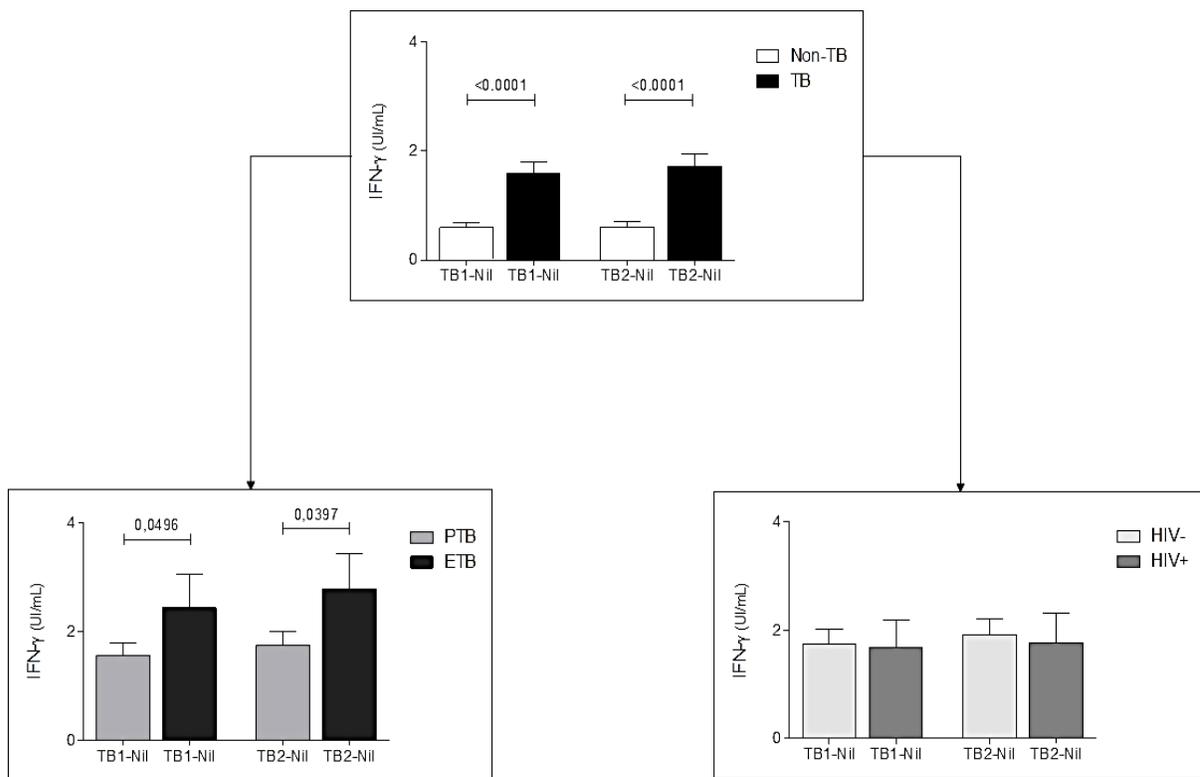


Figure 4: Concentration of IFN- γ in TB1 and TB2 between the studied groups

Factors associated to QTF-Plus negative results

Out of 385 test results determinate, 233 (60.51%) were negative. Show weight loss (OR: 2.70 [CI: 1.39-5.23], $P=0.03$) and PLWH (OR: 1.84 [CI: 0.99-3.41] $P=0.052$), were characteristics associated with test negative. Non-TBE patients with negative QFT result were also significant association (OR: 30.87 [CI: 3.57-266.51] $P=0.002$). Clinical symptoms night sweats (OR: 0.60 [CI: 0.28-1.25], $P=0.176$), was associated with the positive QTF-Plus result (Fig 3).

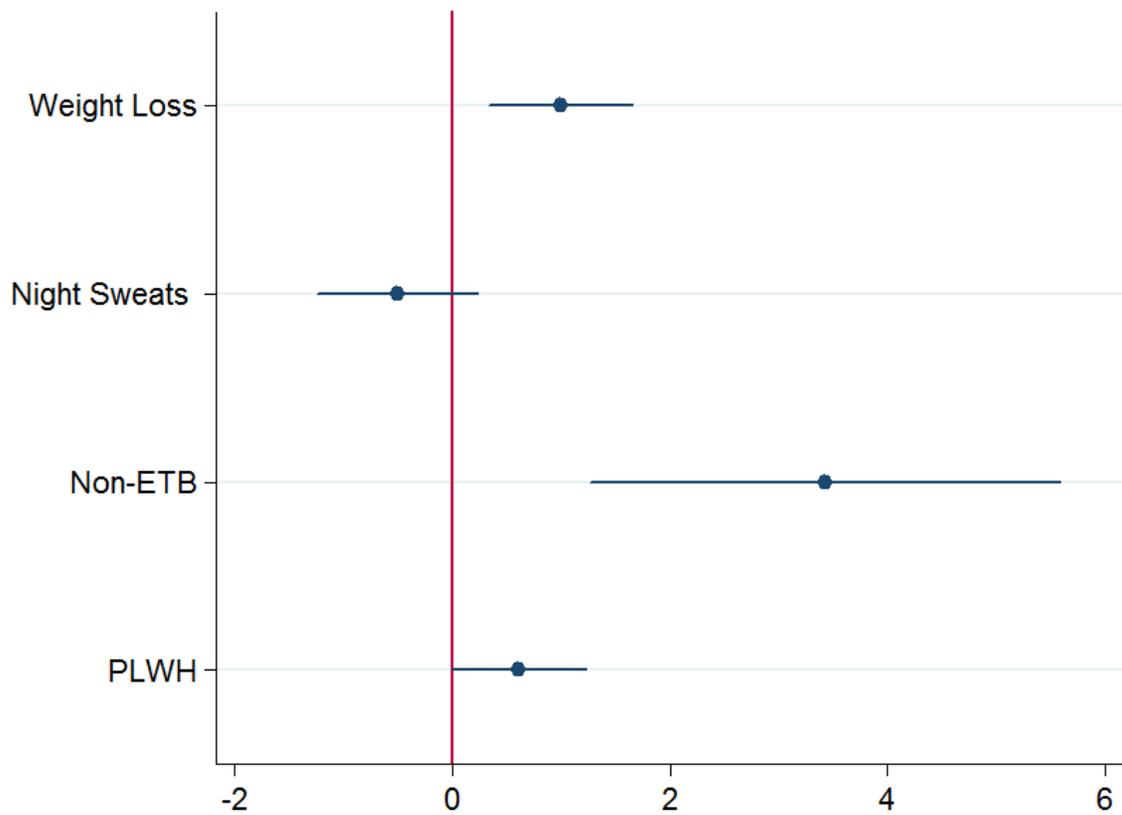


Figure 5: Factors associated to QTF-Plus negative

Discussion

The study was conducted to evaluate QFT-Plus performance in screening participants with clinically suspected active TB. The sensitivity of the test for all cases active TB was 69.1%, lower than previous studies [4–6,8]. However, for ETB cases the observed sensitivity was 88.9%, different from what was shown in a study conducted with child (median age 10 years) that related 14.3% sensitivity (2.3-13.4) in cases of ETB [7]. In the cases of TB, the specificity of the test was 70.1%, PPV was 44.4% and NPV was 87.1%. Other studies held in France and China they evaluated the utility of QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT-GIT) and T-SPOT.TB, earlier versions of QFT-Plus, in diagnosing active TB [9,10]. Obtained with QFT-GIT obtained 85% sensitivity and 73.3% specificity, when the indeterminate test results were excluded, PPV was 39.5% and NPV was 97.3% [14]. In the other study conducted in China, the sensitivity of QFT-GIT was 88.4%, specificity 60.5%, PPV 79.6% and NPV 68.6%. For T.SPOT-TB the sensitivity was 88.6%, specificity 63.4%, PPV 81.1%, NPV 70.3% [10].

A theoretical advantage of QFT-Plus over QFT-GIT and T.SPOT-TB is the inclusion of peptides that more efficiently stimulate a CD8 T-cell response and may improve test performance in PLWH [11]. Among PLWH the sensitivity was 78.6%, similar to the HIV positive cohort studied in Zambian with 85% [8]. QFT-Plus sensitivity values for active TB in PLWH were described in a systematic review in high and low burden viral load, the pooled sensitivity for tuberculosis were 61% for QFT-GIT, and 65% for T-SPOT.TB [12]. With that, we see a higher sensitivity in PLHIV comparing previous versions of IGRAs.

In our population, the NPV in PLWH of the test was 96.6%. No study had investigated the predictive values of QFT-Plus and the important role it can play in ruling out active tuberculosis in PLWH and avoiding empirical treatment in this population. As well as ruling out the chance of ETB, this had VPN 99.5%. TB treatment can save millions of lives, but drug toxicity also contributes to excess mortality after treatment, as evidenced by the harmful effects of months of

multidrug treatment on liver, kidney, hearing, and vision, especially in the treatment of drug resistant forms of tuberculosis [13].

PLWH and weight loss were associated with negative result test. In our population of PLWH, most had CD4 count ≤ 350 cells (PTB [100%], ETB [67%] and non-TB [70%]). Low CD4 cell count (< 100 cells) (OR 0.15, 95% CI 0.02-0.96; $p = 0.05$) in PLHIV and body mass index ,18.5 kg/m² (OR 0.27, 95%CI 0.08–0.91; $p = 0.02$) has been associated with decreased chances of positive QFT-Plus results [8]. This may indicate that test performance may be impaired if the patient has severe immune impairment.

IFN- γ concentrations in TB1 and TB2 were also evaluated in different groups. ETB group showed significantly higher concentrations than the PTB group (Fig 2A), which may be an interesting result. This finding was also reported in patients with lymph node TB who had significantly higher IFN- γ concentrations ($p=0.03$) compared to patients with pulmonary tuberculosis [9]. Clinical symptoms and test results on ETB may not be specific and suspects are often subjected to more invasive and painful tests to confirm the disease [14,15]. Thus, the test in question, which is performed through blood collection, would have advantages compared to invasive procedures, such as biopsy. This finding may signal an alternative tool in the diagnosis of ETB.

Conclusion

QFT-Plus has not been shown to have good accuracy in cases of active tuberculosis, but its high negative predictive value in cases of confirmed HIV-positive TB and in cases of ETB may be useful in ruling out the disease and avoiding empirical treatment.

Acknowledgements

We thank all professional researchers who participated in the study for their work in recruiting and serving participants until sample processing. We acknowledge the

support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

We have no relevant affiliations or financial involvement relating to the subject matter or materials discussed. The funding agencies had no involvement in this publication.

References

1. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2018. Geneva; 2018.
2. WHO guidelines on tuberculosis infection prevention and control 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
3. QIAGEN. QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-plus) ELISA package insert. Germantown, USA. 2017. Available at: <https://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/10/QFT-plus-ELISA-IFU-L1095849-R02.pdf> Accessed on 08/03/2019.
4. Takasaki J, Manabe T, Morino E, Muto Y, Hashimoto M, Iikura M, et al. Sensitivity and specificity of QuantiFERON-TB Gold Plus compared with QuantiFERON-TB Gold In-Tube and T-SPOT.TB on active tuberculosis in Japan. *J Infect Chemother*. 2018;24: 188–192. doi:10.1016/j.jiac.2017.10.009
5. Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri F, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON- Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis*. 2017;106: 38–43. doi:10.1016/j.tube.2017.06.002
6. Horne DJ, Jones BE, Kamada A, Fukushima K, Winthrop KL, Siegel SAR, et al. Multicenter study of QuantiFERON® -TB Gold Plus in patients with active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22: 617–621. doi:10.5588/ijtld.17.0721
7. Nguyen DT, Phan H, Trinh T, Nguyen H, Doan H, Pham N, et al. Sensitivity and characteristics associated with positive QuantiFERON-TB Gold-Plus assay in children with confirmed tuberculosis. *PLoS One*. 2019;14: 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0213304
8. Telisinghe L, Amofa-Sekyi M, Maluzi K, Kaluba-Milimo D, Cheeba-Lengwe M, Chiwele K, et al. The sensitivity of the QuantiFERON® -TB Gold Plus assay in Zambian adults with active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2017;21: 690–696. doi:10.5588/ijtld.16.0764
9. Azghay M, Nicaise P, Bouchaud O, Mechai F, Fain O. Utility of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay in adult, pulmonary and extrapulmonary, active tuberculosis diagnosis. *Int J Infect Dis*. 2016;44: 25–30.
10. Du F, Xie L, Zhang Y, Gao F, Zhang H, Chen W, et al. Prospective Comparison of QFT-GIT and T-SPOT. TB Assays for Diagnosis of Active Tuberculosis. *Sci Rep*. 2018; 1–9. doi:10.1038/s41598-018-24285-3

11. Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Codecasa L, Cugnata F, et al. First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur Respir J*. 2016;47: 1587–1590. doi:10.1183/13993003.02033-2015
12. Santin M, Muñoz L, Rigau D. Interferon- γ release assays for the diagnosis of tuberculosis and tuberculosis infection in HIV-infected adults: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0032482
13. Datta S, Evans CA. Comment Healthy survival after tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2019;3099: 1–2. doi:10.1016/S1473-3099(19)30387-1
14. M Ramirez-Lapausa, A Menendez-Saldana AN-A. Extrapulmonary tuberculosis : an overview. *Rev Esp Sanid Penit*. 2015; 3–11.
15. Ketata W, Rekik WK, Ayadi H, Kammoun S. Les tuberculoses extrapulmonaires. *Rev Pneumol Clin*. 2015;71: 83–92. doi:10.1016/j.pneumo.2014.04.001

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Este estudo, que fez parte de outro maior, foi conduzido em dois centros de referência para tratamento de TB em Manaus, Amazonas. Região onde a prevalência de TB é uma das mais altas do país. Outros estudos para avaliar o desempenho e comportamento do teste em locais com diferentes prevalências poderia fortalecer os resultados e sugerir também outras aplicações para o teste, que hoje, é indicado para diagnóstico de infecção latente. Assim como estudos avaliando exclusivamente os resultados do QTF-Plus na tuberculose extrapulmonar e diferenciando o desempenho do teste nas diversas apresentações da doença.

5. CONCLUSÃO

O teste pode não ter se mostrado eficaz para realizar o diagnóstico de TB, mas o seu alto valor preditivo negativo nos casos de PVHIV e TBEP chama atenção para uma ferramenta a mais para descartar a doença nesses grupos. O valor preditivo negativo pode auxiliar na tomada de decisão clínica, evitando custos e riscos de um tratamento desnecessário.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2018. Geneva; 2018.
2. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2017 [Internet]. World Health Organization. 2017. 1–262 p. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
3. WHO guidelines on tuberculosis infection prevention and control 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
4. Creswell J, Sahu S, Sachdeva S, Ditiu L, Barreira D, Mariandyshev A, et al. Tuberculosis in BRICS : challenges and opportunities for leadership within the post-2015 agenda. Bull World Heal Organ. 2015;(November 2013):459–60.
5. Silva DR, Muñoz-torrigo M, Duarte R, Galvão T, Bonini EH, Arbex FF. Fatores de risco para tuberculose : diabetes , tabagismo , álcool e uso de outras drogas. J Bras Pneumol. 2018;44(2):145–52.
6. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2016. 2016;Geneva, Sw.
7. Arbex MA, Siqueira HR de, D'Ambrosio L, Migliori GB. The challenge of managing extensively drug-resistant tuberculosis at a referral hospital in the state of São Paulo, Brazil: a report of three cases. J Bras Pneumol [Internet]. 2015;41(6):554–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132015000600554&lng=en&tlng=en
8. Comolet T. La tuberculose à bacilles multi-résistants : défis d ' une émergence globale. Bull la Société Pathol Exot. 2015;290–8.
9. Pradipta IS, Forsman LD, Bruchfeld J. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: A global systematic review and meta-analysis [Internet]. Journal of Infection. Elsevier Ltd; 2018. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.10.004>
10. Casal M, Vaquero M, Rinder H, Tortoli E, Grosset J, Gutiérrez J, et al. A

- Case-Control Study for Multidrug-Resistant Tuberculosis : Risk Factors in Four European Countries. *Microb Drug Resist.* 2005;11(1):62–7.
11. Saúde M da. Brasil Livre da Tuberculose : Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.; 2017.
 12. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. 2019;50.
 13. Ministério da Saúde. Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas. *Bol Epidemiológico* 11 [Internet]. 2018;49(11):18. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/26/2018-009.pdf>
 14. Batista D. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Amazonas. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1953;5:4333–47.
 15. Garrido S, Bühner-sékula S, Souza AB De. Review Article Temporal distribution of tuberculosis in the State of Amazonas , Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(March 2014):63–9.
 16. Brasil. Controle da Tuberculose: Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço. Ministério da Saúde. 2002;5(Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT):236.
 17. Brasil. Boletim Epidemiológico - O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. Ministério da Saúde. 2014;45.
 18. Campos HS. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. *Pulmão RJ.* 2006;15:29–35.
 19. Martin Gengenbacher SHEK. Mycobacterium tuberculosis : Success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;36(3):514–32.
 20. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011.
 21. PC P. Pathology of tuberculosis. *Seminars in Roentgenology.* Dep Pathol Duke Univ Med Center, Durham. 1979;14(3):196–2014.
 22. Cailleaux C. Diagnóstico e Tratamento da Tuberculose Latente. *Pulmão RJ.*

- 2012;21(1):41–5.
23. Lin PL, Flynn JL, Genetics M. CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection. *Semin Immunopathol.* 2016;37(3):239–49.
 24. Ferri A, Aguiar B, Wilhelm CM, Schmidt D, Fussieger F, Picoli SU. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. *Rev Lib.* 2014;15(24):105–212.
 25. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. MANUAL DE PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE. 2ª. Brasília, DF; 2018.
 26. Lyon SM, Rossman MD. Pulmonary Tuberculosis. *Microbiol Spectr.* 2017;1–13.
 27. Maria S, Diniz C, Ao A, Tuberculose DDE. Acesso ao diagnóstico de tuberculose pulmonar no cotidiano dos trabalhadores de saúde da atenção básica. Universidade de Minas Gerais. Available from http://www.enf.ufmg.br/site_novo/modules/mastop_publish/files/files_4e426bd66b214.pdf. 2011;
 28. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Tratamento Diretamente Observado (TDO) da Tuberculose na Atenção Básica. 2011.
 29. Bombarda S, FIGUEIREDO CM, FUNARI MBDG, SOARES JÚNIOR J, SEISCENTO M, TERRA FILHO M. Imagem em tuberculose pulmonar. *J Pneumol [Internet].* 2001;27(6):329–40. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-35862001000600007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 30. Facchinetti V, Alves TR. Tuberculose : uma abordagem geral dos principais aspectos. *Rev Bras FÁrmacia.* 2012;93(1):3–9.
 31. Norbis L, Alagna R, Tortoli E, Codecasa LR, Cirillo DM. Challenges and perspectives in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(5):633–47.
 32. Bethlem EP. Manifestações Clínicas da Tuberculose Pleural, Ganglionar, Geniturinária e do Sistema Nervoso Central. *Rev Pulmão RJ [Internet].* 2012;21(1):19–22. Available from: <http://www.sopterj.com.br/wp->

content/themes/_sopeterj_redesign_2017/_revista/2012/n_01/05.pdf

33. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para controle da tuberculose no Brasil. 2011.
34. Fiske CT, Griffin MR, Erin H, Warkentin J, Lisa K, Arbogast PG, et al. Black race , sex , and extrapulmonary tuberculosis risk : an observational study. *BMC Infect Dis.* 2010;10.
35. Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, Lobue PA, Armstrong LR. Epidemiology of Extrapulmonary Tuberculosis in the United States , 1993 – 2006. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1350–7.
36. Inayat F, Jafar MS, Ali NS, Hussain Q, Hurairah A. Enigma of Extrapulmonary Tuberculosis : Where Do We Stand ? *Cureos.* 2017;9(8).
37. Capone D, Mogami R, Tessarollo B, Capone RB. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão RJ.* 2006;15(021):253–61.
38. Ketata W, Rekik WK, Ayadi H, Kammoun S. Les tuberculoses extrapulmonaires. *Rev Pneumol Clin [Internet].* 2015;71(2–3):83–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneumo.2014.04.001>
39. Amrit Kaur MMKRRGGPT and RK. Extensive Multisystemic Disseminated Tuberculosis in an Immunocompetent Patient. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2018;11(9):42–6.
40. Fanlo P, Tiberio G. Tuberculosis extrapulmonar Extrapulmonary tuberculosis. *An Sist Sanit Navar.* 2007;30:143–62.
41. Light RW. Tuberculous pleural effusions. In: Light RW, ed. *Pleural Diseases.* Philadelphia, Williams & Wilkins. Pleural Dis Philadelphia, Williams Wilkins. 1995;
42. Cherian A, Thomas S. Central Nervous System Tuberculosis. *Afr Health Sci.* 2011;11(1):116–27.
43. Leonard JM. Central Nervous System Tuberculosis. *Microbiol Spectr.* 2017;(1):1–10.
44. Schaller MA, Wicke F, Foerch C, Weidauer S. Central Nervous System Tuberculosis. *Clin Neuroradiol.* 2018;16–23.

45. Kim EJ, Lee W, Jeong WY, Choi H, Jung IY, Ahn JY, et al. Chronic kidney disease with genitourinary tuberculosis : old disease but ongoing complication. *BMC Nephrol*. 2018;1–8.
46. Abbara A, Davidson RN. Etiology and management of genitourinary tuberculosis. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2011;8(12):678–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2011.172>
47. Figueiredo AA, Lucon AM. Urogenital Tuberculosis : Update and Review of 8961. 2008;10(3):207–17.
48. Giouleme O, Paschos P, Katsaros M, Papalexi F, Karabatsou S, Masmanidou M, et al. Intestinal tuberculosis : a diagnostic challenge – case report and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23:1074–7.
49. Report G, Surveillanceresponse ON. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010. 2010;
50. World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. Geneva World Heal Organ. 2003;
51. Picon PD, Bassanesi SL, Luiza M, Caramori A, Luiz R, Ferreira T, et al. Fatores de risco para a recidiva da tuberculose. *J Bras Pneumol*. 2007;33(5):572–8.
52. Ministério da Saúde. Panorama da tuberculose no Brasil Diagnóstico situacional a partir de indicadores epidemiológicos Panorama da tuberculose no Brasil : Diagnóstico situacional. 2018.
53. Rabahi MF, Laerte J, Júnior S, Carolina A, Ferreira G, Tannus-silva DGS, et al. Tratamento da tuberculose. *J Bras Pneumol*. 2017;43(5):472–86.
54. Antunes A, Ferreira A, Cristiana De Souza Queiroz K, Torres KP, Ângela M, Ferreira F, et al. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública Associated factors to pulmonary tuberculosis and sputum smear results in Natal/RN. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2005;8(2):142–51. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v8n2/06.pdf>
55. Lopes AJ, Capone D, Mogami R, Tessarollo B, Cunha DL da, Capone RB, et

- al. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Rev Perspect CIÊNCIA E SAÚDE*. 2016;1.
56. Lee KS, America N, Findings CT, Involving T, Primaiy LP. CT in Adults with Tuberculosis of the Chest: Characteristic findings and role in management. 1995;1361–7.
57. Brasil. Manual Nacional de VIGILÂNCIA LABORATORIAL da TUBERCULOSE e outras MICOBACTÉRIAS. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008. 265–285 p.
58. García-basteiro AL, Cobelens F. Triage tests : a new priority for tuberculosis diagnostics. *Lancet Respir [Internet]*. 2014;3(3):177–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00061-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00061-2)
59. M Ramirez-Lapausa, A Menendez-Saldana AN-A. Extrapulmonary tuberculosis : an overview. *Rev Esp Sanid Penit*. 2015;3–11.
60. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 48, de 10 de setembro de 2013. Brasília, 2013. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2013/prt0048_10_09_2013.html Acesso em 24 fev 2014.tle. 2013;
61. Report WHOM, Consultation TE, Mtb X, Ultra RIF, Mtb X. WHO Meeting Report of a Technical Expert Consultation : Non-inferiority analysis of Xpert MTB / RIF Ultra compared to Xpert MTB / RIF. 2017;1–11.
62. Whitworth HS, Badhan A, Boakye AA, Takwoingi Y, Rees-roberts M, Partlett C, et al. Clinical utility of existing and second-generation interferon- γ release assays for diagnostic evaluation of tuberculosis : an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2019;19:193–202.
63. Lighter J, Rigaud M, Eduardo R, Peng CH PH. Latent tuberculosis diagnosis in children by using the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test. *Pediatrics*. 2009;123:30–7.
64. Lalvani A MK. T cell-based diagnosis of childhood tuberculosis infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20:264–71.
65. Operating R. Acurácia do QuantiFERON-TB Gold in Tube no diagnóstico de

- tuberculose em uma população pediátrica jovem previamente vacinada com Bacille Calmette-Guérin. *Rev Paul Pediatr*. 2014;32(1):4–10.
66. Whitworth HS, Badhan A, Boakye AA, Takwoingi Y, Rees-roberts M, Partlett C, et al. Clinical utility of existing and second-generation interferon- γ release assays for diagnostic evaluation of tuberculosis an observational cohort study.pdf. 2019;3099(18):1–10.
 67. Hoffmann H, Avsar K, G R. Equal sensitivity of the new generation QuantiFERON-TB Gold plus in direct comparison with the previous test version QuantiFERON-TB Gold IT. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:701–3.
 68. Horne DJ, Jones BE, Kamada A, Fukushima K, Winthrop KL, Siegel SAR, et al. Multicenter study of QuantiFERON[®] -TB Gold Plus in patients with active tuberculosis . *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22(6):617–21.
 69. Takasaki J, Manabe T, Morino E, Muto Y, Hashimoto M, Iikura M, et al. Sensitivity and specificity of QuantiFERON-TB Gold Plus compared with QuantiFERON-TB Gold In-Tube and T-SPOT.TB on active tuberculosis in Japan. *J Infect Chemother [Internet]*. 2018;24(3):188–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.10.009>
 70. Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri F, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON- Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis [Internet]*. 2017;106:38–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2017.06.002>
 71. Telisinghe L, Amofa-Sekyi M, Maluzi K, Kaluba-Milimo D, Cheeba-Lengwe M, Chiwele K, et al. The sensitivity of the QuantiFERON[®] -TB Gold Plus assay in Zambian adults with active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis [Internet]*. 2017;21(6):690–6. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.5588/ijtld.16.0764>
 72. Nguyen DT, Phan H, Trinh T, Nguyen H, Doan H, Pham N, et al. Sensitivity and characteristics associated with positive QuantiFERON-TB Gold-Plus assay in children with confirmed tuberculosis. *PLoS One [Internet]*. 2019;14(3):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0213304>

73. Romanowski K, Baumann B, Basham CA, Khan FA, Fox G, Johnston JC. Long-term all-cause mortality among people treated for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2019;In Press(19):1–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30309-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30309-3)

7.1 APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Página 1 de 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Participante Sintomáticos Respiratórios)

Projeto: Novo teste diagnóstico para descartar o diagnóstico de tuberculose”

Você está sendo convidado(a) para participar desta pesquisa porque tem tosse e está fazendo exames para saber se tem ou não uma doença chamada **tuberculose**. A tuberculose é causada por um bichinho com o nome de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em todo o mundo. A maioria das pessoas tem tuberculose no pulmão, por isso quando o doente com tuberculose tosse pode passar a doença para outras pessoas. Hoje em dia o principal exame para descobrir a tuberculose é o exame de escarro/catarro. A tuberculose tem cura e o tratamento é de no mínimo 6 meses. As pessoas que moram na mesma casa ou ficam muito tempo juntas a alguém com tuberculose, devem ser avaliadas porque podem ter sido infectadas ou não com a bichinho da tuberculose. Sabe-se que algumas pessoas que se infectam com o bichinho da tuberculose podem um dia ficar doentes, e outras podem passar anos ou a vida inteira e nunca adoecerem. Muitos pesquisadores vêm estudando porque isso acontece. Assim, um maior conhecimento de toda a tuberculose é necessário.

O estudo que você está sendo convidado para participar tem o objetivo de estudar um novo teste para descartar o diagnóstico da tuberculose. No futuro, esse novo teste poderá informar rapidamente quem não tem tuberculose, e evitar perda de tempo, exames caros e tratamentos errados.

Resumo do estudo:

Esse projeto vai estudar um novo teste para tuberculose em pessoas com sintomas de tuberculose, contatos de pessoas com tuberculose e voluntários saudáveis. **No seu caso, você é uma pessoa com sintomas de tuberculose.** O estudo é uma parceria entre os pesquisadores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Instituto de Medicina Social, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Hospital *Addenbrookes, Cambridge, Core Biochemical Assay Laboratory*.

Todo o atendimento médico, de enfermagem, coletas de sangue, processamento/congelamento e armazenamento das amostras serão realizados nas instalações da FMT-HVD. Periodicamente as amostras de sangue congeladas serão enviadas para a realização do novo teste para tuberculose no *Hospital Addenbrookes, Cambridge, Core Biochemical Assay Laboratory* localizado na Inglaterra.

A sua participação neste estudo:

A sua participação é conceder informações pessoais (como por exemplo sexo, moradia e idade), informações de saúde e amostras de sangue para congelamento e realização do novo teste para tuberculose. Também serão realizados os exames: teste anti-HIV (vírus da imunodeficiência humana), coleta de catarro, radiografia de tórax e hemograma (quando necessário). Se você já for portador do HIV, um exame de contagem das suas células de defesa e exame de carga viral do HIV serão feitos, caso você não tenha feito nos últimos 6 meses, conforme recomendação do Ministério da Saúde.). Ressaltamos que o exame de HIV será realizado após seu consentimento e esclarecimento de todas as suas dúvidas. O resultado será informado por um profissional da saúde treinado em uma sala reservada seguindo o protocolo do Ministério da Saúde; resguardando o sigilo do resultado desse exame. Em caso de HIV positivo iremos realizar os encaminhamentos necessários para início do tratamento em alguma unidade de saúde do SUS próxima de sua casa ou na própria FMT-HVD, conforme recomendação do Ministério da Saúde. O exame de sangue IGRA (teste de liberação de Interferon) é para descobrir se você já foi infectado(a) ou não pelo bichinho da tuberculose. Esse exame já foi recomendado pelo Ministério da Saúde e liberado pela Anvisa, mais ainda não é feito no Sistema Único de Saúde (SUS).

Se o seu exame de escarro/catarro der positivo para o bichinho da tuberculose, nós (equipe de pesquisa) vamos lhe oferecer tratamento com os remédios conforme recomendação do Ministério da Saúde, esse tratamento poderá ser realizado na FMT-HVD, ou se desejar, você será encaminhado para uma unidade de saúde próxima de sua casa no mesmo dia para iniciar o tratamento, garantindo a continuação do mesmo. Todos os resultados e procedimentos serão ofertados conforme as orientações do Ministério da Saúde.

Se você for mulher e tiver potencial para engravidar, nós, a equipe do estudo, solicitaremos que você forneça urina para fazermos um teste de gravidez no início do estudo. Você não poderá participar do estudo se estiver grávida ou amamentando.

Rubrica do(a) Participante da pesquisa ou responsável legal: _____ Rubrica do pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo: _____ Rubrica da Testemunha (se aplicável): _____
Versão_2.0_TCLE_SR_25_abril_2018

Custos da pesquisa e compensação:

Não há nenhum custo para que você participe desta pesquisa. Além disso, os pesquisadores tentarão minimizar as suas despesas ressarcindo-o(a) por gastos com transporte e alimentação no dia que vier à consulta do estudo. Se precisarmos que você venha aqui em alguma ocasião só por conta do estudo, reembolsaremos toda e qualquer despesa decorrente ao seu deslocamento para instituição, como por exemplo, seu transporte e alimentação assim como do seu acompanhante, caso necessário.

Todos os gastos com os procedimentos realizados no projeto serão pagos pelo próprio estudo em parceria com Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Instituto de Medicina Social, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Hospital *Addenbrookes, Cambridge, Core Biochemical Assay Laboratory*.

Riscos:

Os riscos para participação são mínimos. A coleta de amostras de sangue pode dar dor, vermelhidão, inchaço ou irritação no local onde foi coletado o sangue; isso acontece devido ao uso da agulha e da cordinha (garrote) usados na coleta de sangue. Todo o material para coleta de sangue será novo e descartável. Todos os procedimentos serão realizados pela equipe de estudo treinada em um local reservado e apropriado. Caso você passe mal, tenha alguma dúvida ou se você se sinta constrangido(a) com a coleta das amostras, a equipe do estudo estará pronta para lhe atender e tentará minimizar ao máximo o seu desconforto.

Caso você tenha algum dano ou desconforto relacionado diretamente ou indiretamente à sua participação nesse estudo, você receberá todo o suporte da equipe de pesquisa, assim como indenização devido a eventuais danos decorrentes da pesquisa. A equipe está disponível para auxiliá-lo(a) independentemente da sua participação neste estudo. **Você terá garantia de assistência de saúde integral e gratuita durante todo o período de estudo.**

Benefícios:

Não há nenhum benefício direto em participar. Sua participação talvez ajude outras pessoas no futuro que estejam passando pelo mesmo processo de diagnóstico que você está passando atualmente. Pretendemos publicar nossos resultados para que os médicos, no futuro, possam saber quando e como usar esse novo exame de sangue.

Participação voluntária:

A sua participação neste estudo é **voluntária, ou seja, você pode participar ou não deste estudo**. Se você escolher não participar, não haverá nenhum prejuízo para você, você continuará tendo o mesmo atendimento que sempre teve nesta unidade de saúde. Caso aceite, você pode desistir de participar a qualquer momento, assim como de mantém ou não as suas amostras de sangue congeladas e guardadas. Você não precisa explicar o porquê você não quer mais participar, deve apenas comunicar à equipe do estudo que está saindo. Se quiser sair do estudo garantimos a continuação do seu tratamento (se confirmar tuberculose), caso você esteja tratando com a equipe de estudo. Garantimos a você o direito a assistência de saúde integral e gratuita, mesmo que não queira participar do estudo e/ou mesmo que não queria mais manter as suas amostras armazenadas.

Uso do Material Coletado, Dados e Confidencialidade:

Todo material coletado será mantido em local seguro. Nenhuma amostra coletada será identificada com o nome, usaremos códigos para manter a sua confidencialidade e o sigilo das informações. As suas informações demográficas (exemplos: idade, sexo, onde nasceu, e outras perguntas) e informações clínicas (tosse, febre, remédios e outras), perguntadas durante as consultas de enfermagem/médica, serão utilizadas para análises deste estudo. Estas informações serão registradas em fichas de dados pela equipe do estudo, e armazenadas em um sistema para registro de dados no Brasil. Asseguramos que nenhuma das suas informações pessoais será fornecida e sua confidencialidade será mantida também através do uso de códigos. **O armazenado das amostras será por até 05 anos, após esse período as amostras serão destruídas.** Reforçamos que qualquer pesquisa futura com esses dados ou amostras deverão ser encaminhadas e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em pesquisa, antes de serem iniciadas.

Rubrica do(a) Participante da pesquisa ou responsável legal: _____ Rubrica do pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo: _____ Rubrica da Testemunha (se aplicável): _____
Versão_2.0_TCLE_SR_25_abril_2018

Precisamos saber se você, aceita que suas amostras sejam armazenadas. Por favor, marque SIM ou NÃO abaixo:
 () SIM, autorizo a guarda do material () NÃO, autorizo a guarda do material.

Em caso de dúvida poderá entrar em contato com:

Pesquisador Responsável:

Dra. Anete Trajman

Professora Visitante, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

e-mail: atrajman@gmail.com

telefone: (21)98218-9194

Co-pesquisador Responsável:

Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos.

Médico infectologista, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Av. Pedro Teixeira, Dom Pedro Nº 25. CEP 69040-000 – Manaus - AM

E-mail: marcelocordeiro.br@gmail.com/ Telefone: (92) 2127- 3555.

Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa:

Os comitês de ética existem para proteger os participantes da pesquisa. Pesquisas com seres humanos só podem ser feitas se aprovadas nesses comitês. Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos como participante de uma pesquisa ou se quiser fazer alguma reclamação, pode procurar os comitês de ética nos contatos abaixo.

Contato dos Comitê de Ética em Pesquisa (dependerá do local):

Universidade do Estado do Rio de Janeiro- Instituto de Medicina Social

Rua São Francisco Xavier, 524 – Maracanã, 20550-900 – Rio de Janeiro – RJ

Sala 7003 (7º andar) – Bl. D (Anexo à secretaria acadêmica)

Tel: (21) 2334-0235 r. 108

Email: cep-ims@ims.uerj.br

Horário de atendimento ao público: segundas-feiras, quartas-feiras e sexta-feias: 10h às 12:30 e 13:30 às 16h.

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

Av. Pedro Teixeira, Dom Pedro Nº 25. CEP 69040-000

Prédio: Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, terceiro andar

Telefone (92) 2127-3572

Email: cep@fmt.am.gov.br

Horário de Funcionamento: 2a a 6a de 08 às 14h

Caso você tenha lido e entendido as informações neste termo de consentimento – ou elas tenham sido lidas para você – e caso concorde em participar voluntariamente deste estudo, você e o pesquisador/ou alguém nomeado por ele assinarão duas vias originais deste documento. Uma via assinada por você e pelo pesquisador/ou alguém nomeado por ele ficará com você a outra via será guardada em local seguro na FMT-HVD. Ao assinar este documento, você não abrirá mão de nenhum direito legal, assim como poderá sair do estudo a qualquer momento sem prejuízo nenhum. Será também necessário que você e o pesquisador rubriquem todas as páginas deste termo, assegurando que todas as páginas foram lidas, o que garante ainda mais a sua proteção.

Li ou leram para mim esse termo e concordo em participar da pesquisa,

 Nome do(a) participante (letra legível)

____/____/____
 Data

 Assinatura do(a) participante

 Hora

 Nome do pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo (letra legível) Data

Rubrica do(a) Participante da pesquisa ou responsável legal: _____ Rubrica do pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo: _____ Rubrica da Testemunha (se aplicável): _____

Assinatura pesquisador responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo _____ :
Hora

Nome da testemunha imparcial (letra legível) _____ / ____ / ____
Data

Assinatura da testemunha imparcial _____ :
Hora

Rubrica do(a) Participante da pesquisa ou responsável legal: _____ Rubrica do pesquisador
responsável ou do profissional nomeado para aplicação do termo: _____ Rubrica da Testemunha
(se aplicável): _____ Versão_2.0_TCLE_SR_25_abril_2018

7.2 APÊNDICE 2: QUESTIONÁRIO DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL

IMMIPRINT®

Página 1 de 3

INVESTIGAÇÃO CLÍNICA*Sintomático respiratório e Extrapulmonar***Participante ID:** _____ **Grupo:** TB pulmonar TB extrapulmonar Outros**HISTÓRIA CLÍNICA**

Iniciais: _____ Prontuário: _____ Data da avaliação: _____

Sexo ao nascimento: Masculino Feminino

Data de nascimento (DD/MM/AA): _____

Período menstrual: Normal Menopausa Não se aplica

Quando foi o primeiro dia do seu último período menstrual? _____

(Se a data não for conhecida aproximar para o dia 15 do mês).

RAÇA:

Branco Negro Amarelo (asiático) Pardo Índio Não sabe

NÍVEL EDUCACIONAL: (Se participante for analfabeto, favor checar TCLE testemunha).Alfabetizado Analfabeto Por quantos anos você frequentou a escola?
_____**SALÁRIO MENSAL (APROXIMADO, ANTES DA TB):**

Mais que um salário mínimo () Igual ou menor que um salário mínimo()

EXAME FÍSICO

Peso: _____ Kg Altura: _____ cm Temperatura: _____ °c

FR: _____ irpm FC: _____ bpm PA: _____ x _____ mmHg

Circunferência do braço: _____ cm Outros (especifique): _____

USO DE CIGARRO

Fuma atualmente Costumava fumar Nunca fumou

Quantos cigarros por dia (ou média) fumou ou fumava? _____

Há quantos anos você fuma ou fumou? _____

Com que idade começou a fumar? _____

Com que idade parou de fumar? _____

USO DE BEBIDA ALCOOLICA

Bebe atualmente Costumava beber Nunca bebeu

Quantos drinks alcoólicos você consumiu nos últimos 7 dias? _____

Em qual idade você começou a beber? _____

Em qual idade você parou de beber? _____

USO DE DROGAS

Usa atualmente Costumava usar Nunca usou
 Que tipo de
 drogas?
 Maconha Cocaína Crack Haxixe Ecstasy Heroína Não sabe
 Outro _____

SINTOMAS

Tosse Duração (em dias): Fadiga Perda de peso
 Sudorese noturna Falta de ar Febre
 Dor torácica Alteração na ausculta pulmonar

RADIOGRAFIA DE TÓRAX

Foi possível a realização do exame? Sim Não

Data da realização: ____/____/____

Existe alguma cavitação?	Sim	Não	Impossível de determinar pelo exame
Presença de adenopatia mediastinal?	Sim	Não	Impossível de determinar pelo exame
Presença de efusão/derrame pleural?	Sim	Não	Impossível de determinar pelo exame
Presença de opacidade/condensação?	Sim	Não	Impossível de determinar pelo exame
Presença de padrão miliar?	Sim	Não	Impossível de determinar pelo exame
Presença de calcificação e fibrose?	Sim	Não	Impossível de determinar pelo exame

RESULTADO DO QUANTIFERON

O exame foi realizado? Sim Não Não se aplica Data do teste: _____
 Indique o resultado: Positivo Negativo Indeterminado
 Concentração Nil _____ TB1Ag: _____ TB2Ag: _____ Mitógeno: _____

7.3 APÊNDICE 3: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO PROCESSAMENTO DO QTF-PLUS

	<p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</p> <p align="center">Protocolo: Protocolo: Biomarcadores para exclusão do diagnóstico de tuberculose ativa: um coorte prospectivo (Immiprint®)</p>	
<p>Título: QuantiFERON®-TB Gold-Plus - Processamento</p>		<p align="center">POP.CLIN.008</p>
<p>Emissão: 23 / 05 / 2018</p>	<p align="center">Revisão: ____ / ____ / ____</p>	<p align="center">Nº 001</p>

1. OBJETIVO

Este documento tem por objetivo descrever e normatizar as exigências de recebimento, incubação e centrifugação dos tubos de QuantiFERON®-TB Gold-Plus, seguido da obtenção das alíquotas de plasma e realização da técnica ELISA para detecção de interferon-gama (IFN- γ). O QuantiFERON®-TB Gold-Plus (QFT®-Plus) é um teste de diagnóstico *in vitro* que usa dois tubos contendo coquetel de peptídeos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10 para estimular células específicas em sangue total heparinizado (TB1 e TB2). Em paralelo, como o controle do teste, é também coletado sangue em um tubo sem estímulo (Nil) – controle negativo –, e outro tubo contendo mitógeno (Mitogen) – controle positivo. A evidência de contato com o *Mycobacterium tuberculosis* é baseada na capacidade de produção de IFN- γ por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Neste documento serão abrangidas as instruções para o recebimento das amostras no laboratório, a incubação das amostras de sangue, a obtenção das amostras de plasma destinadas ao biorrepositório, e a realização da técnica de ELISA. Em seguida, será instruída a inserção das alíquotas geradas no REDCap. A instrução referente ao tratamento dos dados obtidos será realizada em POP adjacente (POP Nº 0003 – POP QuantiFERON®-TB Gold Plus – **Análise em software e liberação de laudos**)

3. DEFINIÇÃO/SIGLAS

ELISA – Ensaio imunoenzimático

INF- γ – Interferon-gama

MITOGEN – Tubo de sangue com mitógeno (controle positivo)

NIL – Tubo de sangue sem estímulo (controle negativo)

REDCap – Research Electronic Data Capture

TB1 e TB2 – Tubos de sangue com antígenos de *M. tuberculosis*

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantiFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

4. RESPONSABILIDADES

No recebimento das amostras de sangue coletadas (tubo NIL, tubos TB1 e TB2, tubo MITOGEN), os responsáveis deverão verificar se os volumes em cada tubo estão de acordo com o padrão determinado pelo fabricante do kit. Além disso, verificar se as etiquetas foram corretamente colocadas nos tubos adequados (etiqueta de cor marrom – tubo NIL; etiqueta de cor azul claro – tubo TB1; etiqueta de cor verde clara – tubo TB2; etiqueta de cor azul escuro – tubo MITOGEN). realizar a centrifugação das amostras de acordo com as especificações definidas pelo fabricante, e realizar as alíquotas de plasma de acordo com o previsto pelo manual de laboratório do RePORT. A identificação das alíquotas, a temperatura de armazenamento, e todas as condições que sejam inerentes à qualidade de obtenção dos resultados deste teste, serão de responsabilidade do operador em cada etapa. **O responsável também deverá obedecer ao prazo para a liberação do resultado do teste: prazo máximo de 21 dias, a partir da coleta das amostras, para liberação do resultado para o paciente.**

Sendo assim, os responsáveis de cada local participante deste projeto irão implantar e cumprir com todas as normas descritas neste documento, contando ainda com o treinamento proporcionado pela empresa fornecedora do produto (Qiagen), que abrangerá todas as etapas relacionadas ao processamento do QuantiFERON-TB Gold-Plus (QFT®-Plus).

5. FLUXOGRAMA

- Processamento dos tubos QuantiFERON e ELISA (em anexo).

6. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

6.1. Processamento dos tubos QuantiFERON-TB® GOLD-Plus

Após a coleta, os tubos poderão ser acondicionados à temperatura ambiente por até 16 horas antes de serem incubados. **NÃO** refrigerar ou congelar os tubos.

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		
Página 56 de 79		

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantiFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

- a) Após o recebimento dos tubos de QuantiFERON-TB® GOLD-Plus no laboratório, deve-se verificar e anotar o volume dos mesmos no **formulário de processamento da amostra**, assim como o horário em que a coleta foi realizada;
- b) Verifique se os tubos estão devidamente identificados com etiquetas específicas: tubo NIL – etiqueta marrom, tubo TB1 – etiqueta azul claro, tubo TB2 – etiqueta verde claro, tubo MIT – etiqueta azul escuro;
- c) Homogeneíze os quatro tubos simultaneamente por 10 vezes como ilustrado na figura 1, para assegurar que toda a superfície interna dos tubos seja revestida com o sangue, solubilizando os antígenos que estão adsorvidos na parede interna do tubo.

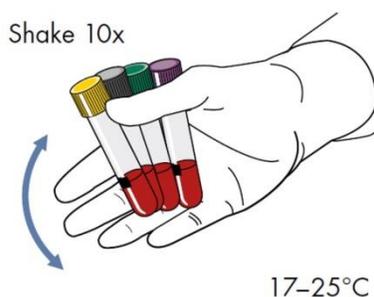


Figura 1 - Esquema demonstrativo da homogeneização correta dos quatro tubos.

ATENÇÃO: NÃO agitar os tubos energicamente, pois poderá ocorrer o rompimento ou deslocamento do gel, levando as análises a resultados aberrantes.

- d) Incubar os quatro tubos em posição vertical a 37°C por 20 horas (±1h);
- e) Após o período de incubação, centrifugue os tubos por 15 minutos a 2500xg para a separação do plasma;
- f) Incubar os quatro tubos em posição vertical a 37°C por 20 horas (±1h);

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		
Página 3 de 79		

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: Quantiferon®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

- g) Incubar os quatro tubos em posição vertical a 37°C por 20 horas (± 1 h);
- h) Após o período de incubação, centrifugue os tubos por 15 minutos a 2500xg para a separação do plasma;
- i) Retire de cada tubo seis alíquotas de 60 μ L de plasma, transferindo para microtubos do tipo Safe-lock com capacidade de 0,5mL. Estas alíquotas terão os seguintes destinos:
- 4 alíquotas de cada tubo para serem depositadas no biorrepositório. Elas devem estar com as identificações padronizadas para o estudo (etiquetas marrom/NIL, azul claro/TB1, verde claro/TB2 e azul escuro/MIT). Estas alíquotas deverão ser registradas no REDCap e armazenadas em caixas 10x10 devidamente identificadas e também registradas no REDCap (uma caixa para cada cor);
 - 2 alíquotas de cada tubo serão armazenadas no laboratório onde as amostras foram processadas, e as mesmas devem ser identificadas com a mesma ID do paciente. Estas alíquotas serão utilizadas no teste de ELISA. OBS: Se a etiqueta de final 99 para cada amostra não for utilizada para identificação de alíquotas para o biorrepositório, poderá ser utilizada para identificar uma das alíquotas do teste. Isso facilitará e garantirá a identificação correta das amostras para liberação dos resultados. O armazenamento será feito em caixas 10x10 devidamente identificadas e acondicionadas em freezer -20°C até serem utilizadas no teste.

OBS.: As amostras de plasma podem ser armazenadas durante 28 dias a temperatura de -20°C

6.2. Materiais e equipamentos necessários para processamento e teste de ELISA:

- Incubadora com temperatura controlada em 37°C (CO₂ não é necessário);
- Pipetas calibradas com volume ajustável de 10 a 1000 μ L;
- Pipetas multicanais calibradas com volume ajustável entre 50 μ L e 100 μ L

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		Página 4 de 79

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantiFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

- Ponteiras estéreis com barreira, de 20µL, 200µL e 1000µL, descartáveis;
- Centrífuga própria para os tubos QuantiFERON-TB® GOLD-Plus, com capacidade de centrifugação a pelo menos 2500xg;
- Agitador de microplacas;
- Água deionizada ou destilada, 2 litros;
- Lavadora de microplacas (lavadora automática);
- Leitora de microplacas equipada com filtro de 450nm e filtro de referência de 620 a 650nm;
- Crômetro;
- Canaletas descartáveis para soluções (tamanho para pelo menos 8 canais);
- Microtubos eppendorf descartáveis de 1,5 mL;
- Microtubos eppendorf descartáveis de 0,5mL;
- Papel toalha;
- Tubo FALCON (15mL);
- Papel alumínio;
- Kit ELISA (descrito a seguir)

6.2.1. Componentes do kit ELISA:

ITEM	QUANTIDADE
Tira de microplaca (12 x 8 poços) revestidos com anticorpo monoclonal produzido em camundongo, específico ao IFN-γ humano	2 conjuntos de tiras de microplaca de 12 unidades x 8 poços
“Human IFN-γ Standard, lyophilized” (Padrão IFN-γ humano liofilizado: contém IFN-γ humano recombinante, caseína bovina, Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (8 IU/mL quando reconstituído)
“Green Diluent” (Diluyente Verde: contém caseína bovina, soro normal de rato, Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (volume = 30mL)
“Conjugate 100x Concentrate, lyophilized” (Conjugado liofilizado, 100x concentrado: anticorpo produzido em camundongo, específico ao IFN-γ humano, e conjugado com enzima HRP. Contém Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (volume = 0,3mL quando reconstituído)

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		Página 5 de 79

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantIFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

“Wash Buffer 20x Concentrate” (Tampão de lavagem 20x concentrado: pH 7,2, contém 0,05% ProClin® 300)	1 x frasco (volume = 100mL)
“Enzyme Substrate Solution” (Solução de substrato da enzima: contém H ₂ O ₂ e cromógeno Tetrametilbenzidina 3,3', 5,5')	1 x frasco (volume = 30mL)
“Enzyme Stopping Solution” (Solução de parada de reação enzimática: contém 0,5% ProClinm 0,5M de H ₂ SO ₄) [†]	1 x frasco (volume = 15mL)

6.3. Considerações sobre o kit QuantIFERON-TB® Gold-Plus:

- Armazene os reagentes do kit entre 2 e 8°C;
- Mantenha a Solução de Substrato de Enzimas (“enzyme substrate solution”) sempre protegida de luz solar direta;
- O Padrão (“human IFN-γ standard”) e o Conjugado 100x Concentrado (“conjugate 100x concentrate”), depois de reconstituídos, podem ser guardados durante 3 meses na temperatura de 2 a 8°C. **ANOTE A DATA EM QUE O PADRÃO E O CONJUGADO FORAM RECONSTITUÍDOS;**
- O conjugado funcional (Conjugado 100x Concentrado e reconstituído + Diluente Verde) pode ser utilizado num prazo de 6h após a preparação;
- Não misture nem utilize as tiras de microplaca, o padrão INF-γ, o Diluente Verde ou o Conjugado 100x Concentrado de diferentes lotes de kits QFT;
- Os demais reagentes (Tampão de Lavagem 20x Concentrado, Solução de Substrato de Enzimas e Solução de Parada de Enzimas) podem ser trocados entre kits de lotes diferentes, contanto que estejam dentro do prazo de validade e que os detalhes do lote sejam anotados;
- O tampão de lavagem funcional (“wash buffer” - Tampão de Lavagem 20x Concentrado, depois de diluído) pode ser armazenado a temperatura ambiente durante 2 semanas;

6.4. Preparo de reagentes/condições de armazenamento/prazo de validade

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		Página 6 de 79

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantiFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

- a) O “**Human IFN- γ Standard**” (padrão IFN- γ humano) deverá ser reconstituído com o volume de água deionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco. Depois de reconstituída, a solução padrão IFN- γ poderá ser armazenada por até 3 meses em temperatura entre 2 e 8°C. Anote a data na qual o padrão foi reconstituído.
- OBS.:** O volume de reconstituição do padrão do kit será diferente de lote para lote.
- b) O “**Conjugate 100x concentrate**” (conjugado 100x concentrado) deverá ser reconstituído com 0,3mL de água deionizada ou destilada. Uma vez reconstituído, o conjugado não utilizado deve ser armazenado entre 2 e 8°C e tem que ser utilizado num prazo de 3 meses. Anote a data na qual o conjugado foi reconstituído.
- c) O “**Wash buffer 20x concentrate**” (tampão de lavagem 20x concentrado) deverá ser diluído da seguinte forma:

1 parte de tampão 20x concentrado + 19 partes de água deionizada ou destilada

O tampão poderá ser armazenado a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 semanas.

6.5. Procedimentos para IFN- γ ELISA:

6.5.1. Recomendações iniciais

- Todas as informações referentes à técnica de ELISA deverão ser registradas no **formulário específico de registro da técnica ELISA - QuantiFERON-TB Gold-Plus (QFT-Plus)**;
- Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o **conjugado 100x concentrado** (Conjugate 100x Concentrate), devem ser colocados à temperatura ambiente (22°C \pm 5°C) antes de serem utilizados. Aguarde, no mínimo, 60 minutos para alcançar o equilíbrio térmico;
- Caso não utilize todas as tiras da placa de ELISA, guarde as que não serão utilizadas na embalagem original e mantenha a 4°C.

6.5.2. Procedimento

- a) Reconstitua o padrão IFN- γ humano, segundo a recomendação do item 6.4(a);
- b) Para preparar a curva baseada em diluição seriada, siga as etapas indicadas na **Tabela 1 e Figura 2**;

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
<i>Cópia Controlada – Reprodução Proibida</i>		Página 7 de 79

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantIFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

Tabela 1: Preparação dos pontos de curva padrão em duplicata

ETAPAS PARA PREPARAÇÃO DE CADA PONTO DA CURVA EM DUPLICATA.
a) Identifique 4 microtubos novos com 1,5mL de capacidade: S1 , S2 , S3 e S4 .
b) Adicione 150µL de diluente verde (Green Diluent) nos 4 microtubos.
c) Tampe o tubo S4 .
d) Adicione 150µL de padrão IFN-γ (Human IFN-γ Standard) no tubo S1 e homogeneíze com pipeta.
e) Transfira 50µL de S1 para S2 e homogeneíze bem com pipeta.
f) Transfira 50µL de S2 para S3 e homogeneíze bem com pipeta.
OBS.: O tubo S4 permanece apenas com o diluente verde (Green Diluent) – controle zero.

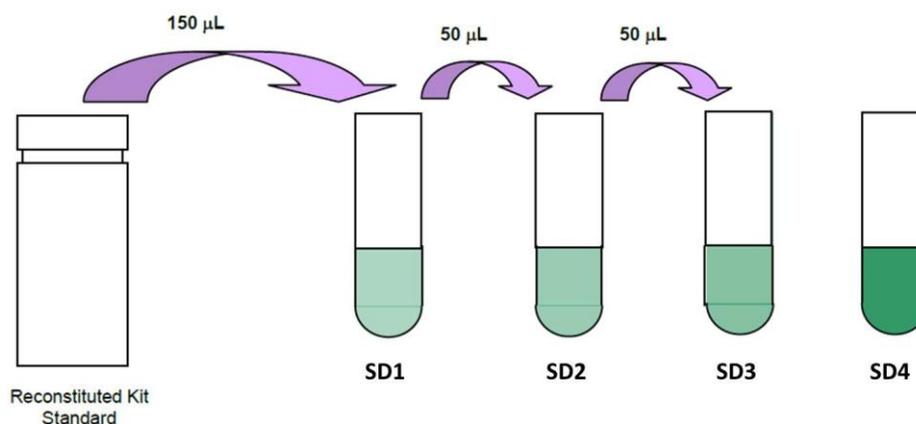


Figura 2: Esquema representativo da diluição da curva de IFN-γ recombinante considerando que cada diluição (SD1, SD2, SD3 e SD4) seja incluída na placa de ELISA em duplicata; S = SD (padrão).

- c) Ao final das diluições da curva, obteremos as seguintes concentrações de IFN-γ recombinante em cada tubo: SD1 = 4,0IU/mL; SD2 = 1,0IU/mL; SD3 = 0,25IU/mL; SD4 = 0IU/mL (zeroIU/mL);

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		Página 8 de 79

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantiFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

- d) A curva padrão deverá ter obrigatoriamente 04 pontos de diluição e no mínimo em duplicata respeitando o padrão Europeu do teste;
- e) Numere as tiras das placas para maior segurança, caso as mesmas se soltem durante o manuseio;
- f) Adicione 50µL de cada um dos pontos da curva padrão (S1, S2, S3, S4) nos poços previamente indicados (Figura 3);
- g) Adicione 50µL de cada uma das amostras de plasma nos poços previamente indicados (Figura 3);

OBS.: As amostras de plasma que foram previamente armazenadas deverão estar congeladas por no mínimo 24 horas antes do ensaio. Ao momento do ensaio, deverão estar em temperatura ambiente e serem bem homogêneas antes de serem pipetadas para os poços da placa de ELISA.

A)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	1N	3N	5N	7N	9N	11N	13N	15N	17N	19N	21N
B	S2	1T1	3T1	5T1	7T1	9T1	11T1	13T1	15T1	17T1	19T1	21T1
C	S3	1T2	3T2	5T2	7T2	9T2	11T2	13T2	15T2	17T2	19T2	21T2
D	S4	1M	3M	5M	7M	9M	11M	13M	15M	17M	19M	21M
E	S1	2N	4N	6N	8N	10N	12N	14N	16N	18N	20N	22N
F	S2	2T1	4T1	6T1	8T1	10T1	12T1	14T1	16T1	18T1	20T1	22T1
G	S3	2T2	4T2	6T2	8T2	10T2	12T2	14T2	16T2	18T2	20T2	22T2
H	S4	2M	4M	6M	8M	10M	12M	14M	16M	18M	20M	22M

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		Página 9 de 79

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO		
Título: QuantIFERON®-TB Gold-Plus - Processamento		POP 0002

B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	1N	3N	5N	7N	9N						
B	S2	1T1	3T1	5T1	7T1	9T1						
C	S3	1T2	3T2	5T2	7T2	9T2						
D	S4	1M	3M	5M	7M	9M						
E	S1	2N	4N	6N	8N	10N						
F	S2	2T1	4T1	6T1	8T1	10T1						
G	S3	2T2	4T2	6T2	8T2	10T2						
H	S4	2M	4M	6M	8M	10M						

Figura 3: Esquema de organização da curva em duplicata e das amostras em triplicata na placa de ELISA. A) Esquema para placa inteira; B) Esquema para meia placa.

Exemplo

1N = Amostra 1, plasma de Nil;

1T1 = Amostra 1, plasma de Anti TB1;

1T2 = Amostra 1, plasma Anti TB2;

1M = Amostra 1. plasma de Mitógeno)

- h) O conjugado funcional é preparado diluindo a quantidade necessária de conjugado 100x concentrado (Conjugate 100x Concentrate), já reconstituído, em diluente verde (Green Diluent) conforme estabelecido na **Tabela 2**;

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		Página 10 de 79

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantIFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

Tabela 2: Preparação do conjugado

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

- a) Homogeneíze bem e com cuidado para não formar espuma, e coloque o conjugado funcional em uma canaleta;
OBS.: Volte a armazenar o Conjugado 100x Concentrado não utilizado entre 2 a 8°C.
- b) Utilizando micropipeta multicanal, adicione 50µL de conjugado funcional recém preparado aos poços ELISA que contém as amostras;
OBS.: - Atenção para o tempo em que se leva para adicionar o conjugado funcional. Procurar não demorar entre as carreiras de poços.
- Atenção para não formar bolhas nos poços. Caso tenham sido formadas, utilizar agulha de seringa descartável para desfazê-las (uma agulha para cada poço com bolhas);
OBS.: **NÃO** toque com a ponta da agulha no fundo do poço.
- c) Misture bem o conjugado e os padrões/amostras de plasma utilizando agitador de microplacas por 1 minuto (veloc. 500-1000rpm);

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		Página 11 de 79

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantIFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

- d) Cubra a placa, coloque em local protegido de luz (com auxílio de papel alumínio) e de trepidações, e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 2 horas (± 5 minutos);
- e) Durante a incubação, dilua o tampão de lavagem 20x concentrado, seguindo a recomendação do item 6.4 (c);
- f) Após a incubação, lave a placa 6 vezes com tampão de lavagem 1x concentrado. Utilize a lavadora de placa automática, ajustada para 6 ciclos de lavagem, utilizando $400\mu\text{L}$ de tampão em cada poço. Uma lavagem exaustiva é muito importante para o desempenho do ensaio. Certifique-se de que cada poço está completamente cheio com o tampão de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo.
- g) Ao término das lavagens, bata as placas viradas para baixo sobre algumas folhas de papel toalha para remover o tampão de lavagem residual;
- h) Adicione $100\mu\text{L}$ de solução de substrato de enzima (enzyme substrate solution) em cada poço (evitando a formação de bolhas) com auxílio de micropipeta multicanal, e misture bem utilizando agitador de microplacas por 1 minuto (veloc. 500-1000rpm);
- OBS.:** Se houver formação de bolhas nos poços, utilize agulha de seringa estéril e descartável para desfazê-las, com o cuidado de usar uma agulha para cada poço. **NÃO** toque com a ponta da agulha no fundo do poço.
- i) Cubra a placa, coloque em local protegido de luz e de trepidações e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos (± 5 minutos);
- j) Durante o período de incubação:
- i. Ligue a leitora de ELISA e ajuste os parâmetros para leitura da placa logo após o término da reação: leitura com filtro 450nm e filtro de referência de 620 a 650nm;
 - ii. No programa de leitura do computador, monte o mapa da placa que será lida;

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		Página 12 de 79

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantiFERON®-TB Gold-Plus - Processamento	POP 0002

- k) Após os 30 minutos de incubação, adicione 50µL de solução de parada de enzimas (enzyme stopping solution) em cada poço com auxílio de micropipeta multicanal, evitando formação de bolhas, e homogeneíze colocando a placa no agitador de placas por 1 minuto (veloc. 500-1000rpm);
A solução de parada de enzimas deverá ser adicionada aos poços na mesma ordem e velocidade em que o substrato foi adicionado.
- l) Realize a leitura no leitor de ELISA num período máximo de 5 minutos a contar da adição da solução de parada de enzimas.
OBS.: A leitora de ELISA deve estar previamente programada (item 6.5.2, letra r).
- m) Imprima os valores obtido de densidade ótica. Estes valores serão usados para calcular os resultados do teste. Reserve os dados para a inserção no Software QuantiFERON-TB® Gold-Plus (Vers. 2.71) para análise. Os dados impressos deverão ser digitalizados e registrados em livro de protocolo.

IMPORTANTE: O descarte das tiras da placa, frascos utilizados para diluição, e recipientes utilizados para pipetagem contendo resíduos químicos (substrato e solução de parada), deverá ser realizado em lixo adequado para resíduos químicos, com a devida identificação do local, data, operador e os tipos de resíduos descartados.

7. REFERÊNCIAS

- http://www.quantiferon.com/irm/PDF/1675_0/Portuguese_QFTPlus_ELISA_R04_022016
- <http://www.quantiferon.com/irm/company/showpage.aspx/PDFs/1628-95883375/AnalysisSoftwareInstructions>

ELABORAÇÃO FMT-HVD	ANÁLISE CRÍTICA FMT-HVD	APROVAÇÃO FMT-HVD
Amanda Araújo	Alexandra Brito de Souza	Allyson Guimarães
Cópia Controlada – Reprodução Proibida		
Página 13 de 79		

APÊNDICE 4 – CARTA DE ANUÊNCIA DO PROJETO



GOVERNO DO ESTADO DO
AMAZONAS

SOLICITAÇÃO DE ANUÊNCIA

Para: *Dr. Wuelton Marcelo Monteiro*
Diretoria de Ensino e Pesquisa FMT/HVD

Manaus, 30 de novembro de 2017

Senhor Dr. Wuelton Marcelo Monteiro, Diretor de Ensino e Pesquisa FMT/HVD,

Eu *Marcelo Cordeiro dos Santos*, pesquisador responsável pelo estudo intitulado “**Novo teste diagnóstico para descartar o diagnóstico de tuberculose**”, venho solicitar a Vossa Senhoria ANUÊNCIA para executar a pesquisa, junto à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, na Gerência de Tuberculose; conforme descrito no protocolo em anexo. Na expectativa de um pronunciamento favorável, antecipadamente agradeço.

Atenciosamente,

Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos (Pesquisador Responsável)

Termo de Anuência

Considerando que esta instituição possui condições de atender à solicitação da pesquisadora, minha manifestação é pelo DEFERIMENTO, desde que se cumpram todos os requisitos éticos para a realização da pesquisa em tela.

Manaus, 30 de novembro de 2017

Dr. Wuelton Marcelo Monteiro
Diretoria de Ensino e Pesquisa FMT/HVD

Avenida Pedro Teixeira Nº 25, Bairro D. Pedro
CEP: 69.040-000 - Manaus - Amazonas, Brasil
FONE (92) 2127-3436 / PABX (92) 2127-3555
E-mail: assessoratecnica@fmt.am.gov.br



FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL
DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Secretaria de
Estado da Saúde