



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

ROGÉRIO REIS CONCEIÇÃO

**AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE *IN VITRO* DE ANTÍGENOS
SECRETADOS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* EM
AMOSTRAS DE SANGUE DE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR
ATIVA**

Salvador, BA

2017

ROGÉRIO REIS CONCEIÇÃO

**AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE *IN VITRO* DE ANTÍGENOS
SECRETADOS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* EM
AMOSTRAS DE SANGUE DE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR
ATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Profa. Dra. Songelí Menezes Freire

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer
Nascimento

Salvador, BA

2017

Ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA

R375 Reis, Rogério
 AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE *IN VITRO* DE
ANTÍGENOS SECRETADOS DE *CORYNEBACTERIUM*
PSEUDOTUBERCULOSIS EM AMOSTRAS DE SANGUE DE INDIVÍDUOS
COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA / Rogério Reis Conceição. --
Salvador - BA, 2017.
69 f. : Il

Orientadora: Songelí Menezes Freire.

Coorientadora: Roberto José Meyer Nascimento.

(Mestrado - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA) -- Universidade Federal da Bahia, INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE, 2017.

1. Imunoreatividade. 2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 3.
Tuberculose. I. Freire, Songelí Menezes. II. Meyer, Roberto. III. Universidade
Federal da Bahia. IV. Título.

CDU - 616.428-002

Dedico este trabalho à minha mãe, Tereza de Jesus Reis Conceição e à minha avó, Maria José Reis Conceição pelo apoio necessário à minha formação pessoal e acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por todo amor, discernimento, sabedoria e paz.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe, Tereza e minha avó, Maria José por todo amor, zelo e apoio em todos os momentos. Ao meu sobrinho e afilhado, Thiago, motivador de todos os meus esforços.

À minha orientadora Prof. Songelí por todo carinho, ensinamentos, paciência, dedicação e confiança ao longo de todos esses anos.

Aos amigos, que muitas vezes entenderam e respeitaram a minha ausência em muitos momentos.

À Victor, por todo apoio e motivação na reta final deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Labimuno, em especial a minhas filhas (Samanta, Zunara e Mariana), Dona Chica, Eula, Evelin, Silvânia, Ramon, Caio, Marcos, Zilda, Luciane, Manoel, Mário, Zé, Fulvia, Profa Lília e Rafaela pela ajuda ao longo dessa jornada.

Aos funcionários do LABIMUNO e ao seu coordenador Prof. Roberto Meyer, por permitir a realização deste estudo e pelo suporte financeiro e técnico.

Agradeço aos estudantes de iniciação científica, em especial a Hévlyn, por toda ajuda.

À Universidade Federal da Bahia a qual tenho orgulho de fazer parte. A todos os meus professores por contribuírem para minha formação acadêmica;

Aos participantes voluntários envolvidos nesta pesquisa, sem os quais este trabalho não seria possível.

Àqueles (as) cujos nomes involuntariamente não foram citados.

"Para mim, essas pessoas que vão sorrindo pela vida afora, entenderam tudo."

Autor desconhecido

RESUMO

A tuberculose (TB), causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) descoberto por Robert Koch, em 1882, é uma doença infectocontagiosa que acomete, principalmente, os pulmões. Apesar da TB ser uma doença milenar, continua sendo grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo. Algumas biomoléculas podem ser compartilhadas por diferentes agentes biológicos, como o *M. tuberculosis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*), que podem ser usadas em modelos de estudos por reação cruzada, para avaliação de resposta imune e testes diagnósticos. Adicionalmente, pela semelhança entre alguns fatores de virulência/patogenicidade dessas bactérias, confirmados por análise de bioinformática, objetivou-se usar extratos de cepas de *C. pseudotuberculosis* semi-purificados para investigar sua capacidade antigênica *in vitro*, no modelo proposto com amostras de indivíduos com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa ICS-UFBA (CAAE 57662016.8.1001.5662) e todos os indivíduos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Participantes voluntários do atendimento do Hospital Especializado de doenças pulmonares da Bahia, com diagnóstico de TB e sem tratamento (n=35) e participantes adultos, sem queixa, sem história ou sintomatologia de TB ou de infecção por *M. tuberculosis* (n=35). Com o sangue heparinizado, após leucograma, procedeu-se o estímulo em placa, utilizando-se mitógeno (PWM), e antígenos de extrato protéico de *C. pseudotuberculosis* (cepas PAT-10, VD57 e FRC-41). Para a dosagem das citocinas utilizou-se o BD *Cytometric Bead Array* (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit e o BD™ CBA Human IP-10 Flex kit. As análises foram feitas no software FCAPArray™. Os extratos das cepas PAT10, VD57 e FRC41, induziram a produção das citocinas estudadas nas amostras de sangue nos grupos estudados. Além disso, diferenciaram os grupos de estudo quando comparados com a concentração de IFN- γ e IP-10, sob estímulo com PAT10; IFN- γ , IL-2 e IL-6, sob estímulo com VD57 e IP-10 e IL-4, sob estímulo com FRC41. Os extratos das cepas PAT10, VD57 e FRC41 de *C. pseudotuberculosis* semi-purificados induzem a produção de IFN- γ , IP-10, TNF, IL-2, IL-6 e IL-10 nas amostras de sangue de indivíduos infectados com *M. tuberculosis*. Sob o estímulo dos extratos utilizados, a detecção de IFN- γ e IP-10, diferencia os grupos controle e TB ativa.

PALAVRAS-CHAVE: Tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Citocinas.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), that was discovered by Robert Koch in 1882, is an infectious disease that mainly affects the lungs. Although TB is a millennial disease, it remains a serious public health problem in several regions of the world. Biomolecules can be shared by different biological agents, such as *M. tuberculosis* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*), which can be used in cross-reactive studies, for the evaluation of immune response and diagnostic tests. Additionally, by means of some virulence/pathogenicity factors, confirmed by bioinformatics analysis, it was objectified using extracts of semi-purified *C. pseudotuberculosis* strains to investigate their antigenic capacity in vitro, in a proposed model with samples of patients with diagnosis of active pulmonary tuberculosis. This study was approved by the Research Ethics Committee ICS-UFBA (CAAE 57662016.8.1001.5662) and all participants signed a Free and Informed Consent Term. Voluntary participants of the Hospital of the Specialized Hospital of pulmonary diseases of Bahia, with diagnosis of TB and without treatment (n = 35) and participants adults, without complains, no history or symptomatology of TB or of *M. tuberculosis* infection (n = 35). With heparinized blood, after leukogram, the plate stimulation was carried out using mitogen (PWM), *C. pseudotuberculosis* protein extract antigens (PAT-10, VD57 and FRC-41 strains). For a dosage of the cytokines were use BD Cytometric Bead Array (CBA) Th1 / Th2 / Th17 Cytokine Kit and the BD TM CBA Human IP-10 Flex kit. Analyzes were performed with FCAPArrayTM software. Extract antigens PAT-10, VD57 and FRC-41 strains induced the production of the cytokines in the blood samples in the studied groups. In addition, they differentiated the study groups when compared to IFN- γ and IP-10, under stimulation with PAT10; IFN- γ , IL-2 and IL-6, under stimulation with VD57 and IP-10 and IL-4, under stimulation with FRC41. The extracts from *C. pseudotuberculosis* strains PAT10, VD57 and FRC41 induce the production of IFN- γ , IP-10, TNF, IL-2, IL-6 and IL-10 in blood samples from individuals infected with *M. tuberculosis*. Under the stimulus of the extracts used, the detection of IFN- γ and IP-10 differentiates the control and active TB groups.

Keywords: Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Cytokines

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características epidemiológicas da população estudada.....	40
Tabela 2: Dados laboratoriais da população estudada.....	41
Tabela 3: Medianas da produção de citocinas pós-estímulos com extratos <i>de C. pseudotuberculosis</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa da incidência de TB ativa no mundo	17
Figura 2: O espectro da TB - da infecção por <i>M. tuberculosis</i> à doença de TB pulmonar ativa.....	20
Figura 3: Representação do desenvolvimento do granuloma na Tuberculose humana	22
Figura 4: Panorama geral da resposta imune desenvolvida contra o <i>M. tuberculosis</i>	26
Figura 5: Produção de IFN- γ em sangue estimulado por 24 horas com os antígenos de <i>C. pseudotuberculosis</i>	43
Figura 6: Produção de IP-10 em sangue estimulado por 24 horas com os antígenos de <i>C. pseudotuberculosis</i>	44

LISTA DE ABREVIACOES

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC – Células apresentadoras de antígenos
BAAR - Bacilos lcool-cido Resistentes
BK – Bacilo de Koch
BCG - Bacilo Calmette-Guérin
BHI - *Brain Heart Infusion*
C. pseudotuberculosis - *Corynebacterium pseudotuberculosis*
CBA - *Cytometric Bead Array*
CD – Cluster of Differentiation (grupo de diferenciação celular)
Células NK - Células natural *killer*
CMRN - *Corynebacterium, Mycobacterium, Rhodococcus, Nocardia*
DC – Célula Dendrítica
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ - Interferon-gama
IGRA - Ensaio de liberação do IFN- γ
IL-10 - Interleucina 10
IL-12 - Interleucina 12
IL-18 - Interleucina 18
IL-8 - Interleucina 8
IL-4 - Interleucina 4
IL-5 - Interleucina 5
IL-6 - Interleucina 6
IL-23 - Interleucina 23
IL-27 - Interleucina 27
IP-10 - Proteína 10 induzida por IFN- γ
LNDs – Linfonodos drenantes
LT - Linfócitos T
LB – Linfócitos B
MAIT – Células T invariantes associadas a mucosa
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
M. tuberculosis - *Mycobacterium tuberculosis*

NB-2 - Nível de biossegurança 2
NB-3 - Nível de biossegurança 3
NO – Óxido nítrico
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos
PPD - Derivado protéico purificado
PWM - *Pokeweed*
RD-1 - Região de diferenciação 1
RNI - Reativos intermediários de nitrogênio
RNO - Reativos intermediários de oxigênio
Sinan – Sistema de Informações de Agravos de Notificação
TB - Tuberculose
TCT - Teste cutâneo tuberculínico
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
TLRs - Receptores do tipo *Toll*
TNF - Fator de necrose tumoral
TPP - *Three-phase partitioning*
TRM - Teste rápido molecular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Breve histórico da Tuberculose	16
2.2 Agente etiológico.....	16
2.3 Epidemiologia.....	17
2.4 Transmissão	20
2.5 Manifestações clínicas	20
2.6 Resposta Imunológica.....	21
Resposta Imune Inata.....	23
Resposta Imune adaptativa	25
2.7 Diagnóstico	27
2.7.1 Teste cutâneo tuberculínico (TCT).....	28
2.7.2 Ensaio de Liberação do IFN- γ (IGRA).....	29
2.7.3 Radiografia do tórax – RX	30
2.7.4 Baciloscopia	30
2.7.5 Cultura	31
2.7.6 Diagnóstico molecular.....	31
2.8 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e sua correlação filogenética com <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	32
HIPÓTESES	34
3. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo geral	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: (Moléculas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> com antigenicidade cruzada identificada pela resposta imune celular <i>in vitro</i> em amostra de sangue de pacientes com tuberculose ativa)	36
4. CONCLUSÃO GERAL	55
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	62
APÊNDICES	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

A tuberculose (TB), causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) descoberto do Robert Koch, em 1882, é uma doença infectocontagiosa que acomete, principalmente, os pulmões (DANIEL, 2006). Apesar da TB ser uma doença milenar, continua sendo grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que 10,4 milhões de pessoas tiveram tuberculose no mundo em 2015, e mais de 1 milhão morreram por conta da doença. No Brasil, foram diagnosticados e registrados 66.796 casos novos e 12.809 casos de retratamento de tuberculose em 2016, apresentando coeficiente de incidência 32,4/100 mil habitantes (BRASIL, 2017).

A infecção por *M. tuberculosis* é mais comumente adquirida através da inalação de gotículas contendo o bacilo, que são expelidas através da fala, tosse ou espirros por indivíduos infectados na fase ativa da doença (WEELS et al, 1941). O diagnóstico da infecção por *M. tuberculosis* deve ser feito clinicamente e por métodos de triagem, que, quando sugestivo, devem ser confirmados por métodos laboratoriais, com identificação do agente, por exemplo microscopia de escarro e testes moleculares. (WHO, 2016).

Em um país de alta taxa de incidência como o Brasil, apesar dos recursos tecnológicos atuais usados no controle da tuberculose, faz-se necessário buscar estratégias inovadoras referentes a métodos de diagnóstico e de imunoprofilaxia, que visem o diagnóstico precoce dos casos de TB e seu efetivo tratamento, visto que um diagnóstico rápido e seguro, acompanhado de tratamento precoce, são medidas fundamentais para quebrar a cadeia de transmissão e controlar a tuberculose (PEREIRA et al., 2016)

Na área científica diversas pesquisas são realizadas para a obtenção de reagentes que compõem os kits de diagnóstico laboratorial, e, para tanto, precisa-se de moléculas (antígenos) dos agentes infecciosos para a avaliação da resposta do hospedeiro em modelos *in vivo* ou *in vitro* (SILVA, 2015). Algumas biomoléculas podem ser compartilhadas por diferentes agentes biológicos, como o *M. tuberculosis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*), que podem ser usadas em modelos de estudos por reação cruzada, para avaliação de resposta imune e testes diagnósticos (DORELLA et al., 2009).

A infecção por *C. pseudotuberculosis* que compromete linfonodos superficiais e profundos, com um curso da infecção que pode envolver órgãos respiratórios em caprinos e ovinos,

apresenta um modelo infeccioso semelhante ao da tuberculose humana (DORELLA et al., 2006). Adicionalmente, pela semelhança entres alguns fatores de virulência/patogenicidade dessas bactérias, objetivou-se usar extratos de cepas de *C. pseudotuberculosis* semi-purificados para investigar sua capacidade antigênica *in vitro* no modelo proposto com amostras de indivíduos com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve histórico da Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença antiga que apresenta existência comprovada desde os tempos pré-históricos com diferentes denominações (DANIEL, 2006). A história no Brasil inicia-se com a vinda de jesuítas e colonos tuberculosos durante a colonização, eles acreditavam que as condições climáticas do novo continente seriam favoráveis à cura da tísica (TB). Devido ao seu caráter infeccioso, a TB foi disseminada rapidamente e se tornou uma epidemia (DUCATI, 2006).

Em 1882, o bacteriologista alemão Robert Koch, identificou o agente etiológico da TB, bactéria *M. tuberculosis*, também conhecida como Bacilo de Koch (BK) em homenagem ao seu descobridor (ROSEMBERG, 1999).

A vacina contra a TB foi produzida em 1908 pelos cientistas Albert Calmette e Camille Guérin, a partir de culturas vivas atenuadas de uma cepa isolada do complexo *Mycobacterium*, denominada de Bacilo Calmette-Guérin, referida como “BCG”. Em 1921 foi aplicada pela primeira vez em crianças. A partir da década de 1940 houve a descoberta da quimioterapia antibiótica específica para TB, que alterou o perfil epidemiológico da doença no mundo (ROSEMBERG, 1999).

2.2 Agente etiológico

As micobactérias que acometem o homem e causam a TB pertencem ao Complexo *M. tuberculosis*, é composto pelo *M. tuberculosis*, responsável por 98% dos casos de tuberculose humana, *M. bovis*, *M. bovis-Bacille Calmett-Guérin* (BCG), *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. canettii*. Pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, sub-ordem Corynebacteriaceae, ordem Actinomycetales (BROSCH et al., 2002; ARNOLD, 2006).

Morfologicamente, as micobactérias são micro-organismos que se apresentam em forma bacilar reto ou ligeiramente curvo, cuja dimensão varia de 0,2 a 0,6 micrômetros de largura

por 1 a 10 micrômetros de comprimento, aeróbios ou microaerófilos, imóveis, não esporulado e não encapsulado. São classificados como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), devido a capacidade da bactéria resistir a descoloração da fuccina fenicada, que, por ação do calor, entra na célula, não descorando, mesmo após a lavagem com uma solução de álcool-ácido, durante os procedimentos do método de coloração no laboratório. Os mecanismos de virulência e patogenia do *M. tuberculosis* estão relacionadas com características estruturais e fisiológicas do bacilo. A estrutura da parede celular que possui alto teor de ácido micólico, ácidos graxos de longa cadeia entrecruzada e outros lipídeos, confere ao *M. tuberculosis* resistência a agentes antimicrobianos, ao ataque de lisozimas e impede o acesso a substâncias hidrofílicas. O tempo de multiplicação é variável dentro do gênero, mas geralmente é lento. As colônias de *M. tuberculosis* apresentam aspecto rugoso, não pigmentado e cor camurça em meio de Löwenstein-Jensen, Middlebrook ou Ogawa-Kudov. (GOROCICA et al., 2005; PAI, et al., 2016).

2.3 Epidemiologia

A TB faz parte do grupo das doenças negligenciadas que afetam as populações com menores condições socioeconômicas, como hanseníase e a leishmaniose. Essas doenças não despertam interesse das indústrias farmacêuticas devido o baixo retorno lucrativo (DIAS, 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2014, estima-se que 9,6 milhões de pessoas desenvolveram TB ativa, dos quais 1,5 milhões morreram. A TB é heterogeneamente distribuída no mundo (Figura 1). Por exemplo, a incidência da TB na África do Sul, 834 casos por 100.000 habitantes (834/100 mil hab.) por ano, é 278 vezes maior do que nos Estados Unidos, 3/100 mil hab. (WHO, 2015). No mundo, 10,4 milhões de pessoas tiveram TB em 2015, e mais de 1 milhão morreram por conta da doença. Esses resultados configuram a TB como um grave problema de saúde pública. A OMS reconhece a TB como a doença infecciosa de maior mortalidade no mundo, superando a AIDS e a malária juntas (BRASIL, 2017).

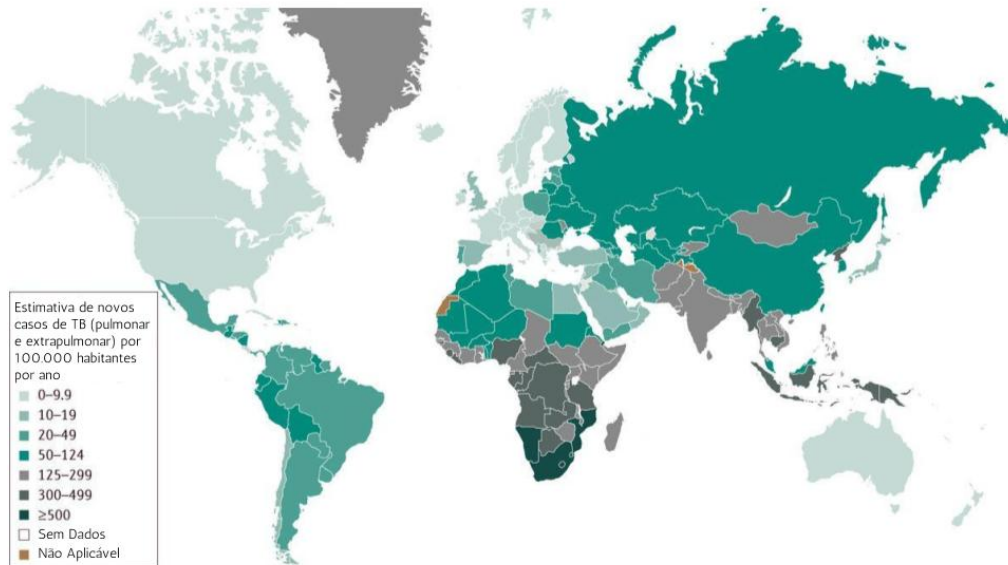


Figura 1. Estimativa da incidência de TB ativa no mundo. Os países de alta renda (exemplos, a maioria dos países da Europa Ocidental, Canadá, Estados Unidos e Austrália) têm as menores taxas de TB ativa (<10/100 mil hab. por ano). Em contrapartida, os países de baixa renda têm taxas mais elevadas. **Fonte:** Adaptado de PAI, et al., 2016.

Em 2014, durante a Assembleia Mundial de Saúde, foi aprovada uma nova estratégia global pelo fim TB (“Um mundo livre da tuberculose”), como metas que visam acabar com a doença como um problema de saúde pública até o ano de 2035. A partir disso, no Brasil iniciou-se a construção do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose coordenado pelo Ministério da Saúde, que estabelece estratégias com o objetivo de acabar com a TB como problema de saúde pública no país até o ano de 2035 (BRASIL, 2017).

No Brasil, a TB é uma doença de notificação compulsória desde a década de 1970 por meio do Decreto nº 78.231/1976. Entretanto a uniformidade na coleta, transmissão e disseminação de dados da TB em todo o território nacional se deu a partir da década de 1990, com o desenvolvimento do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). Além da notificação, o Sinan incorpora dados sobre a investigação e acompanhamento do caso até o seu desfecho, sendo desde então a principal fonte de dados epidemiológicos da TB nas instâncias federal, estadual e municipal (LAGUARDIA et al., 2004).

Em 2016, conforme dados do Sinan, foram diagnosticados e registrados 66.796 casos novos e 12.809 casos de retratamento de tuberculose no Brasil. O coeficiente de incidência da doença apresentou uma variação média anual de -1,7%, no período de 2007 a 2016, passando de 37,9/100 mil habitantes (mil hab.) em 2007 para 32,4/100 mil hab. em 2016. Contudo a meta para eliminação da TB como problema de saúde pública no país é de <10 casos para cada 100 mil hab. (BRASIL, 2017).

Entre as Unidades da Federação do Brasil, existe uma elevada variabilidade quanto ao risco de doença por TB. Em 2016, o menor risco foi registrado no Distrito Federal (10,5/100 mil hab.) e o maior no Amazonas (67,2/100 mil hab.). Na Bahia, o número foi de 26,1/100 mil hab. No mesmo ano, os novos casos de retratamentos registrados, totalizaram 24.703 casos. As capitais, de forma semelhante à distribuição do risco de adoecimento entre as UF, apresentam riscos heterogêneos. Em Salvador, foram totalizados 49,7 casos por 100 mil hab. (BRASIL, 2017).

O coeficiente de mortalidade por TB no país apresentou redução no período de 2006 a 2015, passando de 2,6/100 mil hab. para 2,2/100 mil hab. Apesar dessa redução, o Brasil ainda registrou 4.543 óbitos por TB. Na Bahia, também nesse mesmo ano, foi registrado o número de 2,5/100 mil hab. No que se refere às capitais, os municípios que apresentaram os maiores riscos de morte por TB foram Recife/PE (7,7/100 mil hab.), Rio de Janeiro/RJ (6,2/100 mil hab.), Belém/PA (5,1/100 mil hab.) e Salvador/BA (4,0/100 mil hab.) (BRASIL, 2017).

No Brasil, em 2016, 73,2% dos casos novos de tuberculose foram testados para o HIV. A testagem para o HIV em todos os pacientes com tuberculose é uma importante estratégia para identificação oportuna da coinfeção, o que pode possibilitar a introdução precoce da terapia antirretroviral, que reduz a mortalidade nesse grupo mais vulnerável (BRASIL, 2017).

O óbito por essa doença indica uma fragilidade na assistência aos pacientes pelo serviço de saúde, visto que, quanto diagnosticada e tratada, a TB tem cura. A ausência do rápido diagnóstico e, conseqüentemente do tratamento é preocupante não somente para o indivíduo, mas para a sua família e a comunidade devido à forma de transmissibilidade (BRASIL, 2017).

2.4 Transmissão

A transmissão da TB é feita através de indivíduo adulto bacilífero, normalmente com a forma pulmonar da doença, o qual elimina bacilos para o ambiente através de gotículas de saliva (ROM; GARAY, 1995). Essas gotículas podem permanecer em suspensão por vários dias, em condições favoráveis, e uma vez aspiradas, as partículas infectantes maiores são retidas pelo sistema mucociliar da mucosa respiratória, sendo removidas dos brônquios, deglutidas e eliminadas pelas fezes. Por outro lado, as partículas menores, com cerca de 1 a 5 µm de diâmetro, podem alcançar os pulmões (BARROSO, 2002).

Os adultos infectados com mais de 5.000 bacilos/mL no escarro têm grande capacidade de transmissão da TB. A chance de adquirir a infecção aumenta em famílias de baixa renda, que moram em casas mal ventiladas e pequenas e que têm pelo menos um adulto tuberculoso no seu convívio (BARROSO, 2002). As crianças não são capazes de transmitir a infecção tuberculosa, por apresentarem poucos bacilos (paucibacilares) e possuem dificuldade de expectoração, contudo são consideradas como “reservatórios” do bacilo em estado de latência. (MACIEL et al., 2006).

2.5 Manifestações clínicas

A TB é uma doença que acomete vários órgãos, principalmente, os pulmões que servem como porta de entrada da doença (BOMBARDA et al., 2001). A TB pode se apresentar como um espectro dinâmico, desde a infecção assintomática até uma doença que ameaça a vida (Figura 2). Quando o indivíduo entra em contato com o *M. tuberculosis*, pode ocorrer um dos três eventos. O hospedeiro elimina a infecção pelos mecanismos do sistema imune inato e/ou adquirido (infecção eliminada); o *M. tuberculosis* pode entrar em estado de latência e sobreviver no interior no organismo humano durante anos sem se dividir (infecção latente), um estado assintomático e não transmissível, acontece quando o sistema imune do hospedeiro é capaz de controlar, mas não de eliminar a infecção; ou o desenvolvimento da doença ativa, estado transmissível, que aparece quando há um desequilíbrio da relação parasita-hospedeiro, frequentemente desenvolvida pela reativação de uma infecção antiga (LAPA E SILVA.; BOECHAT, 2004; AHMAD, 2011).

Os pacientes com doença de TB ativa apresentam sintomas gerais, como febre, fadiga, falta de apetite e perda de peso, e aqueles com doença pulmonar podem ter tosse persistente e hemoptise (tosse de sangue) em doenças avançadas. No entanto, alguns pacientes com doença ativa e diagnóstico positivo podem ser assintomáticos e são melhor descritos como tendo TB subclínica (Figura 2). Indivíduos com TB subclínica ou ativa devem seguir os regimes de tratamento recomendados (KAUFMANN, 2002; PAI, et al., 2016).

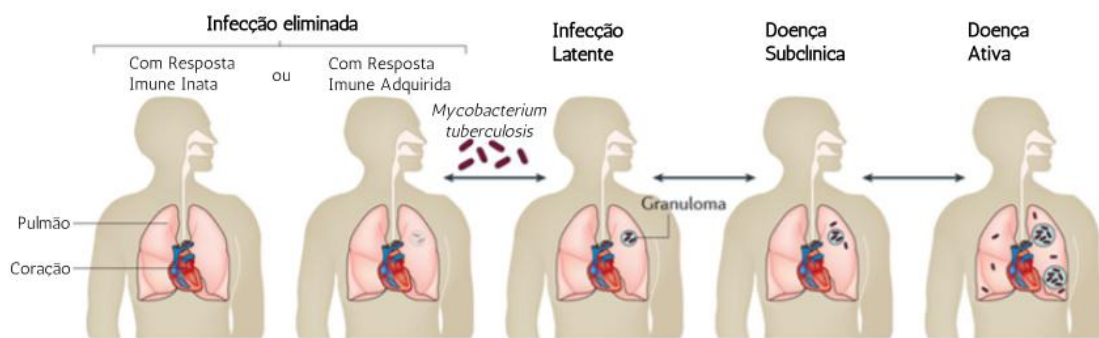


Figura 2. O espectro da TB - da infecção por *M. tuberculosis* à doença de TB pulmonar ativa. **Fonte:** Adaptado de PAI, et al., 2016.

2.6 Resposta Imunológica

Ao ser inalado pelo hospedeiro o *M. tuberculosis* tem preferência para se instalar na porção inferior dos pulmões, por se tratar de um sítio rico em oxigênio, assim a resposta imunológica nestes locais se torna importante para prevenção e eliminação deste agente patogênico. Após a inalação do bacilo, as barreiras físicas são os mecanismos iniciais da resistência inespecífica. No entanto, esse sistema de defesa pode não ser eficiente e os bacilos podem atingir os alvéolos pulmonares e a infecção tuberculosa tem início. (PAI et al., 2016). A resposta imunológica do hospedeiro e as características intrínsecas do bacilo vão determinar a probabilidade da infecção evoluir para TB doença (Figura 3).

Os primeiros componentes do sistema imunológico que entram em contato com os bacilos são os macrófagos alveolares residentes, responsáveis por reconhecerem e fagocitarem o *M. tuberculosis*. Diversos mecanismos do sistema imune inato acontecem até a chegada de células apresentadoras de antígenos (APC) como macrófagos e as células dendríticas (DC) até os linfonodos drenantes (LNDs), onde ocorre a ativação e o recrutamento ao parênquima pulmonar de linfócitos, os quais são parte do sistema imune adaptativo. Se esta primeira linha

de defesa não consegue eliminar o *M. tuberculosis*, os bacilos migram para o parênquima pulmonar (PAI et al., 2016). Na tentativa de limitar a replicação bacteriana, os linfócitos (LT) e outras células formam o granuloma tuberculoso, que consiste de um acúmulo de células inflamatórias ao redor do micro-organismo (Figura 3a), esse ambiente é caracterizado por apresentar baixo pH, baixa quantidade de oxigênio e limitação de nutrientes o que garante a diminuição do crescimento bacteriano e a estabilização do estado de latência. O bacilo pode sobreviver no interior do granuloma por vários anos, servindo como um reservatório de infecção (HAMMAD, 2013).

A formação do granuloma é essencial para conter a infecção pelo *M. tuberculosis*, funcionando como uma barreira que delimita o sítio de infecção (O’GARRA et al., 2013). A produção de citocinas e a ação de células do sistema imunológico dentro do granuloma são importantes na tentativa de eliminar a infecção, contudo o bacilo utiliza estratégias para escapar desses mecanismos de defesa (indução da secreção de ESX-1), como a permanência dentro do fagossomo, que tende a não se fundir com os lisossomos, assim, não formando o fagolisossomo entre outros fatores não completamente elucidados (KAUFMANN, 2002; PAI et al., 2016).

A probabilidade da infecção evoluir para TB doença depende dos mecanismos envolvendo a integridade do sistema imunológico, relação entre macrófagos e LT, virulência da cepa infectante, concentração do bacilo inalado, fatores genéticos, ou induzidos pela própria micobactéria como mecanismo de escape, têm papel importante na patogenia da TB. A imunodepressão, seja devido ao precário estado de saúde do indivíduo, infecção pelo HIV ou uso de drogas imunossupressoras, são as causas mais frequentes da multiplicação de bacilos contidos no granuloma e reativação da TB (TEIXEIRA et al. 2007).

Se a carga bacteriana se tornar muito elevada, o granuloma deixará de conter a infecção e os bacilos se disseminarão eventualmente para outros órgãos, incluindo o cérebro. Nesta fase, o *M. tuberculosis* pode entrar na corrente sanguínea ou voltar a entrar no trato respiratório para ser liberado (Figura 3b). Agora, o hospedeiro infectado passa a ser sintomático e transmissor, e é dito ter doença de TB ativa (PAI et al., 2016).

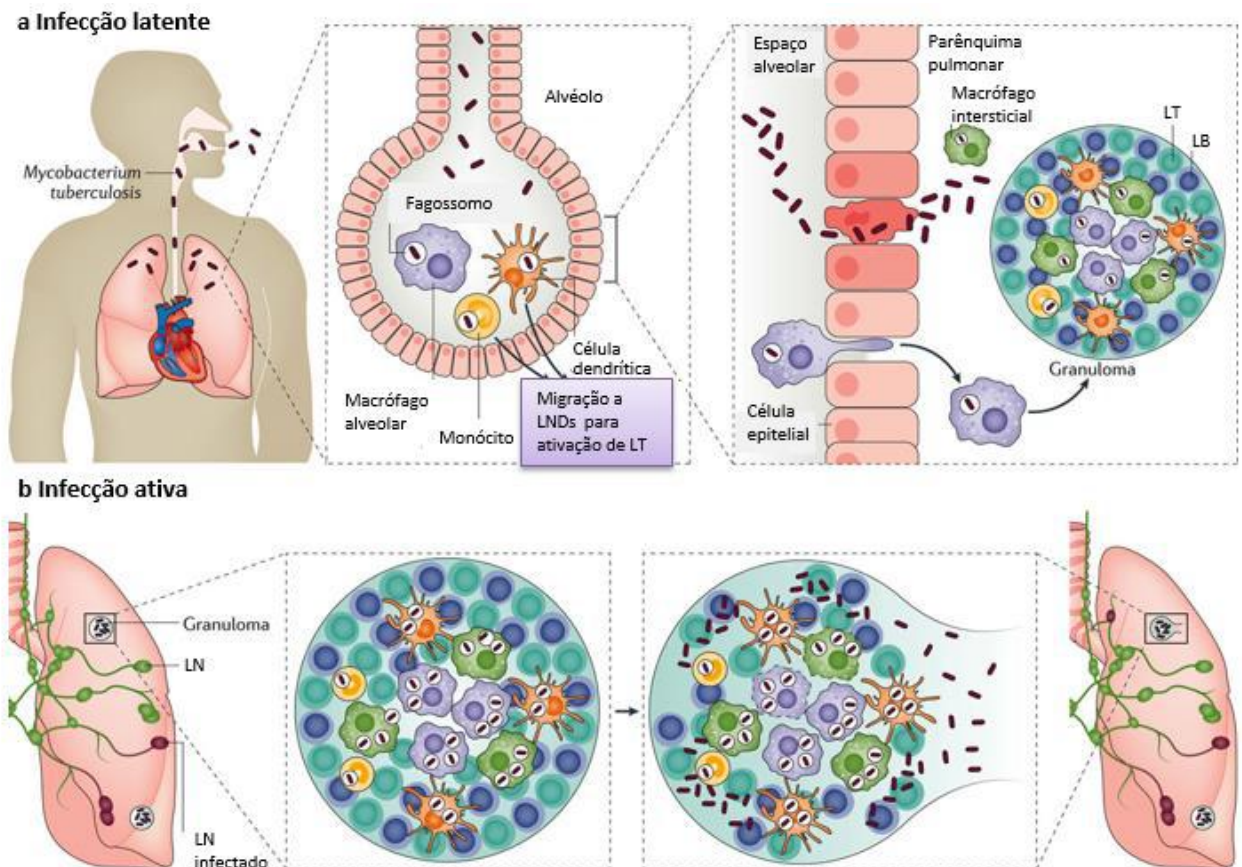


Figura 3. Representação do desenvolvimento do granuloma na Tuberculose humana. Na infecção latente (a) depois da transmissão do *M. tuberculosis* por via aerossol e o contato primário com os macrófagos alveolares, os quais funcionam como APCs associados a monócitos e células dendríticas, que migram para os linfonodos drenantes (LNDs) para ativar os linfócitos. Estes, agora ativados, migram ao pulmão formando o granuloma que é composto por linfócitos T e B (LT e LB), APCs infectadas e outros tipos celulares. Na infecção ativa (b), o sistema imune é incapaz de manter o granuloma e os bacilos podem se difundir via linfática e por via aérea. **Fonte:** Adaptado de PAI, et al., 2016.

Resposta Imune Inata

Na imunidade inata, após a interação dos bacilos com os macrófagos alveolares, é promovida uma resposta pró-inflamatória (ERNST, 2012). Os fagócitos endocitam os bacilos não opsonizados ou opsonizados (complemento C3). Esses fagócitos contêm na membrana diferentes receptores de reconhecimento padrão, os quais possuem como ligantes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são componentes da própria micobactéria, dentre estes se destacam as lipoproteínas 19 e 27 kDa, glicoproteína 38 kDa, o Lipoarabinomanose (LAM) e o Lipomanose (LM) (ERNST, 2012; VAN CREVEL;

OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002). A interação entre os ligantes do bacilo da tuberculose com os receptores dos macrófagos desencadeia a ativação do fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB), e como consequência leva a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86 na superfície desses macrófagos e de células dendríticas, e também a produção de citocinas, tais como IL-6, IL-8, IL-12, TNF e a quimiocina IP-10 (ERNST, 2012; SAARAV; SINGH; SHARMA, 2014; VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002).

Uma vez que os macrófagos são infectados, eles podem eliminar os bacilos pela indução de necrose ou apoptose (O’GARRA et al., 2013). Na defesa do hospedeiro e após a indução da resposta inflamatória, os macrófagos de tipo M1, produzem o óxido nítrico (NO) e Reativos Intermediários do Nitrogênio (RNI), com função bactericida (DAMÁSIO, 2011; VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002). A grande importância destas substâncias tóxicas na defesa contra o *M. tuberculosis* tem sido bem documentada tanto *in vitro* como *in vivo* (LEE et al., 2011; RAHMAN et al., 2009). Em contrapartida, os macrófagos de tipo M2 desempenham uma função anti-inflamatória pela liberação de TGF- β (MILLS, 2012). Watford (2001) e Ferguson (1999) e seus colaboradores, sugeriram que o microambiente alveolar, rico em surfactantes, pode influenciar a resposta imune inicial na TB, por exemplo, a proteína D do surfactante pode prevenir a fagocitose de *M. tuberculosis* por macrófagos alveolares.

Outras células envolvidas na resposta imune inata são os neutrófilos, primeiras células a chegarem ao sítio da infecção, desempenham sua função protetora com a fagocitose dos bacilos. Já as DCs possuem uma grande habilidade de capturar o *M. tuberculosis* e migrar até os linfonodos, onde promovem a ativação de células T. (O’GARRA et al., 2013). Por sua parte, as células NK, linfócitos granulares do sistema imune inato, têm uma função citotóxica e reconhecem os ácidos micólicos da membrana do bacilo e liberam IFN- γ e TNF (CADENA; FLYNN; FORTUNE, 2016). As células T invariantes associadas à mucosa (MAIT) se assemelham aos LTs e são consideradas como uma subpopulação de LT CD8+, elas podem induzir lise de células epiteliais infectadas com *M. tuberculosis* (função citotóxica) ou produzem IFN- γ promovendo a liberação de IL-12 pelas DCs e, conseqüentemente, a diferenciação de LT Th1 (GOLD; NAPIER; LEWINSOHN, 2015; NAPIER et al., 2015).

Os macrófagos e demais células fagocíticas geram citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-18, IL-23 e IL-27 induzindo a produção de IFN- γ , principal mediador da proteção imunológica contra o *M. tuberculosis*. Enquanto o TNF, sinérgica ao IFN- γ , promove a ativação clássica de macrófagos e formação do granuloma. Quanto maior a quantidade de bacilos de *M. tuberculosis* adquirida na infecção, maior a produção de IFN- γ . (GUILLIAMS; LAMBRECHT; HAMMAD, 2013; VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002). Entre as citocinas anti-inflamatórias os macrófagos liberam IL-10, que atua inibindo o IFN- γ , TNF e IL-12 e, conseqüentemente, redução da resposta protetora específica na TB. Os monócitos e DCs liberam o TGF- β com função sinérgica a IL-10; e IL-4 como supressor de produção de IFN- γ (DAMÁSIO, 2011; VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002).

Resposta Imune adaptativa

As APCs, em destaque as células dendríticas, capturam os antígenos no sítio da infecção e logo são atraídas pelo fluxo de quimiocinas aos LNDs, onde acontece a apresentação de antígenos para linfócitos virgens. A via de apresentação de antígenos para patógenos intracelulares, como o *M. tuberculosis*, acontece principalmente pelo Complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II para ativar LT CD4+, que exerce importante atividade reguladora da função de macrófagos (JURKOSHEK et al., 2016). Mas pode acontecer pelo MHC de classe I para ativação do LT CD8+, quando os antígenos contidos em vesículas apoptóticas são reconhecidos. Os LT CD8+ auxiliam aos LT CD4+ ao liberar IFN- γ (DAMÁSIO, 2011; O'GARRA et al., 2013).

Entre os LT CD4+, a subpopulação Th1 é a mais importante, com isso, os defeitos na produção de citocinas que modulam para esse perfil aumentam os riscos de progressão da doença. Os LT Th1 liberaram IFN- γ , TNF e/ou IL-2. O IFN- γ promove a função bactericida dos macrófagos. Outras células também são fontes de IFN- γ , como os LT CD8+ e NKs. O TNF também aperfeiçoa a função bactericida dos macrófagos e ajuda na manutenção do granuloma (DA SILVA et al., 2015; DOMINGO-GONZALEZ et al., 2016).

A subpopulação Th17 também é importante na função protetora na TB. Quando os macrófagos promovem a liberação de IL-6 e TGF- β (DA SILVA et al., 2015), e estimulam a

liberação de IL-23 pelos LT CD4+, acabam induzindo a diferenciação da subpopulação Th17 produtoras de IL-22 e IL-17. A IL-22 induz peptídeos antimicrobianos e inibe o crescimento intracelular do *M. tuberculosis* nos macrófagos (DOMINGO-GONZALEZ et al., 2016). A IL-17 induz citocinas pró-inflamatórias como G-SCF, IL-6 e IL-8, que promove a granulopoiese e assim o recrutamento de neutrófilos e inflamação no local de infecção e intervêm positivamente na formação do granuloma. Além disso, a IL-17 acelera o recrutamento de células produtoras de IFN- γ até os pulmões após o gradiente de CXCL-9, 10 e 11 (CRUZ et al., 2006; O’GARRA et al., 2013; JASENOSKY et al., 2015; LUO et al., 2016).

Os LT CD8+ também produzem TNF e IL-2, além do IFN- γ . A principal função dos LT CD8+ é a citotoxicidade, mediante a ação de grânulos pela indução de apoptose que podem lisar diretamente as células infectadas com o bacilo. Dentre os grânulos, as granzimas ativam as caspases e ativam os mecanismos de apoptose da célula infectada. A indução de apoptose também acontece pela ativação da via do Fas-Fas ligante (LIN; FLYNN, 2015). Em pacientes com TB ativa a atividade citotóxica esta diminuída (JASENOSKY et al., 2015; SILVA B. D. et al., 2014), em pacientes com co-infecção com HIV, os LT CD8+ são importantes fontes de IFN- γ (WANG, F. et al., 2016).

Depois de uma resposta pró-inflamatória exacerbada, LT reguladores (Treg) começam a atuar. As Treg estão em altos níveis no sangue periférico de pacientes com TB ativa e está associada com a carga bacilar aumentada e a multidroga-resistência (SINGH et al., 2012). Enquanto nos casos de TB latente, as Treg estão diminuídas (DA SILVA et al., 2015).

Os Linfócitos B (LB) nas infecções na maioria das vezes desempenham a função de proteção, mediante a produção de anticorpos, produção de citocinas ou pelo fato de agir como APC para ativar LT virgens. Porém, na TB a função não está bem elucidada (DU PLESSIS; WALZL; LOXTON, 2016). Em pacientes com TB, observam-se agregados de LB semelhante a folículos nos pulmões (O’GARRA et al., 2013)

Na figura 4 observa-se a ilustração de um panorama geral da resposta imune desenvolvida contra o *M. tuberculosis*, já discutido anteriormente.

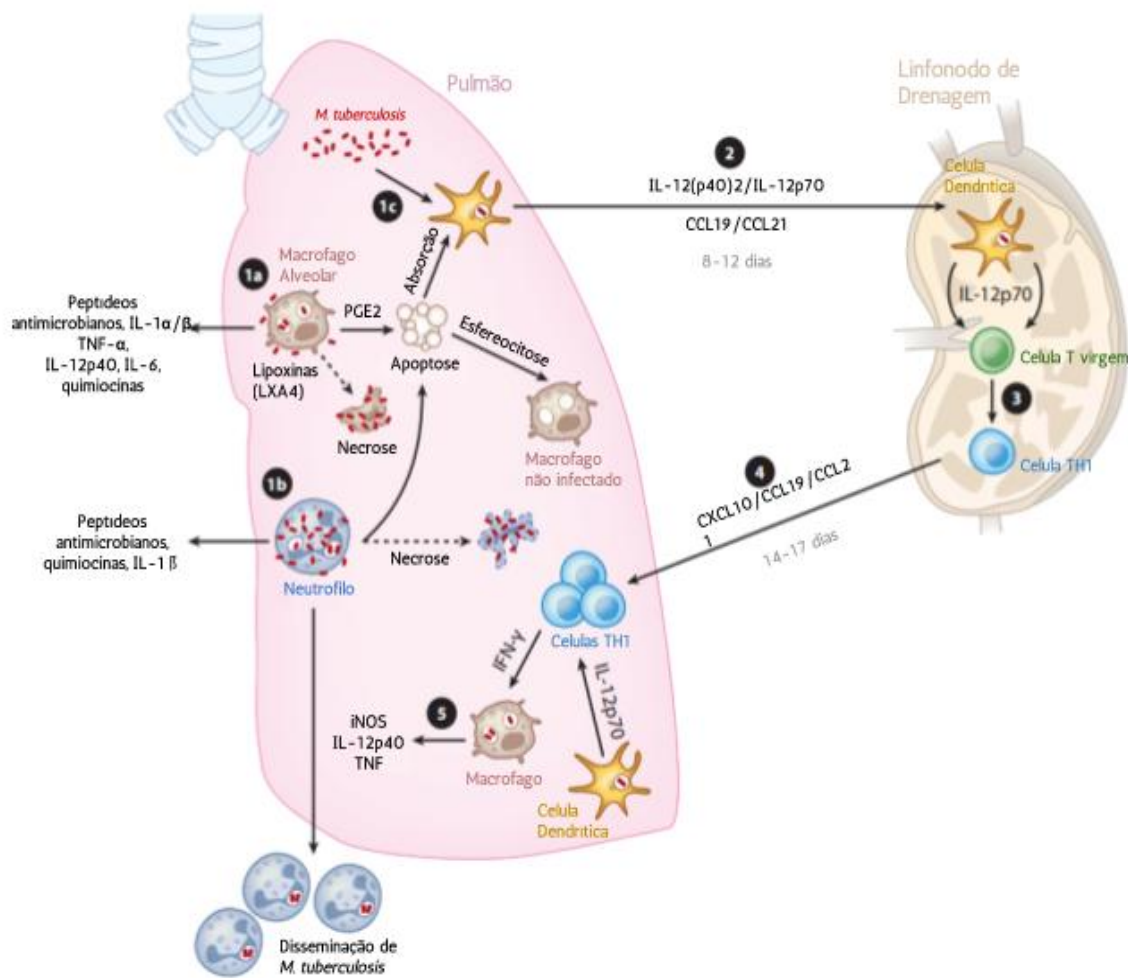


Figura 4. Representação do panorama geral da resposta imune desenvolvida contra o *M. tuberculosis*. **Fonte:** Adaptado de O’GARRA et al., 2013.

2.7 Diagnóstico

É considerado caso suspeito o indivíduo que apresente tosse por três semanas ou mais e/ou outros sinais e sintomas, como febre vespertina, sudorese noturna, emagrecimento, inapetência e/ou com imagens radiológicas compatíveis com a doença. Nas populações especiais, a suspeita de TB surge com pontos de corte diferenciados para o tempo de tosse, sendo de duas semanas para os privados de liberdade e, independente do tempo para pessoas que vivem com HIV ou AIDS (PVHV), indígenas e pessoas em situação de rua (BRASIL, 2011).

O caso de tuberculose pode ser confirmado pelo critério laboratorial, o qual independentemente da forma clínica, apresenta pelo menos uma amostra positiva de

baciloscopia, ou de cultura, ou de teste rápido molecular (TRM-TB). O critério clínico-epidemiológico é adotado quando o caso suspeito não apresenta resultado laboratorial positivo, mas apresenta situação clínica epidemiológica que fomentam a confirmação, respaldado pela avaliação de outros exames complementares, como os de imagem (WHO, 20012; DELOGU; SALI; FADDA, 2013).

2.7.1 Teste cutâneo tuberculínico (TCT)

O teste cutâneo tuberculínico (TCT) é o diagnóstico de triagem *in vivo*, que avalia a resposta imune celular *in vivo* contra uma fração proteica de baixo peso molecular composto de 200 proteínas obtidas de culturas do *M. tuberculosis*. Essa fração proteica foi denominada derivado protéico purificado (PPD) que, ao longo dos tempos, sofreu pequenas modificações para se tornar mais específica, e, hoje é o padrão internacional para o teste tuberculínico. No Brasil, o antígeno usado é chamado de RT23. (FIOCRUZ, 2008; BRASIL, 2011).

Utiliza-se a técnica de Mantoux, que consiste na injeção intradérmica do antígeno PPD - RT 23 na dose de duas unidades de tuberculina (2UT), convencionalmente na face ventral do antebraço esquerdo. Após 48 a 96 horas, é realizada a leitura, onde se pode observar a formação de um nódulo, que corresponde à chamada resposta de hipersensibilidade tardia tipo IV, caracterizada por vasodilatação, edema e acúmulo de células inflamatórias. O resultado do teste é registrado pela medida do maior eixo transversal deste nódulo, em milímetros, desprezando-se o eritema que se forma ao redor. Recomenda-se como teste positivo uma endureção igual ou superior a 5 mm. Neste sentido, a interpretação clínica diante do resultado depende do risco de adoecimento por TB, tamanho do diâmetro do endurecido, idade e critério epidemiológico. (VERONESI, 2005; SOUZA *et al.*, 2006; BRASIL, 2011).

Embora tenha importância no diagnóstico da tuberculose, o teste tuberculínico apresenta 80% de sensibilidade e especificidade. O TCT possui algumas limitações, tais como: o antígeno utilizado neste teste compartilha vários epítomos antigênicos com a vacina BCG e com a maioria das micobactérias não tuberculosas, portanto incapaz de distinguir com segurança pessoas vacinadas com BCG daquelas expostas a micobactérias do ambiente ou infectadas com *M. tuberculosis*. Esses fatos podem ser interpretados como resultados falso-positivos (ANDERSEN *et al.*, 2005). Os resultados falso-negativos estão associados ao método de aplicação (injeção profunda, quantidade insuficiente do antígeno; uso de seringas e agulhas

inadequadas), diluição, à leitura e ou à anotação dos resultados, armazenamento em temperaturas não adequadas e contaminação do PPD (PALOMINO, 2005; CHEE et al., 2013).

Além disso, fatores biológicos também podem interferir no resultado como: indivíduos com idade inferior a 3 anos e maior que 65 anos, doenças infecciosas agudas virais, bacterianas ou fúngicas; imunodepressão, neoplasias, doenças linfoproliferativas, desnutrição, gravidez, vacinação com vírus vivos, indivíduos anérgicos que mesmo infectados pelo *M. tuberculosis* não reagem ao PPD. (SANT'ANNA et al., 2002). Pode ocorrer o chamado efeito *booster*, que ocorre quando há várias e subsequentes aplicações do PPD. A reação observada nesses casos representa a reativação da resposta ao antígeno devido à perda da resposta dos linfócitos T de memória (BCG ou infecção antiga por *M. tuberculosis*). Esse fato levaria algumas pessoas à resposta negativa da TCT, mesmo infectado (FIOCRUZ, 2008; BRASIL, 2011).

2.7.2 Ensaio de Liberação do IFN- γ (IGRA)

O ensaio de liberação de interferon- γ (IGRA) são testes às respostas imunológicas celulares para diagnóstico da infecção, o princípio deste teste é a medida dos níveis do IFN- γ produzido *in vitro* por células T do sangue periférico que tenham sido estimuladas por antígenos. São testes alternativos ao TCT e possuem menor reação cruzada com a vacinação por BCG e infecções por outras micobactérias. (PAI et al., 2016).

Dentre os testes de IGRA, o QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT®) da Cellestis, Qiagen company, Austrália, utiliza os antígenos: early secretory antigen target-6 KDa (ESAT-6), culture filtrate-10 KDa (CFP-10) e o antígeno tuberculosis (TB 7.7) para o diagnóstico de TB. Esses antígenos são da região de diferença RD1 das micobactérias. O antígeno ESAT-6 é codificado e expresso pelo *M. tuberculosis* e também *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*. A CFP-10 é uma proteína específica do *M. tuberculosis*. Desse modo, esses antígenos são reconhecidos pelo sistema imune de pacientes com TB ativa pulmonar ou extrapulmonar e latente (DRUSZCZYNSKA et al., 2012; METCALFE et al., 2011). A detecção de IFN- γ pelo método ELISA é usada para detectar respostas *in vitro* a antígenos.

O QFT® é um exame laboratorial controlado, que não requer retorno do paciente ao laboratório para leitura. O resultado é objetivo e reproduzível, não é afetado por interpretações subjetivas, e o resultado está disponível em 24 horas. O teste apresenta elevada especificidade, acima de 98%, contra 35,4% do TCT. Contudo o seu uso apresenta elevado custo econômico e existem relatos de altas taxas de resultados indeterminados e menor sensibilidade entre pessoas imunodeprimidas (MACHADO et al., 2014), além disso, está disponível apenas na rede particular.

2.7.3 Radiografia do tórax – RX

A radiografia do tórax, importante na avaliação inicial e no acompanhamento da TB pulmonar, fornece o conhecimento adequado das imagens compatíveis com a atividade na TB, auxiliando no diagnóstico precoce e início de tratamento (BENTO et al., 2011; CHANG et al., 2008). A TB pulmonar em adultos geralmente apresenta infiltrado focal nos lobos superiores, frequentemente dos segmentos apical e posterior ou do segmento apical do lobo inferior (BOMBARDA et al., 2001). Outras alterações que podem ser encontradas são cavitações, padrão miliar, adenopatias, derrame pleural e atelectasias. É recomendável que o exame seja solicitado junto à pesquisa de *M. tuberculosis* em espécimes respiratórios para confirmar o diagnóstico de TB (SBPT, 2011).

2.7.4 Baciloscopia

Consiste na identificação do bacilo diretamente de esfregaços corados, sem diferenciar as espécies de micobactérias. O exame é realizado em amostras clínicas como (escarro, lavado gástrico, lavado broncoalveolar, líquido pleural, líquido cefalorraquidiano, urina) ou de fragmentos de tecido ou órgãos (de biopsia ou necrópsia), utiliza a coloração especial de Ziehl-Neelsen, que classifica o bacilo como álcool-ácido resistente (BAAR), tendo em vista que o alto teor de ácidos micólicos em sua parede celular torna-a hidrofóbica e dificulta a coloração com o corante aquoso azul de metileno. É o exame laboratorial mais utilizado no Brasil para diagnóstico da TB (CAMPOS et al., 2006).

Embora seja um exame rápido, e de baixo custo, tem como principal inconveniente o fato de necessitar de grande quantidade de bacilos no material examinado para ser considerado

positivo (no mínimo 5 mil bacilos por mililitro de amostra) (BRASIL, 2008) com alta especificidade e elevado valor preditivo positivo, sua sensibilidade diminuída (30 - 70%), está diretamente relacionada com o tipo de lesão, qualidade e número de amostras, a atenção e persistência do microscopista, presença de coinfeção com HIV, em crianças e pacientes com TB extra-pulmonar (SANT'ANNA et al., 2002).

2.7.5 Cultura

A cultura em meio sólido específico é o método considerado padrão-ouro, com alta sensibilidade e especificidade para a detecção de TB pulmonar e extrapulmonar e permite a identificação e a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos. Apesar de sua importância, somente é possível detectar o crescimento do bacilo entre 2 a 4 semanas após a inoculação, o que pode permitir a manutenção da cadeia de transmissão da doença. Há riscos de contaminação. Além disso, tanto a cultura quanto os testes de sensibilidade aos antibióticos exigem ambientes com nível de biossegurança 2 ou 3, de acordo com a metodologia utilizada, segundo recomendações para risco biológico do MS (BRASIL, 2008). Os sistemas automatizados BACTEC 460 TB®, BACTEC 9000® são sistemas de detecção automatizados para realização da cultura, os quais utilizam o meio líquido Middlebrook 7H12 acrescido de ácido palmítico, marcado com um radioisótopo do carbono 14 (¹⁴C). Esses sistemas têm a vantagem de acelerar o crescimento bacteriano o que torna possível a liberação do resultado em um menor tempo (10 a 15 dias), mas tem como limitação resultados falso-positivo devido à contaminação por outras bactérias e a cultura nem sempre apresenta 100% de positividade (GUERRA; REGO; CONDE et al., 2008; BENTO et al., 2011).

2.7.6 Diagnóstico molecular

Desde 2013, o Ministério da Saúde iniciou a implantação na rede pública de um teste rápido molecular, baseado na tecnologia *Point of Care*, denominado Gene Xpert MTB/RIF®, sendo utilizadas inicialmente, apenas amostras pulmonares. Em sua metodologia, utiliza um cartucho contendo todos os elementos necessários para a reação, incluindo reagentes liofilizados, tampões líquidos e soluções de lavagem. A diferença deste para os demais testes de amplificação de ácidos nucleicos utilizados na detecção de TB é que a plataforma desse teste integra e automatiza os três processos: preparação de amostras, amplificação e detecção.

O teste detecta a presença do *M. tuberculosis* em duas horas e identifica a resistência à rifampicina como um marcador alternativo de TB multirresistente (DELOCCO et al. 2011). A sensibilidade dos testes moleculares é de 92% enquanto que a cultura é 85% e a baciloscopia 65%. Diagnóstico eficaz e rápido é peça chave para detectar precocemente casos novos e pacientes com TB multirresistente, além de reduzir o tempo para início do tratamento (HOOG et al., 2013; NAKIYINGI; NANKABIRWA; LAMORDE, 2013).

Ao contrário da avançada tecnologia dos testes moleculares, a execução da técnica do Gene Xpert MTB/RIF®, é bastante simples, motivo pelo qual não exige pessoas com formação especializada. Contudo está presente apenas em centros de referência de diagnóstico.

2.8 *Mycobacterium tuberculosis* e sua correlação filogenética com *Corynebacterium pseudotuberculosis*

M. tuberculosis, pertencente ao grupo CMRN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Nocardia*), é um parasita intracelular facultativo capaz de sobreviver e se multiplicar dentro de células fagocitárias. Tem tempo de geração lento, é resistente à ação de agentes químicos e sensíveis à ação de agentes físicos como calor e radiação ultravioleta. O grupo CMRN apresenta espécies de interesse médico, veterinário e biotecnológico de relevância em âmbito mundial, e se caracteriza, principalmente, pela organização da parede celular constituída por complexos de polímeros compostos por peptídeoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos e pelo alto conteúdo de Guanina-Citosina nos seus respectivos genomas (DORELLA et al., 2009).

C. pseudotuberculosis é um coco-bacilo gram positivo, patógeno intracelular facultativo de fagócitos, relacionado filogeneticamente ao *M. tuberculosis* (BATEY, 1986; PASCUAL et al., 1995). *C. pseudotuberculosis* é geralmente considerado como um importante patógeno animal que raramente infecta humana (BATEY; TONGE, 1968). As cepas clínicas são ocasionalmente recuperadas de casos humanos de linfadenite, como *C. pseudotuberculosis* FRC41 que foi isolada do linfonodo inguinal de uma menina de 12 anos com linfadenite necrotizante. Para detectar potenciais fatores de virulência e correspondentes redes de regulação genética neste isolado humano, a sequência de genoma de *C. pseudotuberculosis*

FCR41 foi determinada por pirosequenciamento e funcionalmente anotada (TROST, E. et al., 2010).

Algumas biomoléculas são compartilhadas por diferentes agentes biológicos, como o *M. tuberculosis* e *C. pseudotuberculosis*, que podem ser usadas em modelos de estudos por reação cruzada, para avaliação de resposta imune e testes diagnósticos (PASCUAL et al., 1995; DORELLA et al., 2009).

HIPÓTESES

H01: Antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* não são reconhecidos pelo sistema imune de indivíduos com tuberculose pulmonar ativa.

H1: Antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* são reconhecidos pelo sistema imune de indivíduos com tuberculose pulmonar ativa.

H02: Não há diferença na resposta imune celular aos antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* entre indivíduos controles e com tuberculose pulmonar ativa.

H2: Há diferença na resposta imune celular aos antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* entre indivíduos controles e com tuberculose pulmonar ativa.

3. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a antigenicidade dos extratos proteicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em amostras de indivíduos com tuberculose pulmonar ativa.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de citocinas em sobrenadantes de células do sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar ativa, após estímulo *in vitro*, com os extratos proteicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*;
- Analisar a imunoreatividade dos extratos proteicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* nas amostras dos indivíduos do grupo TB ativa e controle;
- Comparar a imunoreatividade dos extratos proteicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* entre amostras dos indivíduos do grupo TB ativa e controle.

CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: (Moléculas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* com antigenicidade cruzada identificada pela resposta imune celular *in vitro* em amostra de sangue de pacientes com tuberculose ativa)

Resumo

Com a persistência de doenças infecciosas de difícil controle pela dificuldade de diagnóstico precoce, a busca de insumos biológicos tem sido incentivada, pelos custos e limitações de produção de biomoléculas. A tuberculose tem sido motivo da busca de ferramentas e pesquisas para uso diagnóstico e profilático, e nos últimos anos vários testes diagnósticos têm surgido. O acesso a esses métodos é ainda limitado para países em desenvolvimento de alta prevalência e incidência, como o Brasil. *M. tuberculosis* e *C. pseudotuberculosis* fazem parte do grupo CMRN e compartilham semelhanças entre alguns fatores de virulência/patogenicidade. Objetivou-se usar extratos de cepas de *C. pseudotuberculosis* semi-purificados para investigar sua capacidade antigênica *in vitro* em amostras de indivíduos com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa ICS-UFBA (CAAE 57662016.8.1001.5662). Participaram desse estudo, os pacientes do Hospital Especializado em doenças pulmonares da Bahia, com diagnóstico de TB positivo e sem tratamento (n=35) e participantes adultos, sem queixa, sem história ou sintomatologia de TB ou de infecção por *M. tuberculosis* (n=35). Com o sangue heparinizado procedeu-se o estímulo em placa com os extratos de *C. pseudotuberculosis* (cepas PAT-10, VD57 e FRC-41). Para a dosagem das citocinas utilizou-se o BD *Cytometric Bead Array* (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit e o BD™ CBA Human IP-10 Flex kit. As análises foram feitas no software FCAPArray™. Os extratos das cepas PAT10, VD57 e FRC41 de *C. pseudotuberculosis* semi-purificados, induziram a produção das citocinas estudadas nas amostras de sangue nos grupos estudados. Além disso, diferenciaram os grupos de estudo quando comparados com a concentração de IFN- γ e IP-10, sob estímulo com PAT10; IFN- γ , IL-2 e IL-6, sob estímulo com VD57 e IP-10 e IL-4, sob estímulo com FRC41. Os extratos das cepas PAT10, VD57 e FRC41 de *C. pseudotuberculosis* semi-purificados induzem a produção de IFN- γ , IP-10, TNF, IL-2, IL-6 e IL-10 nas amostras de sangue de indivíduos infectados com *M. tuberculosis*. Sob o estímulo dos extratos utilizados, a detecção de IFN- γ e IP-10, diferencia os grupos controle e TB ativa.

PALAVRAS-CHAVE: TUBERCULOSE; *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*; *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*; CITOCINAS.

ABSTRACT

The persistence of infectious diseases of difficult control due to the difficulty of early diagnosis, costs and limitations of the production of biomolecules for use in diagnostic tests, makes the search for biological inputs encouraged. Tuberculosis has been the reason for searching for tools and researches for diagnostic and prophylactic use, and in recent years several diagnostic tests have emerged. Access to these methods is still limited for developing countries with high prevalence and incidence, such as Brazil. *M. tuberculosis* and *C. pseudotuberculosis* are part of the CMRN group and share similarities among some virulence/pathogenicity factors. The objective of this study was to use semi-purified extracts of *C. pseudotuberculosis* strains to evaluate the antigenic capacity in samples of individuals diagnosed with active pulmonary tuberculosis. This study was approved by the Research Ethics Committee ICS-UFBA (CAAE 57662016.8.1001.5662). Voluntary participants of the Hospital of the Specialized Hospital of pulmonary diseases of Bahia, with diagnosis of TB and without treatment (n = 35) and participants adults, without complains, no history or symptomatology of TB or of *M. tuberculosis* infection (n = 35). With heparinized blood, after leukogram, the plate stimulation was carried out using mitogen (PWM), *C. pseudotuberculosis* protein extract antigens (PAT-10, VD57 and FRC-41 strains). For a dosage of the cytokines were use BD Cytometric Bead Array (CBA) Th1 / Th2 / Th17 Cytokine Kit and the BD™ CBA Human IP-10 Flex kit. Analyzes were performed with FCAPArray™ software. Extract antigens PAT-10, VD57 and FRC-41 strains induced the production of the cytokines in the blood samples in the studied groups. In addition, they differentiated the study groups when compared to IFN- γ and IP-10, under stimulation with PAT10; IFN- γ , IL-2 and IL-6, under stimulation with VD57 and IP-10 and IL-4, under stimulation with FRC41. The extracts from *C. pseudotuberculosis* strains PAT10, VD57 and FRC41 induce the production of IFN- γ , IP-10, TNF, IL-2, IL-6 and IL-10 in blood samples from individuals infected with *M. tuberculosis*. Under the stimulus of the extracts used, the detection of IFN- γ and IP-10 differentiates the control and active TB groups.

KEYWORDS: TUBERCULOSIS; *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*; *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*; CYTOKINES

1. Introdução

A tuberculose (TB), causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) descoberto por Robert Koch, em 1882, é uma doença infectocontagiosa que acomete, principalmente, os pulmões (DANIEL, 2006). Apesar da TB ser uma doença milenar, continua sendo grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que 10,4 milhões de pessoas tiveram tuberculose no mundo em 2015, e mais de 1 milhão morreram por conta da doença. No Brasil, foram diagnosticados e registrados 66.796 casos novos e 12.809 casos de retratamento de TB em 2016, apresentando coeficiente de incidência 32,4/100 mil habitantes (BRASIL, 2017).

A infecção por *M. tuberculosis* é mais comumente adquirida através da inalação de gotículas contendo o bacilo, que são expelidas através da fala, tosse ou espirros por indivíduos infectados na fase ativa da doença (WEELS et al, 1941). O diagnóstico da infecção por *M. tuberculosis* deve ser feito clinicamente e por métodos de triagem, que quando sugestivo, devem ser confirmados por métodos laboratoriais, com identificação do agente, por exemplo, microscopia de escarro e testes moleculares (WHO, 2015).

Em um país de alta taxa de incidência como o Brasil, apesar dos recursos tecnológicos atuais usados no controle da tuberculose, faz-se necessário buscar estratégias inovadoras, referentes a métodos de diagnóstico e de imunoprofilaxia, que visem o diagnóstico precoce dos casos de TB, e seu efetivo tratamento. Visto que um diagnóstico rápido e seguro, acompanhado de tratamento precoce, são medidas fundamentais para quebrar a cadeia de transmissão e controlar a tuberculose (PEREIRA et al., 2016)

Na área científica diversas pesquisas são realizadas para a obtenção de reagentes que compõem os kits de diagnóstico laboratorial, e, para tanto, precisa-se de moléculas (antígenos) dos agentes infecciosos para a avaliação da resposta do hospedeiro em modelos *in vivo* ou *in vitro* (SILVA, 2015). Algumas biomoléculas podem ser compartilhadas por diferentes agentes biológicos, como o *M. tuberculosis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que podem ser usadas em modelos de estudos por reação cruzada, para avaliação de resposta imune e testes diagnósticos (DORELLA et al., 2009).

A infecção por *C. pseudotuberculosis* que compromete linfonodos superficiais e profundos, com um curso da infecção que pode envolver órgãos respiratórios em caprinos e ovinos, apresenta um modelo infeccioso semelhante ao da tuberculose humana (DORELLA et al., 2006). Adicionalmente, pela semelhança entre alguns fatores de virulência/patogenicidade dessas bactérias, objetivou-se usar extratos de cepas de *C. pseudotuberculosis* semi-purificados para investigar sua capacidade antigênica *in vitro*, no modelo proposto com amostras de indivíduos com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa.

2. Materiais e métodos

2.1 Aspectos éticos

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde – CEP-ICS/UFBA (CAAE nº 57662016.8.1001.5662). Após convite, explicação do estudo e assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os voluntários responderam o questionário clínico-epidemiológico.

2.2 Seleção da população de estudo

A população de estudo composta por 70 participantes voluntários provenientes de atendimento em Hospital Especializado em Tuberculose da Bahia e em laboratório de extensão universitária da Bahia no ano de 2017 e categorizada em dois grupos. Grupo 1 (controle, n=35): Indivíduos sem queixas, sem história ou sintomatologia de TB ou de infecção por *M. tuberculosis* (TCT não reagente) e com leucograma normal. O grupo 2 (TB ativa, n=35): Indivíduos com diagnóstico de TB, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde realizado na unidade de atendimento, (Teste Rápido Molecular positivo (GeneXpert®) sem resistência a rifampicina, baciloscopia positiva e/ou cultura de BK positiva). A coleta das amostras deste grupo foi realizada antes do início do tratamento. O teste IGRA (QFT - TB gold) foi realizado com amostras de todos os participantes. Foram excluídas das análises as amostras dos participantes que relataram contato ou consumo de derivados (carne e/ou leite crus) de pequenos ruminantes.

2.3 Produção dos extratos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Foram utilizadas três cepas de *C. pseudotuberculosis*: a cepa PAT10, de um abscesso pulmonar em uma ovelha da Patagônia Argentina (CERDEIRA et al., 2011), a cepa VD57

isolada de uma lesão granulomatosa de cabra no município de Juazeiro, Estado da Bahia (ALMEIDA et al., 2016) e a cepa FRC41 isolada do linfonodo inguinal de uma menina de 12 anos com linfadenite necrotizante na França (TROST et al., 2010). As bactérias foram mantidas na coleção da bacterioteca após identificação pelos aspectos morfológicos e o teste bioquímico APICoryne (Biomerrioux). Depois das culturas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) procedeu-se a técnica de particionamento trifásico (three-phase partitioning-TPP) padronizado por Paule et al (2004), com pequenas modificações. A dosagem protéica foi feita através do método de Lowry (Kit Bio-Rad). Os antígenos foram armazenados a -20°C. Os mesmos procedimentos de purificação, concentração, dosagem e armazenamento foram realizados para o meio BHI.

2.4 Coleta de sangue

Foi coletado 8 mL de sangue em tubo heparinizado para realização dos estímulos celulares *in vitro*, 2 mL em tubo com EDTA para o leucograma e 3 mL para o IGRA.

2.5 Ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA)

Todos os tubos do Kit comercial para diagnóstico de infecção pelo *M. tuberculosis QuantiFERON[®]-TB Gold IT* (Cellestis/Qiagen) foram utilizados e incubados à 37°C por 24 horas. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para dosagem de IFN- γ , conforme recomendações do fabricante. As interpretações dos dados foram feitas no software de análise do fabricante.

2.6 Estímulo *in vitro* com extrato de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Em placas estéreis de 24 poços para cultivo celular foi adicionado 0,5mL de sangue por poço para cada extrato na concentração protéica de 25ug/mL, conforme estabelecido em prévia padronização. Foram utilizados também extrato de BHI e pokeweed (PWM) 5 ug/mL. As amostras de sangue, puro e sob estímulos, foram incubadas à 37°C por 24 horas. Os sobrenadantes obtidos por centrifugação foram imediatamente armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

2.7 Dosagem de citocinas

A dosagem do IFN- γ do IGRA *in tube* foi realizada pelo método ELISA do Kit comercial Quantiferon (Cellestis QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Foram

analisadas as citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-10 e IL-4 por *Cytometric Bead Array* (CBA) pelo Kit Human Th1/Th2/Th17 Cytokine – BD e IP-10 foi dosada pelo kit Human IP-10 CBA Flex Set – BD, ambas seguindo as recomendações do fabricante. A aquisição foi pré-determinada para 3.000 eventos no FACSCalibur-BD, com o Software Cell Quest Pro-BD. As análises foram feitas no software FCAP Array™ disponibilizado pela empresa.

2.8 Análise estatística

Para a análise de normalidade dos dados foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov. O Teste T foi utilizado para analisar os dados das citocinas com distribuição paramétrica (normal) e o Teste de Mann-Whitney para os de não paramétrica (anormal). Foi considerado estatisticamente significativo valores de $p < 0,05$. Os dados obtidos no estudo foram analisados no programa Graph Pad Prism v 5.0.

3. Resultados

As características epidemiológicas da população estudada estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Características epidemiológicas da população estudada.

	Variáveis	Controle (N=35)	TB (N=35)
Sexo	Feminino	25 (73%)	18 (51%)
	Masculino	10 (27%)	17 (49%)
Idade	Média (Intervalo)	35 (19 – 64)	36 (19 – 57)
Cicatriz vacinal por BCG	Sim	33	29
	Não	2	6
Contactante	Domiciliar	5	10
	Trabalho	5	8
	Outros	2	6
	Sem Contato	23	11
	Não Lembra	0	1

Em relação aos exames laboratoriais disponíveis para tuberculose foram realizados e/ou obtidos nos prontuários médicos os resultados dos testes descritos na tabela 2. Todos os indivíduos do grupo controle apresentaram resultados no TCT 0mm e 32 (91%) com IGRA

negativo. No grupo TB todos os indivíduos possuíam laudo de TRM positivo, 23 (66%) com cultura positiva, 24 (68%) com baciloscopia positiva, 29 (83%) IGRA positivo. (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados laboratoriais da população estudada.

Exames realizados	Variáveis	Controle (N=35)	TB (N=35)
TCT	0 mm	35	
	5 a 9mm	0	#
	>10 mm	0	
TRM	Positivo		35
	Negativo	#	0
	Não realizado		0
Cultura	Positiva	#	3 (+)
			5 (++)
			15 (+++)
	Negativa		1
Não realizada		7	
Em andamento		4	
Baciloscopia	Positiva	#	10 (+)
			6 (++)
			8 (+++)
	Negativa		7
Não realizada		4	
IGRA	Positivo	2	29
	Negativo	32	5
	Indeterminado	1	1
# exame não realizado			

Na tabela 3 encontram-se os valores da mediana e mínimo e máximo das concentrações das citocinas analisadas (IFN- γ , IP-10, TNF, IL-2, IL-6, IL-10 e IL-4) em pg/mL após estímulo *in vitro*. Em todas as amostras dos participantes observou-se resposta ao PWM em comparação ao sem estímulo (basal).

Nas figuras 1 e 2 são mostradas as medianas das concentrações das citocinas IFN- γ e IP-10 nas amostras de sangue total após estímulo *in vitro*, conforme minuciosamente descrito na tabela 3.

No grupo controle, a mediana das concentrações de IFN- γ sem estímulo (S/EST), condição basal, foi zero e o valor de mínimo e máximo de 0,0 - 20,61. Houve significância estatística na comparação intragrupo com os estímulos BHI ($p=0,0186$), PAT10, VD57, FRC41 ($p<0,0001$). No grupo TB, a mediana das concentrações de IFN- γ S/EST foi de 4,18 pg/mL e o valor de mínimo e máximo de 0,0-31,88, na comparação intragrupo obteve-se significância nos estímulos VD57 ($p=0,0114$) e FRC41 ($p=0,0062$). Em ambos os grupos as medianas dos estímulos foram maiores. Nas análises intergrupos houve significância entre S/EST ($p=0,0045$), PAT10 ($p=0,0050$) e VD57 ($p=0,0007$). Há uma redução nas concentrações de IFN- γ nos diferentes estímulos do grupo TB em relação ao grupo controle, exceto na condição basal. (Figura 1).

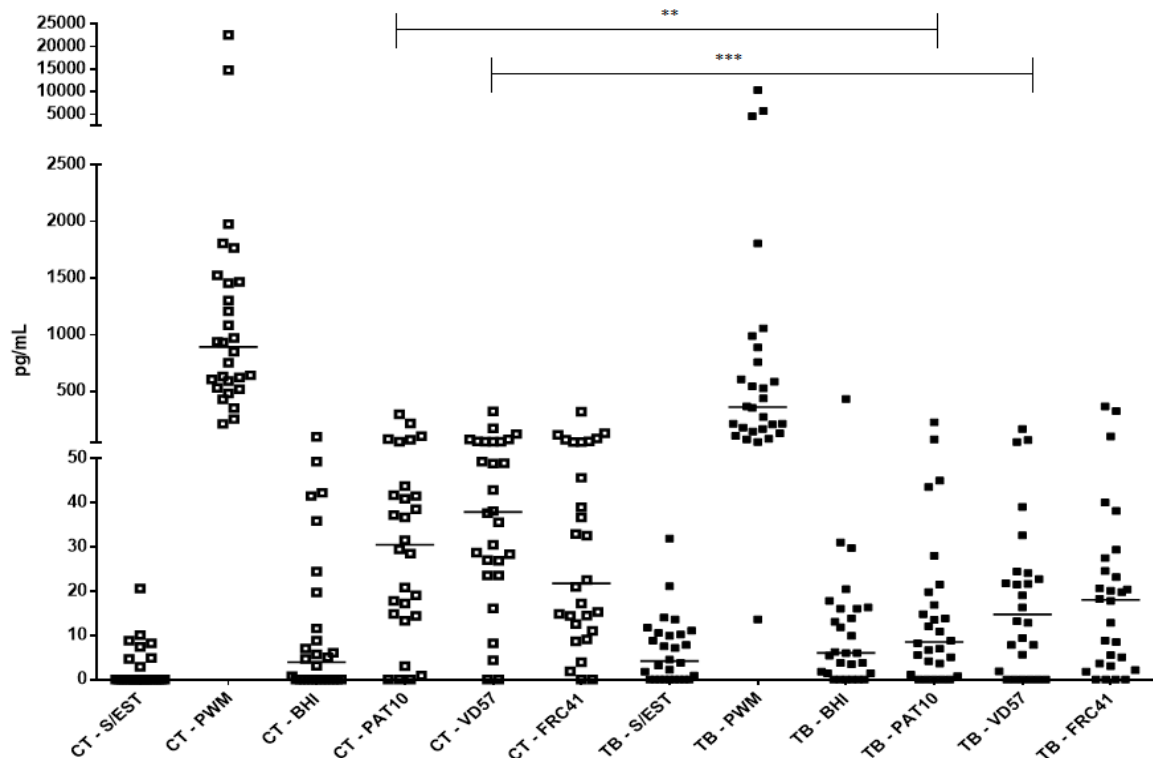


Figura 1 – IFN- γ em sangue estimulado por 24 horas com os antígenos de *C. pseudotuberculosis* nos grupos controle ($n=28$) e tuberculose ($n=28$). O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Sendo S/EST - amostras controle, PWM - estímulo inespecífico (controle positivo), BHI - estímulo inespecífico (meio de cultivo bacteriano semi-purificado), PAT10, VD57, FRC41 - extratos obtidos pela técnica do TPP das cepas PAT10, VD57 e FRC41 de *C. pseudotuberculosis*, respectivamente. CT - controle, TB - Tuberculose ativa. Aquisição pré-determinada de 3000 eventos com o Kit Human Th1/Th2/Th17 Cytokine – BD utilizando o Software Cell Quest Pro- BD®. Os dados foram analisados utilizando o software FCAP Array BD®. CT-S/EST x CT-BHI ($p=0,0186$), CT-PAT10, CT-VD57, CT-FRC41 ($p<0,0001$); TB-S/EST x TB-BHI, TB-PAT10 ($p>0,05$), TB-VD57 ($p=0,0114$), TB-FRC41($p=0,0062$).

A mediana das concentrações e o valor de mínimo e máximo de IP-10 no grupo controle foram de 242,0 pg/mL e 26,11 – 2806, respectivamente. Foi significativamente estatística, a mediana das concentrações de IP-10 do sangue não estimulado no grupo controle em relação aos estímulos BHI, PAT10, VD57, FRC41 ($p < 0,0001$). No grupo TB, a mediana de S/EST foi de 897,3 pg/mL e valor de mínimo e máximo de 101,6 – 7799, obteve-se significância nos estímulos BHI ($p = 0,0008$), PAT10 ($p = 0,0080$), VD57 ($p < 0,0037$) e FRC41 ($p = 0,0103$). As medianas dos estímulos foram maiores em ambos os grupos. Foi significativa estatística a comparação intergrupos entre S/EST ($p < 0,0001$), BHI ($p = 0,0050$), PAT10 ($p = 0,0210$) e VD57 ($p = 0,0019$). As concentrações de IP-10 do grupo TB em relação ao grupo controle são maiores. (Figura 2).

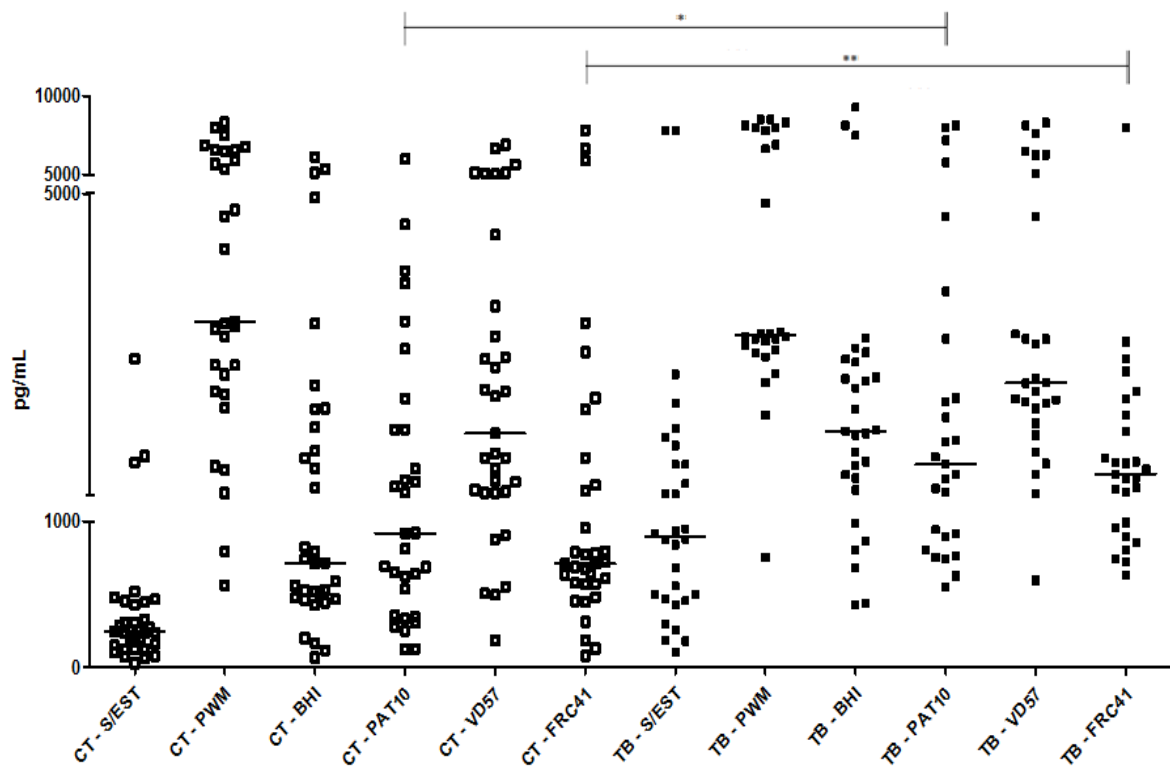


Figura 2 – IP-10 em sangue estimulado por 24 horas com os antígenos de *C. pseudotuberculosis* nos grupos controle (n=32) e tuberculose (n=30). O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Sendo S/EST - amostras controle, PWM - estímulo inespecífico (controle positivo), BHI - estímulo inespecífico (meio de cultivo bacteriano semi purificado), PAT10, VD57, FRC41 - extratos obtidos pela técnica do TPP das cepas PAT10, VD57 e FRC41 de *C. pseudotuberculosis*, respectivamente. CT - controle, TB - Tuberculose ativa. Aquisição pré-determinada de 3000 eventos com o kit BD™ CBA Human IP-10 Flex utilizando o Software Cell Quest Pro- BD®. Os dados foram analisados utilizando o software FCAP Array BD®. CT-S/EST x CT-BHI ($p = 0,0186$), CT-PAT10, CT-VD57, CT-FRC41 ($p < 0,0001$); TB-S/EST x TB-BHI, TB-PAT10 ($p > 0,05$), TB-VD57 ($p = 0,0114$), TB-FRC41 ($p = 0,0062$).

Os dados das demais citocinas analisadas, envolvidas na resposta celular, encontram-se na tabela 3.

Tabela 03: Medianas da produção de citocinas pós-estímulos com extratos de *C.pseudotuberculosis*

Estímulos	IFN- γ		IP-10		TNF		IL-2		IL-6		IL-10		IL-4			
	Mediana (Min-Max)	p	Mediana (Min-Max)	p	Mediana (Min-Max)	p	Mediana (Min-Max)	p	Mediana (Min-Max)	p	Mediana (Min-Max)	p	Mediana (Min-Max)	p		
	Controle	TB	Controle	TB	Controle	TB	Controle	TB	Controle	TB	Controle	TB	Controle	TB		
Sem estímulo	0,0 (0,0-20,61)	4,18 ** (0-31,88)	242,0 (26,11-2806)	897,3 (101,6-7799)	0,0 (0,0-8,000)	0,0 (0-10,89)	17,17 (0-52,15)	24,32 (0,0-65,47)	3,425 (0,0-232,9)	47,78 (0,0-1083)	0,0 (0,0-32,14)	0,0 (0,0-115,9)	20,16 (3,56-33,28)	11,09 (2,18-20,91)	*** NS	
PWM	0890,9 (211,1-22562)	360,6 (13,62-10388)	3291 (561,0-8314)	3123 (754,0-8495)	1981 (372,2-76883)	2839 (52,90-35613)	310,2 (118,3-2241)	151,2 (47,68-1204)	11656 (2342-21665)	8825 (5996-23314)	2072 (218,0-6730)	2406 (168,3-12159)	15,79 (218,0-6730)	15,62 (3,26-50,30)	-	-
BHI	39,3 (0-98,62)	6,020 (0-432,2)	715,3 (65,63-6113)	1847 (429,7-9275)	2,705 (0,0-521,4)	19,38 (0-824,6)	18,47 (0,0-73,78)	23,10 (0,0-77,59)	7244 (1380-11806)	8170 (1817-12035)	28,44 (0,0-1443)	122,1 (12,82-2621)	16,88 (0,0-27,98)	12,20 (2,63-35,74)	*** NS	NS
PAT10	30,50 (0-296,3)	8,535 (0-226,2)	916,8 (121,8-3995)	1407 (550,1-8138)	57,98 (0-2176)	70,30 (2,060-784,6)	35,04 (0,0-214,4)	29,93 (16,93-311,7)	9588 (108,8-12428)	8926 (2266-20141)	153,1 (17,35-3860)	282,0 (14,25-1942)	16,89 (1,88-23,89)	11,85 (0,99-22,28)	NS	NS
VD57	37,91 (0-323,1)	14,77 (0-167,1)	1820 (182,7-6889)	2490 (595,3-8314)	455,1 (59,69-4813)	229,5 (0-11365)	19,41 (0,0-57,48)	26,96 (0,0-226,1)	10939 (6083-13239)	8070 (339,5-20141)	404,6 (25,50-2762)	271,5 (8,280-2688)	16,69 (3,40-27,80)	14,10 (1,43-63,16)	NS	NS
FRCH1	21,76 (0-320,6)	18,04 (0-367,1)	707,9 (75,74-7799)	1282 (633,3-7966)	33,09 (0-6349)	22,83 (0-348,6)	39,07 (0,0-434,5)	42,47 (0,0-774,4)	7550 (26,76-12035)	6985 (232,9-20888)	109,8 (0-3655)	80,15 (12,09-484,9)	18,60 (5,160-38,0)	10,25 (0,59-19,19)	*** NS	***

Em ambos os grupos estudados as medianas das concentrações de TNF dos estímulos foram maiores em relação ao S/EST (mediana nula). Houve significância estatística ($p < 0,0001$) quando comparadas aos estímulos. Nas análises intergrupos, apenas foi significativa a comparação entre BHI ($p < 0,0168$), as medianas dos estímulos VD57 e FRC 41 no grupo TB foram menores em relação ao grupo controle. (Tabela 3).

Quando dosada IL-2 no grupo controle a mediana das concentrações foi de 17,17 (0-52,15) e 24,32 (0,0-65,47) pg/mL, no grupo TB. Em ambos os grupos estudados houve significância estatística quando comparada a mediana das concentrações de IL-2 do sangue não estimulado (S/EST) em relação aos estímulos PAT10 ($p < 0,0001$) e FRC41 (grupo controle: $p = 0,0427$ e grupo TB: $p = 0,0002$). As medianas dos estímulos foram maiores em ambos os grupos. Foram significantes as análises intergrupos entre S/EST ($p = 0,0203$), BHI ($p = 0,0188$) e VD57 ($p = 0,0217$) (Tabela 3).

A mediana das concentrações de IL-6 do sangue não estimulado (Controle: 3,425 pg/mL e TB: 47,87 pg/mL) em relação aos estímulos teve significância estatística ($p < 0,0001$) em ambos os grupos estudados. Entre os grupos estudados, houve significância entre S/EST ($p = 0,0005$) e VD57 ($p = 0,0130$), contudo a mediana nesse extrato foi inferior no grupo TB em relação ao controle (Tabela 3).

A mediana das concentrações de IL-10 quando tratadas com os extratos foi maior em comparação ao sangue não estimulado, com significância estatística de $p < 0,0001$, em ambos os grupos. Houve significância apenas no BHI ($p = 0,0001$) na comparação entre grupos estudados, as medianas de VD57 e FRC41 foram maiores no grupo controle em relação ao TB (Tabela 3).

A mediana das concentrações de IL-4 e o valor mínimo e máximo no grupo controle sem estímulo foram de 20,16 e 3,56 – 33,28 pg/mL, no grupo TB foi de 11,09 e 2,18 – 20,91 pg/mL, respectivamente. Nas análises intragrupos, apenas a mediana das concentrações de IL-4 do sangue não estimulado teve significância comparado ao BHI ($p = 0,0370$) no grupo controle. Entre grupos estudados, houve significância no S/EST ($p = 0,0009$), PAT10 ($p = 0,0456$) e FRC41 ($p = 0,0003$). Nota-se que as concentrações de IL-4 no grupo controle em relação ao grupo TB são maiores em todas as condições analisadas (Tabela 3).

4. Discussão

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra as micobactérias não estão totalmente esclarecidos. Contudo, é inquestionável o papel das citocinas e quimiocinas na proteção contra o *M. tuberculosis* pelo controle da infecção inicial, manutenção e regulação da resposta imune celular (TORRADO; ROBINSON; COOPER., 2011).

O perfil da resposta imune efetivo contra o *M. tuberculosis* é o Th1, IFN- γ é a principal citocina envolvida nesse contexto, porém apenas a ação da mesma não é suficiente para promover a proteção contra o bacilo, e desta forma a contribuição de componentes celulares e outras citocinas são necessários para promover uma proteção efetiva, tais como o TNF, IL-2 e IL-6 (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002; KHANNA; SRIVASTAVA; KUMAR, 2003). Quimiocinas como a IP-10 também auxiliam o perfil de resposta Th1. Já o desenvolvimento do perfil Th2, envolve a IL-4 e outras citocinas, que atuam inibindo a resposta Th1 contra o *M. tuberculosis*. A IL-10 exerce funções similares a IL-4 (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002; ROOK; GRAHAM, 2007)

A quantificação das concentrações das citocinas e quimiocinas estudadas neste trabalho foi realizada por citometria de fluxo. O trabalho de Lee et al (2013) demonstrou que a detecção por esta técnica de IFN- γ , TNF em amostras estimuladas com o antígeno do *M. tuberculosis* foi eficaz, demonstrando ser uma técnica sensível para o diagnóstico da TB.

O IFN- γ , principal citocina ativadora de macrófagos e também responsável pelo recrutamento de células T, atuando na produção de quimiocinas, como a IP-10, participa criticamente na eliminação do *M. tuberculosis*. Na TB, o IFN- γ é caracterizado como biomarcador devido a sua concentração elevada em indivíduos infectados por *M. tuberculosis* (DORMAN; HOLLAND, 1998; FILIPE-SANTOS et al., 2006; ZHANG et al., 2008). IP-10 atua no tráfego celular e ativação de leucócitos, na TB auxilia na formação do granuloma (RUHWALD; AABYE; RAVN, 2007). Esta quimiocina vem sendo estudada como marcador alternativo para diagnóstico da TB, geralmente são encontrados níveis elevados de IP-10 em soro de pacientes infectados (FERRERO et al., 2003; AZZURRI et al., 2005).

IL-2 induz a expansão clonal de LT específicos aos antígenos microbianos, tais como do *M. tuberculosis* (PILLAI; ABBAS; LICHTMAN, 2015), sendo assim, é esperado maiores

concentrações em indivíduos com TB, conforme encontrados nos estudos de (MARTINEZ; MEHRA; KAUSHAL, 2013). IL-6, como citocina pró-inflamatória, é importante na TB por recrutar células para o sítio da infecção por *M. tuberculosis*. O TNF, assim como IFN- γ , desempenha importante papel no combate ao *M. tuberculosis*, induzindo uma forte resposta celular, incluindo lesão tecidual e ativação de macrófagos. Não foi detectado no basal dos dois grupos o TNF, fato explicável pela sua rápida metabolização e consumo na ativação de macrófagos (DORHOI; KAUFMANN, 2014).

Na TB, a IL-10 promove a desativação de macrófagos, diminuindo a produção de IL-12 e IFN- γ (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002). Espera-se então níveis mais baixos, conforme encontrados no estudo, visto que a elevação de IL-10 inibe o perfil de resposta imune Th1. A IL-4, inibidora da ativação de macrófagos, é produzida em baixos níveis, além de ser altamente bioativa, o que dificulta a sua dosagem. Em relação à detecção de menores níveis de IL-4 no grupo TB em comparação ao grupo controle, é sugestivo pela redução da produção desta citocina em infecções que desencadeiam o perfil de resposta imune Th1, como na TB (POORAN et al., 2017).

O potencial antigênico dos extratos das cepas PAT10, VD57 e FRC41 de *C. pseudotuberculosis* semi-purificados foi demonstrado pela detecção de maiores níveis das citocinas IFN- γ , IP-10, TNF, IL-2, IL-6 e IL-10, após o estímulo nas amostras dos indivíduos do estudo, com exceção da IL-4 no grupo controle. Nos trabalhos de Kellar et al (2011) e You et al (2016) foi observado o aumento da produção dessas citocinas quando estimuladas com antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Rebouças et al (2011), utilizando antígenos *C. pseudotuberculosis* semi-purificados em amostras de pequenos ruminantes portadores da linfadenite caseosa, demonstrou maiores níveis de IFN- γ no grupo dos animais infectados após estímulo.

O antígeno PAT10 foi capaz de diferenciar os grupos do estudo quando comparados em relação aos níveis da produção de IFN- γ . Embora seja encontrado em quantidades pequenas, o IFN- γ é atualmente utilizado como biomarcador para TB (RUHWALD; RAVN, 2009).

Sob estímulos antigênicos, em desencontro com a literatura, foi detectado menores níveis IFN- γ no grupo TB (Tabela 3), contudo, Al-Attiyah et al (2012), demonstrou que na presença de antígenos micobacterianos o IFN- γ permaneceu em concentrações indetectáveis antes do sexto dia, sugerindo a necessidade de incubação superior a 24h, tempo utilizado neste

trabalho. Já Sahiratmadja et al (2007) relataram que a produção de IFN- γ em resposta a um antígeno específico de *M. tuberculosis* foi diminuída em pacientes com TB não tratados, mas que durante e após o tratamento alcançou níveis significativamente maiores.

Avaliando o perfil de citocinas em sangue periférico de pacientes com TB ativa e em contato com TB, em resposta ao antígeno 30-Kd de *M. tuberculosis*, Torres et al (1998) encontraram níveis menores de IFN- γ no grupo TB. Os autores sugeriram que IFN- γ tem papel protetor nos indivíduos contactantes saudáveis. Deenadayalan et al (2010) demonstrou os mesmos resultados, assim como neste presente estudo.

Assim como em IFN- γ , as concentrações de IP-10 foram capazes de diferenciar os grupos do estudo, no entanto com maiores concentrações no grupo TB. Vários estudos mostram produção de IP-10 em quantidades elevadas em pacientes infectados com *M. tuberculosis*, o que permite o desenvolvimento de plataformas de teste novas e simplificadas (RUHWALD; AABYE; RAVN, 2009). Hong et al (2014) observaram que IP-10 pode ser um biomarcador útil para monitorar a eficácia da terapia em pacientes com TB ativa.

IP-10 é considerada por vários autores como um melhor biomarcador para doença, uma vez que essa molécula existe em maior quantidade sérica o que facilitaria a sua dosagem laboratorial e interpretação clínica. Ruhwald et al (2007) e Won et al (2017), sugeriram a utilização de IP-10 como biomarcador imunodiagnóstico de infecção por *M. tuberculosis*, após detectar níveis mais elevados de IP-10 em plasma de pacientes com TB ativa em comparação aos indivíduos controle, após estímulo com antígenos específicos de *M. tuberculosis*.

O antígeno VD57 foi capaz de diferenciar os grupos do estudo quando comparados em relação aos níveis da produção de IFN- γ , IL-2 e IL-6. Já o antígeno FRC41, seguindo a mesma comparação anterior, levou a produção diferencial de IP-10 e IL-4 entre os grupos.

O estudo de Sun et al (2016) avaliou a produção de citocinas em células PBMC de pacientes controles, TB ativa e TB latente sob estímulo com antígenos específicos de *M. tuberculosis* durante 24h e 72h. Nas amostras sem estímulo, os níveis encontrados de IL-2 foram baixos e sem significância estatística entre os grupos. No estímulo com CFP-10/ESAT-6 por 24h, os níveis encontrados de IL-2 foram significativamente maiores nos grupos TB ativa e TB latente

quando comparados com o grupo controle, o mesmo foi observado para o estímulo com o PPD. No estímulo de 72h, da mesma forma que no estímulo de 24h, foram encontrados níveis de IL-2 maiores nos grupos TB ativa e TB latente.

As concentrações de IL-6 e IL-4 sob estímulo com os três antígenos foram menores no grupo TB em comparação ao grupo controle, o que sugere uma forma de modulação da resposta imune do hospedeiro pelo bacilo da TB. Em relação a IL-6, uma possível explicação para esses dados seria a ativação e expressão do receptor de IL-6 nas células sanguíneas pelos antígenos do *M. tuberculosis* com consequente consumo dessa citocina. Outra possibilidade seria a inibição da capacidade de produção de IL-6 por meio de um mecanismo supressor dos antígenos do *M. tuberculosis* a resposta do hospedeiro. A ausência de IL-6 está relacionada ao atraso do desenvolvimento de células T produtoras de IFN- γ e inibição de macrófagos e infecção letal em modelos com animais (LADEL et al., 1997; LEAL et al., 1999). Sendo assim, a IL-6 desempenha papel importante na resposta imuno-inflamatória e a inibição dessa citocina por antígenos micobacterianos pode ser um mecanismo de modulação da resposta imune do hospedeiro pelo bacilo da TB.

Os níveis de IP-10, TNF, IL-2 e IL-10 foram significativamente diferentes entre grupo controle e TB ativa sob estímulo BHI. O meio BHI, recomendado como meio universal para a bacteriologia aeróbia e para a recuperação primária de fungos e de *Actinomycetales*, é composto por componentes da infusão de cérebro-coração, peptona e glucose (CONVILLE, 2011). Acredita-se que este meio contém moléculas que podem ser compartilhadas entre outros micro-organismos, em consequência, estimula a produção de citocinas por reação cruzada. Trabalhos futuros podem ser realizados para pesquisar qual(is) componente(s) deste meio leva(m) a produção diferencial de citocinas entre indivíduos controle e com tuberculose pulmonar ativa. As amostras de sangue total dos dois grupos de estudo quando estimuladas com o BHI induziram aumento dos níveis de IFN- γ , IP-10, TNF, IL-2, IL-6 e IL-10 em comparação ao basal.

REFERÊNCIAS

- AL ATTIYAH, R.; EL SHAZLY, A.; MUSTAFA, A. S. *Comparative Analysis of Spontaneous and Mycobacterial Antigen Induced Secretion of Th1, Th2 and Pro Inflammatory Cytokines by Peripheral Blood Mononuclear Cells of Tuberculosis Patients. Scandinavian journal of immunology*, v. 75, n. 6, p. 623-632, 2012.
- ALMEIDA, S. et al. *The genome anatomy of Corynebacterium pseudotuberculosis VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. Standards in genomic sciences*, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.
- AZZURRI, A. et al. *IFN- γ -inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection. Microbes and Infection*, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. **Bol Epidemiol.** v. 48, n. 8, p. 1-11, 2017.
- CERDEIRA, L. T. et al. *Whole-genome sequence of Corynebacterium pseudotuberculosis PAT10 strain isolated from sheep in Patagonia, Argentina. Journal of bacteriology*, v. 193, n. 22, p. 6420-6421, 2011.
- CONVILLE, Patricia S.; WITEBSKY, Frank G. *Nocardia, rhodococcus, gordonia, actinomadura, streptomyces, and other aerobic actinomycetes.* In: **Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition.** American Society of Microbiology, p. 443-471, 2011.
- DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862-1870, 2006.
- DORELLA, F. A. et al. *Antigens of Corynebacterium pseudotuberculosis and prospects for vaccine development. Expert Reviews in Vaccine*, 8(2):205-213, 2009.
- DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Veterinary research*, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.
- DORHOI, A; KAUFMANN, S. H. E. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. In: *Seminars in immunology. Academic Press*, 2014. p. 203-209.
- DORMAN, S. E.; HOLLAND, S. M. *Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. Journal of Clinical Investigation*, v. 101, n. 11, p. 2364, 1998.
- FERRERO, E. et al. *Macrophages exposed to Mycobacterium tuberculosis release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on $\gamma\delta$ cells. Immunology*, v. 108, n. 3, p. 365-374, 2003.

FILIFE-SANTOS, O. et al. *Inborn errors of IL-12/23-and IFN- γ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features*. In: *Seminars in immunology*. **Academic Press**, 2006. p. 347-361.

HONG, J. Y. et al. *Efficacy of IP-10 as a biomarker for monitoring tuberculosis treatment*. **Journal of Infection**, v. 68, n. 3, p. 252-258, 2014..

KELLAR, K. L. et al. *Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with Mycobacterium tuberculosis antigens*. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26545, 2011.

KHANNA, M; SRIVASTAVA, L. M; KUMAR, P. *Defective interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in pulmonary tuberculosis*. **The Journal of communicable diseases**, v. 35, n. 2, p. 65-70, 2003.

LADEL, C. H. et al. *Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice*. **Infection and immunity**, v. 65, n. 11, p. 4843-4849, 1997.

LEAL, I. S. et al. *Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine*. **Infection and immunity**, v. 67, n. 11, p. 5747-5754, 1999.

LEE, J. et al. *Comparison of whole-blood interferon- γ assay and flow cytometry for the detection of tuberculosis infection*. **Journal of Infection**, v. 66, n. 4, p. 338-345, 2013.

MARTINEZ, A. N.; MEHRA, S.; KAUSHAL, D. *Role of interleukin 6 in innate immunity to Mycobacterium tuberculosis infection*. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 8, p. 1253-1261, 2013.

PAULE, B. J. A. et al. *Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Protein expression and purification**, v. 34, n. 2, p. 311-316, 2004.

PEREIRA, A. A. et al. *Gestão e gerenciamento dos níveis hierárquicos do programa nacional de controle da tuberculose*. **IJHE-Interdisciplinary Journal of Health Education**, v. 1, n. 1, 2016.

PILLAI, S; ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. H. *Imunologia celular e molecular*. **Elsevier Brasil**, 2015.

POORAN, A. S. et al. *The Role Of Interleukin (IL)-4 And T-Helper (Th)-2-Like Cytokines In The Host Immune Response To Tuberculosis*. In: **A61. TUBERCULOSIS DISEASE: HOST RESPONSE AND DIAGNOSTICS**. American Thoracic Society, p. A2070-A2070. 2017.

REBOUÇAS, M. F. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats*. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 23, n. 2, p. 213-220, 2011.

ROOK, W.; GRAHAM, A. *Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis*. **Current molecular medicine**, v. 7, n. 3, p. 327-337, 2007.

RUHWALD, M. et al. *CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7*. **Microbes and infection**, v. 9, n. 7, p. 806-812, 2007.

RUHWALD, M.; RAVN, P. *Biomarkers of latent TB infection*. **Expert review of respiratory medicine**, v. 3, n. 4, p. 387-401, 2009.

SAHIRATMADJA, E. et al. *Dynamic changes in pro-and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment*. **Infection and immunity**, v. 75, n. 2, p. 820-829, 2007.

SILVA, B. D. *Avaliação da resposta imune específica de células TCD8+ e citocinas na tuberculose humana*. 2015

SUN, Q.; WEI, W.; SHA, W. *Potential Role for Mycobacterium tuberculosis Specific IL-2 and IFN- γ Responses in Discriminating between Latent Infection and Active Disease after Long-Term Stimulation*. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0166501, 2016.

TORRADO, E.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. *Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology*. **Trends in Immunology**, v. 32, p. 66-72, feb. 2011.

TORRES, M. et al. *Cytokine Profiles for Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Active Pulmonary Tuberculosis and Healthy Household Contacts in Response to the 30-Kilodalton Antigen of Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 1, p. 176-180, 1998.

TROST, E. et al. *The complete genome sequence of Corynebacterium pseudotuberculosis FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence*. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 728, 2010.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. *Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 294-309, 2002.

WELLS, W. F. et al. *Experimental Air-borne Disease. Quantitative Natural Respiratory Contagion of Tuberculosis*. **American Journal of Hygiene**, v. 34, n. 1, 1941.

WHO. **Guidelines on the management of latent tuberculosis infection**. Geneva, Switzerland, 2015.

WON, E. et al. *Biomarkers for discrimination between latent tuberculosis infection and active tuberculosis disease*. **Journal of Infection**, v. 74, n. 3, p. 281-293, 2017

YOU, E. et al. *Evaluation of IL-2, IL-10, IL-17 and IP-10 as potent discriminative markers for active tuberculosis among pulmonary tuberculosis suspects*. **Tuberculosis**, v. 99, p. 100-108, 2016.

ZHANG, S. et al. *Inborn errors of interferon (IFN) -mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN α/β , IFN γ , and IFN λ in host defense.* **Immunological reviews**, v. **226**, n. **1**, p. **29-40**, **2008**.

4. CONCLUSÃO GERAL

Moléculas dos extratos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* induzem produção das citocinas analisadas em amostras de indivíduos com tuberculose pulmonar ativa.

Moléculas dos extratos de *C. pseudotuberculosis* cepas PAT10, VD57, FRC41 induzem maior resposta de IP-10, TNF, IL-2 no grupo com TB ativa, enquanto que induzem maior resposta de IFN- γ , IL-6 e IL-4 no grupo controle.

Moléculas dos extratos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepa PAT10 induz maior resposta de IL-10 no grupo TB ativa, enquanto que moléculas dos extratos de *C. pseudotuberculosis* cepas VD57 e FRC41 induzem maior resposta desta citocina no grupo controle.

Moléculas dos extratos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* diferenciam os grupos de estudo quando são analisadas as concentrações de IFN- γ e IP-10, sob estímulo com PAT10, IFN- γ , IL-2 e IL-6, sob estímulo com VD57, e IP-10 e IL-4, sob estímulo com FRC41.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S. Pathogenesis, Immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, p. 814-943, 2011.

ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M. The success and failure of BCG – implications for a novel tuberculosis vaccine. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 3, n. 8, p. 656-662, aug. 2005.

ARNOLD, Cath. Molecular evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 2, p. 120-8, feb. 2006.

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

BATEY, R.G. Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at a Western Australian abattoir. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, p. 482-485, 1986.

BATTEY, Y.M.; TONGE, J.I. Human infection with Corynebacterium ovis. **The Medical Journal of Australia**, September, n. 28, p. 540-543, 1968.

BENTO, J. et al. Diagnostic tools in tuberculosis. **Acta medica portuguesa**, v. 24, n. 1, p. 145-154, 2011.

BENTO, J. *et al.* Metodos diagnosticos em tuberculose. **Acta Médica Portuguesa**, Porto, v. 24, n. 1, p. 145-154, 2011.

BOMBARDA, S.; FIGUEIREDO, C.; FUNARI, M.; JÚNIOR, J.; SEISCENTO M.; FILHO, M. **Journal de Pneumologia**, v. 6, n. 27, 2001.

BRASIL. **Manual de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. **Bol Epidemiol.** v. 48, n. 8, p. 1-11, 2017.

BROSCH, René et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. **The National Academy of sciences**, v. 99, n. 6, p. 3684-9, jan. 2002.

CADENA, A. M.; FLYNN, J. L.; FORTUNE, S. M. The Importance of First Impressions: Early Events in Mycobacterium tuberculosis Infection Influence Outcome. **MBio**, v. 7, n. 2, p. 1–9, 2016.

CAMPOS, H. S. et al. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2006.

CHANG, K. C. *et al.* Supervised and induced sputum among patients with smear-negative pulmonary tuberculosis. **European Respiratory Journal**, Redwood, v. 31, n. 10, p. 85-90, 2008.

CHEE, C. B.-E. *et al.* Diagnosis and treatment of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Official Journal of the Asian Pacific Society of Respiriology**, Crawley, v. 18, n. 2, p.205-216, 2013.

CRUZ, A. *et al.* Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. **J Immunol**, v. 177, n. 3, p. 1416–1420, 2006.

DA SILVA, M. V. *et al.* Complexity and Controversies over the Cytokine Profiles of T Helper Cell Subpopulations in Tuberculosis. **J Immunol Res**, p. 1-13, 2015.

DAMÁSIO, I. L. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n. 1, p. 42–48, 2011.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862-1870, 2006.

DELOCCO, B. A . V. *et al.* XpertR MTB/RIF no diagnostico da tuberculose pulmonar. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (BRATS)**, Brasília, v. 6, n. 16, p. 1-14, 2011.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. **Mediterranean Journal of Hematology Infectious Diseases**, Roma, v. 5, n. 1, 2013.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. **Mediterranean Journal of Hematology Infectious Diseases**, Roma, v. 5, n. 1, 2013.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; GUIDO, R. V. C. *et al.* Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química Nova**, v. 36, n. 10, São Paulo, 2013.

DOMINGO-GONZALEZ, R. *et al.* Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Microbiol Spectrum**, v. 4, n. 5, p. 1-37, 2016

DORELLA, F. A. *et al.* Antigenes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Reviews in Vaccine**, 8(2):205-213, 2009.

DORELLA, F. A. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary research**, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.

DRUSZCZYNSKA, M. *et al.* Latent M. tuberculosis Infection – Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Prevention Strategies. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 61, n. 1, p. 3-10, 2012.

DU PLESSIS, W. J.; WALZL, G.; LOXTON, A. G. B cells as multi-functional players during Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *Tuberculosis (Edinb)*, v. 97, p. 118–125, 2016.

DUCATI, R. G. *et al.* The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 8, p. 581–591, 2012.

Ferguson, J. S., Voelker, D. R., McCormack, F. X. & Schlesinger, L. S. Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate–lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. **J. Immunol.** 163, 312–321 (1999).

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Educação a Distância. **Controle da tuberculose**: uma proposta de integração ensino-serviço. 6. ed. Rio de Janeiro, p. 158-162, 2008.

GOLD, M. C.; NAPIER, R. J.; LEWINSOHN, D. M. MR1-restricted mucosal associated invariant T (MAIT) cells in the immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Immunol Rev*, v. 264, n. 1, p. 154–166, 2015.

GOROCICA, Patricia *et al.* Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v. 18, n. 2, p. 142-153, 2005.

GUERRA, R; REGO, L; CONDE, M. B. Diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com baciloscopia direta de escarro negativa. **Pulmão RJ**, v. 17, n. 2-4, p. 87-90, 2008

GUILLIAMS, M.; LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. **Mucosal Immunol**, v. 6, n. 3, p. 464–73, 2013.

HOOG, A. H. V. *et al.* Optimal triage test characteristics to improve the cost-effectiveness of the Xpert MTB/RIF Assay for TB Diagnosis: A decision analysis. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-11, 2013.

JASENOSKY, L. D. *et al.* T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. **Immunol Rev**, v. 264, n. 1, p. 74–87, 2015

JURKOSHEK, K. S. et al. Interspecies Communication between Pathogens and Immune Cells via Bacterial Membrane Vesicles. **Front Cell Dev Biol**, v. 4, p. 1–8, 2016.

KAUFMANN, S. Protection against tuberculosis: cytokines, t cells, and macrophages. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, supl. 2, p. ii54-ii58, 2002.

LAGUARDIA, Josué et al. Information system for notifiable diseases (Sinan): challenges in developing a national health information system. **Epidemiol Serv Saude**, v. 13, n. 3, p. 135-46, 2004.

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

LIMA, T. M. et al. Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 8, n. 2, p. 65-76, 2017.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection. *Semin Immunopathol*, v. 37, n. 3, p. 239–249, 2015.

LUO, J. et al. Imbalance of Th17 and Treg in peripheral blood mononuclear cells of active tuberculosis patients. *Braz J Infect Dis*, p. 1–7, 2016.

MACHADO A ,EMODI K, TAKENAMI I, FINKMOORE BC, BARBOSA T,CARVALHO J, CAVALCANTI L, SANTOS G, TAVARES M, MOTA M, BARRETO F, REIS MG, ARRUDA S,

RILEY LW. *Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay.* **INT J TUBERC LUNG DIS** v.13, n.4, p.446–453, 2009.

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

METCALFE, J. Z. *et al.* Interferon- γ release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v.204, n. 4, p. 1120–1129, 2011.

MILLS, C. D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol*, v. 32, n. 6, p. 463–488, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual técnico para o controle da tuberculose. 2002

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de recomendações para controle da tuberculose no Brasil**. Brasília, 2011. 284 p.

NAKIYINGI, L.; NANKABIRWA, H.; LAMORDE, M. Tuberculosis diagnosis in resource-limited settings: clinical use of GeneXpert in the diagnosis of smear-negative PTB: a case report. **African Health Sciences**, Kampala, v. 13, n. 2, p. 522-524, 2013.

NAPIER, R. J. et al. The role of mucosal associated invariant T cells in antimicrobial immunity. *Front Immunol*, v. 6, p. 1–10, 2015.

O’GARRA, A. et al. The Immune Response in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, v. 31, p. 475-527, 2013.

PAI, M. et al. *Tuberculosis*. **Nature Reviews Disease Primers 2**. v. 16076, 2016

PALOMINO, J. C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **European Respiratory Journal**, Redwood, v. 26, n. 2, p. 339-350, 2005.

PASCUAL, C.; LAWSON, P.A.; FARROW, J.A.; GIMENEZ, M.N.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 724-728, 1995.

PEREIRA, A. A. et al. Gestão e gerenciamento dos níveis hierárquicos do programa nacional de controle da tuberculose. **IJHE-Interdisciplinary Journal of Health Education**, v. 1, n. 1, 2016.

RAHMAN S, GUDETTA B, FINK J, GRANATH A, et al. Few CD8+ Effector T Cells but

RODRIGUES, J, BITENCOURT, C, JOÃO, I, SARIOGLOU, K, REIS, L, CRISTÓVÃO, P, GRAÇA, S & JORDÃO, L. Aplicação dos testes IGRA na detecção de tuberculose latente: o geral e o particular. **Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge**, 2013.

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

ROSEMBERG, J. Tuberculose: aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Bol. Pneumol. Sanit.*, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, jul./dez. 1999.

Russell, D. G. *Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol. Rev.* 240, 252–268, 2011.

SANT’ANNA C. C. et al. Diagnóstico e terapêutica da tuberculose infantil: uma visão atualizada de um antigo problema. **Journal of Pediatrics**, v. 78, n. 2, p. 205-214, 2002.

SARAAV, I.; SINGH, S.; SHARMA, S. Outcome of *Mycobacterium tuberculosis* and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion? *Immunol Cell Biol*, v. 92, n. 9, p. 1–6, 2014.

SILVA, B. D. et al. Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis. *Immunol Lett*, v. 160, n. 1, p. 23–32, 2014.

STEINGART, K. R. et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *The Cochrane Library*, 2014.

Suppress Foxp3+ Regulatory T Cell Differentiation and Potentiate Th1 Development. **J.**

TROST, E. et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 728, 2010.

WANG, F. et al. The source of *Mycobacterium tuberculosis*-specific IFN- γ production in peripheral blood mononuclear cells of TB patients. *Int Immunopharmacol*, v. 32, p. 39–45, 2016.

Watford, W. T., Wright, J. R., Hester, C. G., Jiang, H. & Frank, M. M. Surfactant protein A regulates complement activation. **J. Immunol.** 167, 6593–6600 (2001).

WELLS, W. F. et al. *Experimental Air-borne Disease. Quantitative Natural Respiratory Contagion of Tuberculosis. American Journal of Hygiene*, v. 34, n. 1, 1941.

WHO. **Guidelines on the management of latent tuberculosis infection.** Geneva, Switzerland, 2015.

WHO. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2015.* 2015.

WHO. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2016.* Geneva: World Health Organization; 2016

ANEXOS

Dados do Projeto Aprovado no CEP



UFBA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil clínico-laboratorial de indivíduos com diagnóstico de tuberculose e avaliação da antigenicidade de proteínas de *Mycobacterium* sp e *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Pesquisador: Songelí Menezes Freire

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 57662016.8.1001.5662

Instituição Proponente: PÓS Instituto de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.886.978

Apresentação do Projeto:

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é o agente causal da tuberculose humana (TB), doença de grande impacto mundial e ainda negligenciada no Brasil. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB continua sendo uma das doenças transmissíveis mais mortais do mundo. Estima-se que em 2013 ocorreram 9 milhões de casos novos e 1,5 milhão de óbitos, 360 mil dos quais eram HIV positivo e 360 mil casos de multidroga resistente (MDR). Além disso, um terço da população mundial está infectado com o bacilo (infecção latente), demonstrando a gravidade da doença no âmbito global (OMS, 2014). O diagnóstico da infecção e da TB deve ser feito clinicamente e confirmado por métodos radiológicos e laboratoriais, com identificação do Mtb. No Brasil, apesar da dificuldade de obtenção do antígeno, é realizada a reação in vivo com intradermoreação (Teste com derivado protéico purificado - PPD). Esta intradermoreação devido as dificuldades atuais comerciais poderá entrar em desuso. Alguns países desenvolveram kit para uso in vitro, baseado na liberação do interferon- gama (IGRA) para de diagnóstico desta infecção. Sobretudo, recursos financeiros são fundamentais para quebrar a trajetória da epidemia e atingir as metas do programa da OMS, principalmente no desenvolvimento de novos diagnósticos, medicamentos e vacinas, bem como, melhorar o acesso e qualidade da atenção básica, garantindo o diagnóstico mais rápido e eficiente. A homologia existente entre organismos tem sido identificada nos últimos

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Telefone: (71)3283-8951

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

E-mail: cep.ics@outlook.com



Continuação do Parecer: 1.886.978

Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_749731.pdf	20/12/2016 16:10:45		Aceito
Outros	Carta_Anuencia_HEOM.pdf	14/11/2016 17:17:36	ROGERIO REIS CONCEICAO	Aceito
Outros	Projeto_de_Pesquisa_alterado.docx	14/11/2016 17:17:03	ROGERIO REIS CONCEICAO	Aceito
Outros	Questionario_Clinico_epidemiologico.doc	14/11/2016 17:16:37	ROGERIO REIS CONCEICAO	Aceito
Outros	RESPOSTA_AO_PARECER_CONSUBSTANCIADO.docx	14/11/2016 17:14:50	ROGERIO REIS CONCEICAO	Aceito
Outros	TCLE_corrigido.docx	14/11/2016 17:14:16	ROGERIO REIS CONCEICAO	Aceito
Outros	Carta_anuencia.PDF	01/07/2016 12:58:52	Songeli Menezes Freire	Aceito
Outros	Termo_Compromisso_prontuario.pdf	01/07/2016 12:56:57	Songeli Menezes Freire	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/07/2016 12:54:23	Songeli Menezes Freire	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_Investigador.pdf	01/07/2016 12:54:05	Songeli Menezes Freire	Aceito
Outros	Declaracao_Confidencialidade.pdf	01/07/2016 12:53:16	Songeli Menezes Freire	Aceito
Outros	Equipe_detalhada.pdf	01/07/2016 12:48:38	Songeli Menezes Freire	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisa.pdf	01/07/2016 12:47:34	Songeli Menezes Freire	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento.pdf	01/07/2016 12:47:19	Songeli Menezes Freire	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.PDF	01/07/2016 12:46:23	Songeli Menezes Freire	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

CEP: 40.110-902

UF: BA Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cep.ics@outlook.com

APÊNDICES

Ficha Clínica



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR

FICHA CLÍNICA

Sub-Projeto: “Padronização de testes imunodiagnósticos *in vitro* alternativo para tuberculose humana e avaliação da resposta *in vitro* a diferentes antígenos de *Mycobacterium sp* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*.”

Nome do entrevistador: _____ Data da coleta: ___/___/___

Identificação do paciente:

Parametro	Possibilidades	Resposta
Registro		
Nome Completo		
Procedência	1.IBIT 2.HOM 3.OUTROS	
Gênero	1.MASCULINO 2.FEMININO	
Data de Nascimento ___/___/ 19__		
Naturalidade		
Profissão		
Grau de Instrução	1.Fundamental Incompleto 2.Fundamental Completo 3.Nível Médio Incompleto 4.Nível Médio Completo 5.Superior Incompleto 6.Superior Completo 7. Outro _____	
Endereço		
Telefone		
Classificação Étnica (auto-referenciada) IBGE	1.BRANCO 2.MESTIÇO 3.NEGRO 4.ÍNDIO	

Dados Clínico-Laboratoriais:

Parametro/Pergunta	Possibilidades	Resposta
1. O paciente já realizou a BACILOSCOPIA? OBS: BACILOSCOPIA = Exame de escarro(Se NÃO , pular para a questão 4)	1.SIM 2.NÃO 3.Não sei/Não lembro	
2. Resultado da BACILOSCOPIA (Se NEGATIVO , pular para a questão 4)	1.POSITIVO 2.NEGATIVO 3.Não sei/Não lembro	
3. Se POSITIVO , qual a classificação? – Preferencia COLOCAR A PARTIR DO	1. (1+) 2. (2+) 3.(3+) 4.(4+) 5.Não sei/Não lembro	

LAUDO / Prontuário		
4. O paciente já realizou o exame CULTURA? (Se NÃO , pular para a questão 6)	1.SIM 2.NÃO 3.Não sei/Não lembro	
5. Se SIM , qual foi o resultado? Preferencia COLOCAR A PARTIR DO LAUDO / Prontuário/Cadastro	1.POSITIVO 2.NEGATIVO 3.Não sei/Não lembro	
6. O paciente já realizou o exame PPD? (Explicar ao paciente como é o exame) (Se NÃO , pular para a questão 8) Preferencia COLOCAR A PARTIR DO LAUDO / Prontuário /Cadastro	1.SIM 2.NÃO	
7. Qual foi o resultado do PPD? Em mm Preferencia COLOCAR A PARTIR DO LAUDO / Prontuário /Cadastro	Em mm _____	
8. O paciente já tomou a vacina BCG? Preferencia COLOCAR A PARTIR DA CICATRIZ VACINAL NO BRAÇO	1.SIM 2.NÃO	
9. O paciente tem a cicatriz da BCG? (Olhar o braço direito do paciente)	1.SIM 2.NÃO	
10. O paciente está em tratamento? (Se NÃO , pular para a questão 13)	1.SIM 2.NÃO	
11. O tratamento atual tem quanto tempo? Preferencia COLOCAR A PARTIR DO LAUDO / Prontuário/Cadastro	1.Um mês 2.Dois meses 3.Três meses 4.Quatro meses 5.Cinco meses 6.Seis meses 7. Mais que seis meses	
12. Quais as drogas utilizadas no tratamento atual? (Pular para a questão 17)	1.Isoniazida 2.Rifampicina 3.Pirazinamida 4.Etambutol 5.Estreptomicina 6.Etionamida 7.Não sei/Não lembro 8.Outros(especificar) _____ OBS: Comprimidos "vermelhos" = Isoniazida e Rifampicina; Comprimidos "brancos" = Pirazinamida	
13. O paciente tem ou já teve contato com um possível COMUNICANTE da tuberculose? (Se NÃO , pular para a questão 15)	1.SIM 2.NÃO OBS: Explicar comunicante como escola, companheiro, residencia,	
14. Qual tipo de contato?	1.Domiciliar 2.Trabalho 3.Vizinhos 4.Escola 5. Outros	
15. O paciente utiliza ou já utilizou profilaxia (isoniazida profilático)? (Se NÃO , pular para a questão 17)	1.SIM 2.NÃO	
16. Se SIM , por quanto tempo?	1.Um mês 2.Dois meses 3.Três meses 4.Quatro meses 5.Cinco meses 6.Seis meses 7.Não sei/Não lembro	

17. O paciente faz uso de algum medicamento que não seja para tuberculose? (Se NÃO , pular para a questão 19)	1.SIM 2.NÃO	
18. Se SIM, qual ou quais? (especificar)		
19. Grupo no presente estudo	1. Grupo I (Tuberculose sintomática sem tratamento com Baciloscopia +; e/ou cultura +; e/ou TRM (detectado ou +). 2. Grupo II (Assintomático; PPD positivo) 3. Grupo III (Assintomático; PPD negativo) OBS: PPD positivo = maior que 5mm (PNCT)	
20- RAI0_X	1- SIM 2- NÃO 3- NÃO SABE	
21 – Coleta de Escarro e ou saliva-	1- Baciloscopia 2- Cultura para BK 3- Teste Rápido Molecular (TRM) - <i>Gene Xpert® M. TUBERCULOSIS/RIF</i> 4- PCR- Teste Molecular 5-PCR Multiplex – Teste Molecular	
22-Coleta de Lavado brônquico alveolar	1- Baciloscopia 2- Cultura para BK 3- Teste Rápido Molecular (TRM) - <i>Gene Xpert® M. TUBERCULOSIS/RIF</i> 4- PCR- Teste Molecular 5-PCR Multiplex – Teste Molecular	
23-Coleta de Líquidos Cavitários Qual:	1- Baciloscopia 2- Cultura para BK 3- Teste Rápido Molecular (TRM) - <i>Gene Xpert® M. TUBERCULOSIS/RIF</i> 4- PCR- Teste Molecular 5-PCR Multiplex – Teste Molecular	
24- Coleta de Sangue: Soro e Plasma	1-PCR Ultra Sensível 2-Dosagem de Citocinas 3-Cultura para estudo de estímulo Celular 4-IGRA 5-Hemograma 6- Multitest para LT (FACS) 7-Polimorfismo Genético	

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: Análise do perfil clínico-laboratorial de indivíduos com diagnóstico de tuberculose e avaliação da antigenicidade de proteínas de *Mycobacterium sp.* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. CAAE: 57662016.8.1001.5662 .

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, desta pesquisa científica. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra, do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não terá diferença no tratamento ou contato com os pesquisadores. Se tiver alguma dúvida, você deve procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde no telefone 71-3283-8951, na Av. Reitor Miguel Calmon, s/nº, Vale do Canela – Salvador/BA, CEP: 40.110-100.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

1. Instituição. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde (Labimuno/ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA). Endereço: Rua Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela.

2. Título do projeto: Análise do perfil clínico-laboratorial de indivíduos com diagnóstico de tuberculose e avaliação da antigenicidade de proteínas de *Mycobacterium sp.* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

3. Pesquisador Responsável. Profa. Songeli Menezes Freire, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Endereço: Rua Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela.

4. Descrição da pesquisa

4.1 Justificativa. Aproximadamente um terço da população mundial tem tuberculose. Esta doença é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*. A detecção precoce da tuberculose é de extrema importância para saúde pública e para saúde individual. O desenvolvimento da doença, sem sintomas pode aumentar o risco disseminação da bactéria. Apesar de existirem testes de diagnóstico, torna-se interessante o desenvolvimento de outros testes mais atuais, que possam melhorar o diagnóstico e o controle da tuberculose.

4.2 Objetivos. Analisar o perfil clínico-laboratorial de indivíduos com diagnóstico de tuberculose sensível e resistente ao tratamento e avaliar a reatividade de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* em amostras de indivíduos com tuberculose.

4.3 Metodologia. Você está sendo convidado a participar por um dos motivos a seguir: Apresenta queixas e sintomas (febre, tosse e emagrecimento) que sugerem tuberculose (Grupo I da pesquisa),

ou apresenta teste cutâneo positivo (PPD reagente) (grupo II da pesquisa) ou porque não apresenta sintomas de tuberculose e também não apresenta teste cutâneo positivo (PPD reagente) (grupo III da pesquisa). Caso concorde em participar da pesquisa você será entrevistado com perguntas sobre hábitos, costumes e sintomas de queixas clínicas e buscaremos informações adicionais no seu prontuário médico. Faremos a coleta de 12 mL do seu sangue (aproximadamente duas colheres de sopa) que serão utilizados para contagem das células do sangue (leucograma), para os testes laboratoriais de capacidade de resposta às bactérias causadores de doenças relacionadas com a tuberculose e para o desenvolvimento de novos testes.

4.3.1. Armazenamento, utilização e destino final do material biológico (amostra de sangue). As amostras de seu sangue ficarão mantidas congeladas em nosso setor (freezer -20°C ou -70°C) num período de até 5 anos (contado a partir da data de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa) para reutilização nesse mesmo projeto de pesquisa, pois, em alguma eventualidade necessidade de repetição ou de reações com proteínas mais novas do projeto, o mesmo poderá ser resgatado, guardado até publicação dos dados e encerramento do projeto.

A qualquer momento você poderá desistir de participar do estudo e o seu material biológico será descartado devidamente conforme recomendação da ANVISA, interrompendo assim sua participação da pesquisa, sem qualquer prejuízo de seu atendimento no setor.

5. Riscos, prejuízos, desconfortos, lesões que possam decorrer da pesquisa. Os riscos associados a esta coleta de sangue são limitados a pequenos desconfortos no local da punção sanguínea, ou no máximo uma pequena mancha roxa no local da coleta, que serão evitados por coletador de sangue treinado e experiente. Em caso de complicações decorrentes da coleta de sangue você receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita no próprio setor pelos integrantes da equipe medica hospitalar e/ou no Labimuno na UFBA.

6. Benefícios derivados da participação nesta pesquisa. Você não terá nenhum benefício financeiro por sua participação neste estudo, entretanto, caso sejam identificadas alterações nos testes, você será encaminhado(a) a especialista ou continuará em atendimento em unidade especializada de saúde pública, mesmo que desista, de participar deste estudo, em qualquer momento. Caso concorde você poderá buscar os resultados do leucograma no local e período indicados no protocolo que lhe será entregue no momento da coleta para esse projeto. A comunidade poderá futuramente usufruir dos benefícios da melhoria no diagnóstico da tuberculose.

7. Ressarcimento de suas despesas como participante da pesquisa. Para sua participação nesta pesquisa, você já estará no setor de diagnostico onde iremos encontrá-lo, não está previsto gasto financeiro de sua parte.

8. Direito à indenização como participante da pesquisa. Nesta pesquisa não será realizado qualquer procedimento, além da coleta de sangue pelo profissional do setor que lhe atende. Qualquer problema haverá atendimento disponível por especialistas no setor, caso sejam gerados quaisquer danos por sua participação nesta pesquisa. Você será indenizado em caso de danos decorrentes da pesquisa

9. Comitê de Ética em Pesquisa. Tendo como missão zelar pelos aspectos éticos das pesquisas tendo em vista os riscos, os benefícios, e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), dentre outros, o Comitê de Ética em Pesquisa assegura a preservação da dignidade humana, dos direitos dos participantes voluntários das pesquisas e do bem estar. O Comitê, ao qual este projeto será submetido, está localizado no 4º andar do Instituto de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Bahia, endereço: Avenida Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, CEP: 40.110-100

Salvador - Bahia, Telefone: (71) 3283-8951, Email: cepics@ufba.br. Horários de funcionamento: segunda das 13h30 às 19h30 e de terça a sexta das 7h às 13h.

10. Canais de esclarecimento (antes, durante e após a execução do estudo) sobre a própria pesquisa. Sempre que desejar você poderá esclarecer suas dúvidas através do telefone (71) 3332-3341 ou 3235-9682, ramal 200/201.

11. Sigilo em relação à privacidade do sujeito de pesquisa e confidencialidade de seus dados. Os dados obtidos a partir da amostra de seu sangue serão codificados e usados para análise da pesquisa e para divulgação em congressos e revistas médicas, mas os seus dados serão protegidos e jamais será divulgada sua identidade.

Assinatura do PESQUISADOR RESPONSÁVEL

CONSENTIMENTO DO PARTICIPANTE DE PESQUISA

Eu,....., RG nº e CPF nº, abaixo assinado, concordo de maneira livre e esclarecida em participar, na condição de sujeito de pesquisa, do estudo intitulado “Análise do perfil clínico-laboratorial de indivíduos com diagnóstico de tuberculose e avaliação da antigenicidade de proteínas de *Mycobacterium sp. e Corynebacterium pseudotuberculosis*”. Fui devidamente informado (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como sobre os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me assegurado o sigilo, em relação à privacidade do participante de pesquisa, e garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência e/ou tratamento.

Salvador, Bahia, dede

Assinatura : _____

