ALVINA CLARA FELIX

Estudo da resposta imunológica de anticorpos IgG, IgM e IgA, subclasses de IgG (IgG1 e IgG3) e avidez de IgG, por *Western Blotting*, em amostras de soros de pacientes com tuberculose pulmonar e comparação de resultados com métodos microbiológicos e dosagem de interferon-gama

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Felix, Alvina Clara
Estudo da resposta imunológica de anticorpos IgG, IgM e IgA, subclasses de IgG (IgG1 e IgG3) e avidez de IgG, por *Western Blotting*, em amostras de soros de pacientes com tuberculose pulmonar e comparação de resultados com métodos microbiológicos e dosagem de interferon-gama / Alvina Clara Felix. -- São Paulo, 2011.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Antonio Walter Ferreira.

Descritores: 1.Tuberculose pulmonar 2.Western blotting 3.Mycobacterium tuberculosis 4.Marcadores imunológicos

USP/FM/DBD-064/11

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina!”

(Cora Coralina)

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

A minha mãe Vaunide, por todo apoio e sacrifício para que eu chegasse aqui, por sempre apostar em mim e pela dedicação, amor incondicional durante toda essa jornada...

Ao meu pai Alceu (in memorian), pelo amor e ensinamentos e incentivo aos estudos

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira, pelos ensinamentos, incentivo, conselhos, motivação e principalmente pela amizade oferecida ao longo desses 4 anos e que continue após este trabalho.

Aos Drs. Olavo Munhoz, Max Banks, Marcelo Litvoc e Angela Naomi por me receberem no Ambulatório de Tuberculose e me auxiliarem na busca dos pacientes. As enfermeiras Marisa e Marjorie pela ajuda na coleta das amostras e pela boa convivência no ambulatório.

Aos pacientes que aceitaram participar do estudo, sem eles este trabalho não seria possível.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do HC, especialmente a Rosilaine, pela ajuda no cultivo da micobactéria.

Aos meus irmãos Carol e Alceu pela paciência e carinho. Ao meu afilhado Gabriel por alegrar os meus dias. As minhas tias e a minha madrinha pelo apoio, incentivo e carinho dedicados a mim.

As minhas amigas Camila e Cinthia pelas conversas, conselhos e amizade duradoura, essa é mais uma etapa para nosso sucesso!

As “amigas do laboratório” Lília e Carol que se tornaram amigas de uma vida, pelas intermináveis conversas, ajudas nos experimentos e principalmente por todo o incentivo.

As minhas “irmãs” Angeline e Mônica pela amizade sincera e por alegrarem os meus fins de semana. A todos os outros amigos!

A minha eterna professora de Imunologia, Viviana Arruk, por todas as oportunidades, amizade e por me apresentar a sorologia.

A Kelly Kanunfre, pela ajuda e ensinamentos essenciais para a existência deste trabalho.

A Elaine Antunes por me receber no laboratório com muito carinho e por todos os ensinamentos práticos.

A Claudia Galiano, Fabiana Leoratti, Melissa Valin, Janaina Bezerra, Dra. Sandra Moraes, Dra. Carmem Sanchez, Dra. Thelma Okay, Sarita, Jonatas, Cleisson, Vagner, Lilian, Larissa, Flávia, por me receberem no laboratório, pela amizade e convivência durante esse anos.

A Dra. Guita Elefant, pela amizade, ajuda, ensinamentos, conselhos e dicas da qualificação.

Ao Dr. Angelo Lindoso, Dra. Hiro Goto, Dr. Paulo Cotrim e aos colegas do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, Luiza, Marcela, Giovanni, Arianni, Célia, Edna, Juliana, Eduardo, Mussya, Fabrício, Camila, Sandra, D. Nilzete, Nice, Elizabeth, Cristiane, Beatriz, enfim a todos do andar pela boa convivência, troca de experiências e conversas na copa.

As secretárias da pós-graduação, Vânia e Roseli, pela ajuda e por solucionar as minhas dúvidas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para execução do projeto.

A todos aqueles que de certa forma contribuíram para execução deste trabalho.

"Cada pessoa que passa na nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa pela nossa vida passa sozinha, não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Summary

INTRODUÇÃO…… 1

1. Aspectos epidemiológicos…….. 3

2. Agente etiológico…….. 5

3. Patogenia da tuberculose……...…… 10

4. Diagnóstico…….. 14

5. Justificativa……. 26

OBJETIVOS…….. 28

MÉTODOS…… 30

1. Casuística…….. 31

2. Aspectos éticos da pesquisa……. 32

3. Obtenção de antígeno de *M. tuberculosis*…… 33

4. Western blotting…….. 35

5.Quantificação de interferon - gama……. 37

RESULTADOS…… 39

1. Determinação do conteúdo protéico de *M. tuberculosis*…… 40

2. Definição das concentrações de gel e extrato antigênico…….. 41

3. Western blotting……. 41

4. Reconhecimento das frações antigênicas……. 43

5. Desempenho do Western blotting no diagnóstico da tuberculose pulmonar 47

6. Associação dos resultados sorológicos e mirobiológicos…….. 49

DISCUSSÃO……. 56

CONCLUSÃO…….. 64

ANEXOS…… 66

REFERÊNCIAS…… 74

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag	Antígeno
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmete-Guérin
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CFP	Culture Filtrate Proteins
Curva ROC	Receiver Operating Characteristic Curve
Dos R	Dormancy Regulon
DTT	Dietiltreitol
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ensaio imunenzimático)
ESAT	"Early Secretory Antigenic Target"
FDA	Food and Drug Administration
HSP	"Heat Shock Proteins"
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN-g	interferon gama
LR	"Likelihood ratio"
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAB	Proteína Antígeno B
PBP	fosfata ligador a proteínas
PBS	"Phosphate Buffer Saline" - solução salina tamponada com fosfato
PCR	"Polimerase Chain Reaction" (reação em cadeia polimerase)
PMSF	fluoreto de metilfulfonila
PPD	"Purified Protein Derivative"
QTF-G	QuantiFERON TB Gold®
SDS	dodecil sulfato de sódio
TMB	tetrametilbenzidina
WHO	World Health Organization
cm	centímetro
g	aceleração da gravidade
M	molar
mM	milimolar
mg	miligrama
mL	mililitro
µL	microlitro
mm	milímetro
ng	nanograma
W	Watts
kDa	kiloDalton
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	ácido sulfúrico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros sorológicos para anticorpos IgG, IgA e IgM para diferentes reatividades contra frações antigênicas de *M. tuberculosis*	48
Tabela 2	Parâmetros sorológicos para anticorpos subclasse IgG1 e IgG3 para diferentes reatividades contra frações antigênicas de *M. tuberculosis*	49
Tabela 3	Resultados de "Likelihood ratio positivo e negativo para anticorpos IgG, IgM e IgA	50
Tabela 4	Associação dos resultados de Western blotting para anticorpos IgG, baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar	51
Tabela 5	Associação dos resultados de Western blotting para anticorpos IgA, baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar	52
Tabela 6	Associação dos resultados de Western blotting para anticorpos IgM, baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar	52
Tabela 7	Associação dos resultados de Western blotting para anticorpos IgG1, baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar	53
Tabela 8	Associação dos resultados de Western blotting para anticorpos IgG3, baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar	54
Tabela 9	Comparação dos resultados de Western blotting de anticorpos IgG e QuantiFERON TB Gold de 24 pacientes com tuberculose pulmonar	55
Tabela 10	Comparação dos resultados de Western blotting de anticorpos IgA e QuantiFERON TB Gold de 24 pacientes com tuberculose pulmonar	55
Tabela 11	Comparação dos resultados de Western blotting de anticorpos IgM e QuantiFERON TB Gold de 24 pacientes com tuberculose pulmonar	56
Tabela 12	Comparação dos resultados de Western blotting de anticorpos IgG1 e QuantiFERON TB Gold de 24 pacientes com tuberculose pulmonar	56

Tabela 13 Comparação dos resultados de Western blotting de anticorpos IgG3 e QuantiFERON TB Gold de 24 pacientes com tuberculose pulmonar 56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativa da taxa de incidência de TB, 2008	4
Figura 2	Análise do perfil de proteínas do extrato antigênico obtido	40
Figura 3	Comparação entre tempos e temperaturas da reação imunoenzimática	42
Figura 4	Frequência de reconhecimento de frações antigênicas do antígeno protéico de *M. tuberculosis* por anticorpos IgG, IgM e IgA em amostras de soros de pacientes colhidas antes do início do tratamento (1ªam) e ao final do tratamento (2ªam)	44
Figura 5	Frequência de reconhecimento de frações antigênicas do antígeno protéico de *M. tuberculosis* por subclasses de anticorpos IgG: IgG1 e IgG3 em amostras de soros de pacientes colhidas antes do início do tratamento (1ªam) e ao final do tratamento (2ªam).	45
Figura 6	Frequência de reconhecimento de frações antigênicas do antígeno protéico de *M. tuberculosis* de amostras de soros de pacientes colhidas antes do início do tratamento (1ªam) e com o uso de solução de Uréia 8M (1ªav); e ao final do tratamento (2ªam) e uso de solução de Uréia 8M (2ªav)	46

RESUMO

Felix AC. Estudo da resposta imunológica de anticorpos IgG, IgM e IgA, subclasses de IgG (IgG1 e IgG3) e avidez de IgG, por *Western Blotting*, em amostras de soros de pacientes com tuberculose pulmonar e comparação de resultados com métodos microbiológicos e dosagem de interferon-gama.[dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 92p.

Apesar das recomendações da Organização Mundial da Saúde, na reunião ministerial realizada em Amsterdam, Holanda em 2000, a tuberculose continua em ritmo crescente, atingindo principalmente os países em desenvolvimento e pessoas com o sistema imunológico comprometido, principalmente as infectadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida. Os métodos utilizados no diagnóstico continuam os mesmos utilizados por muitos anos, cujas limitações impedem a ação rápida dos programas de saúde que buscam interromper a cadeia de transmissão da doença. Continuando uma linha de pesquisa do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMTSP, utilizando o método do Western Blotting, procuramos neste trabalho ampliar os conhecimentos da resposta imunológica de anticorpos em pacientes com tuberculose pulmonar, clinica e laboratorialmente definida, avaliando a participação das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, subclasses de IgG (IgG1 e IgG3) e a avidez da imunoglobulina IgG em amostras de soros colhidas no início e no final do tratamento. Nossos resultados mostraram que o melhor marcador imunológico foi a imunoglobulina IgG por apresentar melhor desempenho diagnóstico quando comparada com os resultados dos métodos microbiológicos e de dosagem de interferon gama, Quantiferon TB Gold. As frações protéicas que apresentaram melhor desempenho diagnóstico foram as de 38 e 30 KDa.

Descritores: 1. Tuberculose 2. Western Blotting 3. *Mycobacterium. tuberculosis* 4. Marcadores imunológicos

SUMMARY

Felix AC. Study of the immune response of IgG, IgM and IgA, IgG subclasses (IgG1 and IgG3) and IgG avidity by Western blotting in serum samples collected from patients with pulmonary tuberculosis and comparing results with microbiological methods and gamma interferon determination. [dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2011. 92p.

Despite the recommendations of the World Health Organization, during the Ministerial meeting held in Amsterdam, Holland in 2000, tuberculosis continues at an important increasing rate, affecting mostly developing countries and people with severe compromised immune systems, especially those infected with human acquired immunodeficiency virus. The methods used for diagnosis are the same used for many years, whose limitations prevent the rapid action of countries health programs that seek to stop the chain of disease transmission. Continuing a line of research of the Laboratory of Seroepidemiology and Immunobiology of IMTSP using the method of Western blotting, in this study we tried to broaden the knowledge of the immune response of antibodies in patients with pulmonary tuberculosis, clinical and laboratory defined by evaluating the participation of IgG, IgA and IgM, IgG subclasses (IgG1 and IgG3) and immunoglobulin IgG avidity in serum samples collected in the beginning and end of treatment. Our results showed that the immunoglobulin IgG was best immunological marker when compared with the results of microbiological methods and determination of interferon gamma, QuantiFERON TB Gold. The proteins fractions that showed better diagnosis performance were 38 and 30 KDa.

Descriptors: 1. Tuberculosis 2. Western Blotting 3. *Mycobacterium. tuberculosis* 4. Immunological markers

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) afeta a humanidade há pelo menos cerca de 8.000 anos. Até a metade do século XIX o caráter infecto-contagioso da tuberculose não era reconhecido. Em 1882, Robert Koch identificou o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* definindo assim a tuberculose como uma doença infecciosa (Rodrigues et al., 2007).

Apesar de ser uma das doenças infecciosas mais antigas, bem conhecida e vulnerável ao tratamento medicamentoso, a tuberculose permanece como um dos principais agravos à saúde a ser enfrentado em âmbito global (Rodrigues et al., 2007), sendo um problema de saúde pública em países em desenvolvimento e em países industrializados. É uma doença de evolução crônica causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, afetando preferencialmente pulmões mas podendo ocorrer em outros órgãs (Iademarco e Castro, 2003; Zhang, 2005).

A tuberculose pulmonar pode resultar da reativação de uma primo-infecção passada em indivíduos imunocomprometidos ou pode ser decorrente de uma infecção recentemente adquirida (Ferreira et al., 2005). A bactéria é transmitida predominantemente pelo ar, podendo ser veiculada por tosse, espirros ou pela fala, que emitem milhares de partículas, chamadas de perdigotos. As partículas são extremamente pequenas, estimadas entre 1 à 5 micra e podem carregar de 3 à 10 bacilos. Cerca de 6% dos bacilos inalados podem atingir os alvéolos e produzir a doença. Calcula-se que durante um ano, numa comunidade, uma fonte de infecção possa infectar, em média, de dez a quinze pessoas que com ela tiveram contato (Gazetta et al., 2006).

1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006), cerca de 100 milhões de pessoas são infectadas por ano no mundo. Nos países subdesenvolvidos a infecção de adultos chega a índices de 30% a 60%, ou seja, na faixa etária mais produtiva de suas vidas. Do universo de infectados, estima-se que de 8 a 10 milhões de indivíduos desenvolverão a doença durante a vida, sendo que cerca da metade apresentará formas contagiantes.

As tendências de notificações de casos para atualizar as estimativas de incidência, evidenciaram que, em 2008, ocorreram 9,4 milhões de casos novos de tuberculose, equivalentes a 139 casos por 100 000 pessoas. Desses casos incidentes 1,4 milhão (15%) são de pacientes HIV positivos. Foi estimada uma prevalência de 11,1 milhões de casos de TB em 2008, com 1,3 milhões de mortes neste ano, de acordo com a figura 1. A maior parte dos casos ocorreu na Ásia (55%) e África (30%) (WHO, 2009).

Entre os 22 países responsáveis por 80% total de casos de TB no mundo, o Brasil ocupa o 18° lugar. No ano de 2007, a incidência da doença foi de 92 000 novos casos em relação à população total, com uma prevalência de 114 mil casos e mortalidade de 8,4 mil mortes por ano. Apesar dos esforços para a redução das taxas de tuberculose no país elas ainda se encontram acima das metas estabelecidas pela WHO (WHO, 2009).

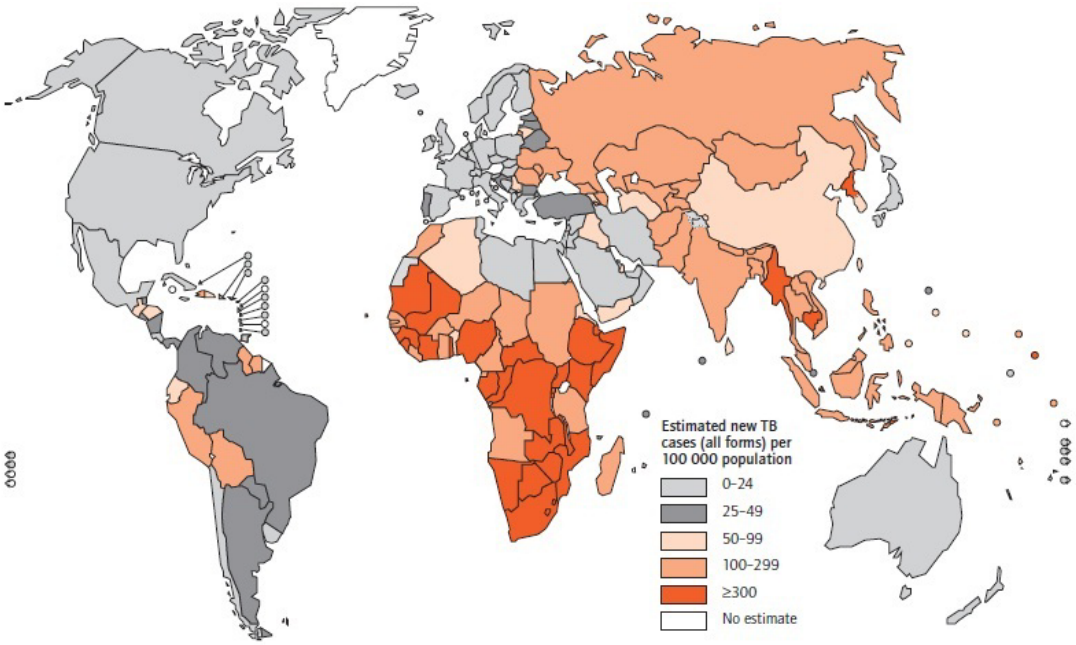

Figura 1: Estimativa da taxa de incidência de TB, 2008.
Fonte: WHO, 2009

De acordo com dados do Ministério da Saúde, o Estado de São Paulo notifica aproximadamente 21.000 casos de TB por ano, que em números absolutos representa o maior contingente de casos do país, contudo o coeficiente de incidência da patologia no Estado (43,9 casos por 100.000 habitantes em 2005), não é o maior do Brasil, situando-se próximo da média nacional, que em 2004, foi de 44,1 por 100.000 habitantes (SÃO PAULO, 2006).

Contribui para o agravamento da situação, o fato desta patologia estar intimamente associada à pobreza, a má distribuição de renda, a urbanização acelerada, aos movimentos migratórios internos e externos, ao envelhecimento da população mundial e à alta taxa de abandono do tratamento. A epidemia da Aids e o surgimento de focos de tuberculose multirresistente (TBMR) têm mobilizado autoridades da área da saúde do mundo todo para a questão da tuberculose no que se refere à necessidade de se empregar medidas eficazes para seu controle (Carvalho et al, 2007; Vendramini et al., 2005; Hijjar et al., 2001).

Caso a gravidade desse quadro não seja revertida, até 2020, mais de um bilhão de pessoas serão infectados, 200 milhões adoecerão e 35 milhões poderão morrer (WHO, 2006).

2. AGENTE ETIOLÓGICO

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único da família *Micobacteriaceae* e estão dentro do domínio *Archea*, filo *Actinobacteria*, Classe *Actinobacteria*, subclasse, *Actinobacteridae*, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae (Brenner et al., 2005). O gênero *Mycobacterium* atualmente está constituído por 130 espécies e 11 subespécies, descritas na lista de espécies bacterianas com nomes aprovados (Euzéby, 2008).

O agente etiológico da tuberculose é o complexo *Mycobacterium tuberculosis constituído por*, *M. tuberculosis* (responsável pela tuberculose humana), *M. bovis* (agente da tuberculose bovina), bacilo de Calmette Guérin (BCG) (variante atenuada do *M. bovis*, utilizado como cepa vacinal), *M. africanum* (tuberculose humana na África) e *M. microtti* (tuberculose em murinos). Tem sido proposta a inclusão de novas espécies neste complexo, como *M. canettii* (uma variante de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália), *M. caprae* (agente etiológico de tuberculose em caprinos), e *M. pinnipedii* (causador da tuberculose em leões marinhos, mas que também pode infectar o homem). Outras espécies, *M. avium, M. cheloneae, M. fortuitum,* podem produzir quadro semelhante à tuberculose. No entanto são consideradas oportunistas e não tuberculosas (Viana-Niero e Leão, 2004; Ernst et al, 2007).

M. tuberculosis é um bacilo delgado, apresentando-se em forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado, com cerca de quatro µm de comprimento e menos de um µm de diâmetro, disposto isoladamente, aos pares ou em pequenos grupos. É obrigatoriamente aeróbio (Dunlap et al, 2000).

As micobactérias possuem uma parede celular de estrutura própria composta de quatro camadas que apresenta uma organização diferente de outros procariotos. O peptideoglicano é a camada mais interna da parede e confere-lhe rigidez, composto por ácido N-glicolilmurâmico em vez de ácido N-acetilmurâmico, encontrado na maioria de outras bactérias. A camada seguinte é o arabinogalactano que se liga ao peptideoglicano através de ligações fosfodiéster. Ligados covalentemente ao arabinogalactano estão os ácidos micólicos que representam cerca de 60% da parede celular micobacteriana, esses constituem-se de lipídios que consistem basicamente de ácidos graxos de cadeia longa incomuns, com 60 a 90 átomos de carbono. A camada mais externa é composta de diferentes lipídeos, incluindo os glicolipídios, sulfolipídios, os fenolglicolipídios, os peptidioglicolipídios e os lipoarabinomanano. A complexidade da parede micobacteriana em particular a riqueza de lipídios complexos explica as propriedades da resistência das micobactérias aos agentes físicos e químicos (Rastogi, 2001).

É esta composição da parede celular rica em lipídeos que confere ao bacilo sua característica de álcool-ácido resistência, permitindo a retenção na sua parede de corantes básicos após a lavagem com solução de álcool-ácido (North e Jung, 2004).

Estes ácidos micólicos formam uma cobertura que permite a micobactéria ser resistente à dessecação, podendo sobreviver por períodos prolongados em

condições extremas. Essa proteção é importante na resistência a antibióticos, pois a grande maioria é incapaz de penetrar a parede celular (Primm et al. 2004).

O genoma de *M. tuberculosis* apresenta tamanho de 4.41 milhões de pares de base e contém aproximadamente 4000 genes, dos quais 52% codificam para proteínas com funções já descritas. Alguns genes também codificam 376 proteínas que não compartilham homologia com outras conhecidas e, portanto, são únicas do bacilo (Camus et al, 2002).

Geneticamente, todos os membros do complexo *M. tuberculosis* são extremamente similares, tendo 99,9% de similaridade à nível de nucleotídeo e idênticas seqüências de 16S rRNA (Brosch et al., 2002). No entanto, estas espécies podem ser diferenciadas com base nos seus hospedeiros, na virulência e nas características fisiológicas. A conservação da seqüência de 16S rRNA, entre todos os membros do complexo de *M. tuberculosis*, tem uma conseqüência prática importante: todas as técnicas desenvolvidas podem ser adaptadas às outras (Hadad et al.,2004).

Após o sequenciamento gênico do *M. tuberculosis*, tem sido possível investigar proteínas que podem estar envolvidas na patogenicidade, virulência ou mecanismos de evasão do bacilo. Até o momento, um grande número dessas proteínas foi identificado, sendo que muitas delas têm funções definidas (Camus et al., 2002).

Uma das proteínas largamente estudadas são as CFPs (do inglês *Culture Filtrate Proteins*) são proteínas do filtrado de cultura do *M. tuberculosis* e acredita-se que contenham em torno de 200 proteínas diferentes (Sable et al., 2005a). Essas proteínas são secretadas pelo bacilo e parecem ter uma grande capacidade de estimular a resposta do hospedeiro. Dentre essas proteínas, está a CFP 10

(Rv3874), uma proteína de 10kDa (10 kilo Daltons) e o ESAT-6 (Rv3875) com peso molecular de 6kDa, (do inglês *Early Secretory Antigenic Target* 6), caracterizado por Sorensen et al. (1995). Ambas as proteínas são codificadas na região RD-1 do gene (do inglês *Regions of Difference* 1) conservada em todas as cepas clínicas e virulentas de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, ausente na cepa *M. bovis* - BCG e na maioria das micobactérias ambientais (exceto *M. kansasii, M. szulgai, M. flavescense M. marinun*) (Mahairas et al., 1996; Goletti et al., 2006). Um trabalho utilizando a cepa H37Rv do *M. tuberculosis*, correlaciona essa região com a virulência do bacilo, pois ao ser deletada, há uma atenuação da virulência. Isso pode ser observado *in vitro*, em macrófagos humanos infectados com a cepa H37Rv deletada na região RD1, que foi bem menos virulenta, muito semelhante ao *M. bovis* BCG. Esses resultados foram confirmados em modelo animal, camundongos C57BL/6 (Lewis et al., 2003). Tan et al., (2006), demonstraram *in vitro* que a inativação de genes que codificam ESAT-6 e CFP-10 resulta em baixo crescimento da micobactéria dentro de macrófagos.

Os microrganismos expostos a condições adversas à sua sobrevivência, como altas temperaturas, presença de toxinas, depleção de oxigênio, carência de nutrientes, entre outras, apresentam elevada síntese de proteínas de choque térmico ("heat shock proteins" - Hsp). Diversas Hsp envolvidas na sobrevivência do patógeno em um ambiente hostil têm sido descritas (Mehrotra e Bishai, 2001). Uma região genômica do *M. tuberculosis* foi caracterizada como "Dormancy Regulon" (DosR), a qual compreende 48 genes. Esses podem estar relacionados à adaptação do *M. tuberculosis* à gradual depleção de oxigênio e baixas doses de óxido nítrico (NO) (Sherman et al., 2001; Voskuil et al., 2003). Porém, a função da maioria das proteínas codificadas pela região DosR são desconhecidas (Yuan et al., 1996; Park

et al., 2003). Estudos sobre a cultura desses bacilos em condições de depleção de oxigênio mostram que a HspX, também conhecida como proteína 16-kDa ou alfa-cristalina homóloga (Acr ou Rv2031c) (Verbon et al., 1999), é altamente expressa durante este estado (Yuan et al., 1996; Rosenkrands et al., 2002). Durante esta fase não-replicativa e de depleção de oxigênio, a expressão da proteína 16kDa pode chegar até 25% do total de proteínas micobaterianas expressas nessas circunstâncias (Caccamo et al., 2002). O HspX tem ação também de chaperonina, auxiliando na conformação final das proteínas (Qamra et al., 2005).

O Complexo antigênico 85 (Ag 85) é composto por três proteínas secretadas: Ag 85A (Rv3804c), Ag 85B (Rv1886c), Ag 85C (Rv0129c), codificadas pelos genes *FbpA, FbpB* e *FbpC2* respectivamente, com peso molecular entre 30-32 kDa. Possuem atividade micolil transferase, participando da síntese de ácido micólico, que constitui a parede celular da bactéria, contribuindo para a manutenção da integridade da parede e a patogênese da tuberculose. A inibição da transcrição dos componentes do complexo Ag 85 parece reduzir o crescimento do *M. tuberculosis* em cultura (Harth et al., 2002). A deleção do gene que codifica o Ag 85A resulta em diminuição da replicação da micobactéria dentro de macrófagos *in vitro* (Armitige et al., 2000).

O antígeno MPT-51 (Rv3803c) é uma proteína de 27kDa, codificado pelo gene *fbpC1,* adjacente ao gene *fbpA* do *M. tuberculosis*. Alguns pesquisadores sugerem que o MPT-51 pode ser um quarto componente do complexo Ag 85 (Nagai et al., 1991 e Rambukkana et al., 1993). Contudo, há indícios que o MPT-51 sofreu mutações em seus resíduos catalíticos, não possuindo atividade micolil transferase, embora possua 40% de homologia com os membros do complexo Ag 85 (Rinke de Wit et al., 1993; Wilson et al., 2003, 2004). Assim, parece que o MPT-51 possui

funções distintas dos componentes do complexo Ag 85, representando uma nova família com atividade não catalítica α/β hidrolases, mas com habilidade de se ligar a fibronectina (Kitaura et al., 2000).

A proteína de 38kDa também denominada de antígeno 78, antígeno 5 ou proteína antígeno B (PAB) é uma proteína específica do *M tuberculosis* e é o imunógeno mais importante desta micobactéria (Kadival et al., 1987; Haslov et al., 1990; Harboe e Wiker, 1992)

Clonagem e o sequecinamento do gene que codifica a proteína de 38kDa revelou 30% de identidade seqüencial com o fosfato ligador a proteínas (PBP, também designado Phos ou PSTs) de Escherichia coli (Andersen e Hansen, 1989; Surin et al., 1984; Magota et al., 1984). A proteína de 38kDa é uma lipoproteína (Harboe e Wiker, 1992). Esta proteína pode estar envolvida ao metabolismo do fosfato, servindo como receptor inicial e tornando o fosfato disponível ao bacilo (Zengy et al., 1994; Andersen et al., 1990)

3. PATOGENIA DA TUBERCULOSE

Ao tossir, indivíduos infectados com tuberculose ativa liberam partículas de aerossol contendo bacilos viáveis, os quais podem ser inalados por outros indivíduos. Estas partículas alcançam as vias aéreas do hospedeiro, estabelecendo aí a infecção (von Reyn e Vuola, 2002; Bodnar et al., 2001). Existem quatro fases na tuberculose pulmonar iniciando-se com a inalação dos bacilos. É descrito que as primeiras células presentes no local da infecção que interagem com o bacilo são os macrófagos alveolares e as células dendríticas. A fagocitose de *M. tuberculosis* por estas células representa a ativação dos primeiros mecanismos de defesa da

resposta inata, e também o início da ativação da resposta imune adaptativa. Os macrófagos alveolares ao fagocitarem a micobactéria podem eliminar a infecção, o que vai depender da capacidade de fatores intrínsecos do hospedeiro e da capacidade bactericida da micobactéria (Ulrichs e Kaufmann, 2006; van Crevel et al., 2002).

Após a fagocitose, inicia-se então uma cascata de eventos resultando na diminuição da carga de bacilos, na maioria dos casos (cerca de 90%), mas em indivíduos com o sistema imune debilitado, a TB pode progredir (Frieden et al., 2003). A infecção ocorre em aproximadamente um terço dos indivíduos expostos ao bacilo da tuberculose, e destes, apenas 10% tornam-se sintomáticos (Mathema et al., 2006). A infecção, então, se instala na dependência da virulência dos bacilos e da atividade microbicida dos macrófagos, já que a bactéria dispõe de mecanismos específicos para evitar sua destruição nos fagossomos desses macrófagos (Hernandez et al., 2008).

Micobactérias que conseguem escapar do sistema imune multiplicam-se, nos macrófagos, atraindo monócitos e outras células do sistema imune ao pulmão, dando início a segunda fase, onde as micobactérias crescem em fase logarítmica, com poucos danos teciduais e formação de tubérculos. Duas a três semanas após o início da infecção, linfócitos T desenvolvem-se com antígenos específicos e migram até o local da lesão ativam os macrófagos para matar as micobactérias intracelulares (vann Crevel et al, 2002). A infecção concomitante de células dendríticas pulmonares, que migram para o linfonodo drenante, leva a estimulação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ que, ao serem recrutados para o local da infecção, auxiliam na ativação de macrófagos infectados e favorecem a eliminação de bacilos (Ulrichs e Kaufmann, 2006).

À medida que a quantidade de bacilos aumenta, atrai novas células de defesa e desencadeiam resposta imunológica celular específica, que será crítica para impedir o avanço do processo infeccioso. Dentro dos macrófagos, as bactérias podem se dispersar pela via linfática a outros órgãos, como rins, cérebro, ossos e lobos superiores dos pulmões, os quais oferecem condições favoráveis para a replicação bacteriana, a qual ocorrerá até que se desenvolva o processo imunológico célula-mediado, no hospedeiro (Bierrenbach et al., 2007; Ferraz et al., 2006).

A eliminação do bacilo depende do sucesso da interação entre macrófagos infectados e linfócitos T. Como em imunodeficiências adquiridas, especialmente na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a tuberculose demonstrou a importância de uma imunidade celular. Células T $CD4^+$ exercem seu efeito protetor através da produção de citocinas, principalmente Interferon-γ (IFN-γ), depois de estimuladas pelas micobacterias (van Crevel et al, 2002).

Nesta fase da infecção, conhecida como *tuberculose primária*, os indivíduos acometidos geralmente não apresentam qualquer alteração clínica. Menos comumente, os mecanismos de defesa iniciais podem não ser inteiramente eficazes e possibilitar o avanço do foco pulmonar primário, que aumenta progressivamente, sofre necrose central e pode disseminar-se pelo restante dos pulmões (*broncopneumonia*) e para a cavidade pleural que envolve os pulmões (*tuberculose pulmonar primária progressiva*). Estes indivíduos, que constituem a minoria dos infectados, apresentam manifestações precoces como febre alta, prostração intensa, sudorese noturna e tosse (Ferraz et al., 2006).

Na maioria dos infectados a resposta imune celular específica é geralmente capaz de deter o agente infeccioso, no entanto, alguns bacilos persistem viáveis

num estado de latência, multiplicando-se muito lentamente (terceira fase) (van Crevel et al, 2002).

A persistência destes focos latentes na maioria dos pacientes infectados (cerca de 90%) permanece assintomática pelo resto da vida. Em alguns casos, estes focos latentes podem ser reativados, meses ou anos após a infecção primária, ocorrendo novamente multiplicação rápida da bactéria, o que resulta em manifestações clínicas da doença (*tuberculose pós-primária* – quarta fase). O período entre o contato inicial e as manifestações clínicas da doença é, em geral, prolongado (meses, anos). No primeiro ano após a infecção cerca de 3 a 4% dos indivíduos adoecem (Ferraz et al., 2006).

A BCG, vacina produzida com o bacilo Calmette-Guérin, é a única vacina disponível para a prevenção da tuberculose em humanos. Ela é produzida a partir de uma cepa atenuada, e já foi dada a mais de 2,5 bilhões de pessoas desde 1948, promovendo tanto uma resposta imune humoral como mediada por células. Embora a BCG forneça proteção clara em crianças quando administrada no período neonatal, em adultos, devido a razões ainda pouco esclarecidas, ela varia muito. O nível de proteção difere de acordo com a forma da tuberculose pulmonar; pela co-infecção com o HIV e entre diferentes populações, não apresentando nenhuma proteção na Índia e de 50-80% de proteção no Reino Unido (Palomino, Leão e Ritacco, 2007).

Na falta de uma vacina homogeneamente eficaz e tendo em vista que a maior fonte de infecção são os indivíduos doentes, o melhor recurso de prevenção disponível no sistema de saúde continua sendo a detecção precoce e o tratamento dos casos (Rodrigues et al., 2007).

4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tuberculose está baseado em achados clínicos e exames laboratoriais. Entre eles estão os métodos tradicionais microbiológicos (baciloscopia e cultura), métodos de imagem (Raios X, Tomografia Computadorizada, Ressonância Nuclear Magnética e outros métodos de medicina nuclear), prova tuberculínica (PPD), anátomo patológico (histológico e citológico), bioquímico, métodos sorológicos e de biologia molecular.

4.1 Diagnóstico Microbiológico

Reconhecidamente, a pesquisa bacteriológica é o método prioritário, quer para o diagnóstico, quer para o controle do tratamento da tuberculose, além de permitir a identificação da principal fonte de infecção: o paciente bacilífero.

A confirmação do diagnóstico é obtida através da baciloscopia e/ou cultura. A baciloscopia identifica os Bacilos-Álcool-Ácido-Resistentes (BAAR). É um método diagnóstico rápido e barato, eleito pelos serviços de saúde pública, mas que apresenta uma baixa sensibilidade em indivíduos paucibacilares. A cultura tem alta sensibilidade, mas a reprodução do bacilo é lenta. Dessa forma, o diagnóstico define-se em 4 a 8 semanas, o que pode influenciar no controle da endemia, pois o diagnóstico precoce interromperá o ciclo de transmissão da doença (Ferreira et al. 2005).

A baciloscopia é o método utilizado para o diagnóstico e controle durante o tratamento da TB. O principal método para a pesquisa de bacilos no escarro é o

Ziehl-Neelsen (ZN), que se baseia na coloração, a quente, com fucsina fenicada, seguida de descoloramento com álcool-ácido, fazendo com que somente as micobactérias mantenham a coloração vermelha, por serem ácido-resistentes. A técnica de fluorescência, com auramina, apresenta a mesma acurácia do ZN, com tempo de leitura menor, mas é pouco empregada, pois exige pessoal treinado e tem custo mais elevado (Teixeira et al, 2007).

A baciloscopia apesar de sua simplicidade e baixo custo, tem como principal desvantagem o fato de ser negativa em 50% dos casos de pessoas infectadas com *M. tuberculosis*. A sensibilidade analítica da baciloscopia é limitada pela detecção de 5000 bacilos/mL de escarro (Ganguly, 2002; Cooksey, 2003; Garg et al., 2003; II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004; WHO/TDR/FIND 2006).

A cultura microbiológica, geralmente empregada em casos pulmonares suspeitos e negativos a baciloscopia, tem a vantagem de permitir a detecção, o isolamento e a identificação da espécie e/ou do complexo isolado, e a determinação da sensibilidade do microrganismo aos quimioterápicos (Teixeira et al, 2007).

Os principais meios de cultura utilizados são o de Löwenstein-Jensen (meio sólido à base de ovo), e o Middlebrook (sólido ou líquido, à base de ágar). Apesar de sua importância, a cultura do *M. tuberculosis* é um processo demorado, pois o bacilo tem um crescimento lento e nem sempre apresenta 100% de positividade. Os sistemas automatizados para detecção de micobactérias como BACTEC 460 TB ®, BACTEC 9000® e o MGIT® são promissores, utilizam meios enriquecidos que promovem a aceleração do crescimento bacteriano, mas podem também indicar resultados falso-positivos devido à contaminação por outras bactérias (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004; WHO/TDR/FIND 2006; Amin, 2006; Dorronsoro e Torroba, 2007).

Além do escarro, a baciloscopia e a cultura podem ser feitas no aspirado gástrico, lavado bronco-alveolar, biópsia transbronquial, urina, sangue, líquor, líquido pleural e peritoneal.

4.2 Métodos de Imagem:

O exame radiológico de tórax é indicado como método auxiliar no diagnóstico da TB em pacientes sintomáticos e negativos a baciloscopia, em familiares de pacientes bacilíferos, e mesmo em suspeitos de TB extrapulmonar. Alterações radiológicas aumentam a suspeita da doença e podem mostrar padrões característicos, como infiltração do lobo superior com cavitação, doença miliar e complexo primário. No Brasil, cerca de 30% dos pacientes são tratados sem confirmação para tuberculose pulmonar, com base apenas no quadro clínico-radiológico (Ferreira et al, 2005; Teixeira et al, 2007).

Algumas das características típicas apresentadas no Raio-X podem ser: localização da infiltração, que é geralmente nas zonas pulmonares superiores, presença de infiltrados, normalmente fibro-nodular, cavidades com paredes espessas e ligeiramente irregular e perda rápida de volume no segmento ou lobo. De acordo com critérios da Associação de Tuberculose dos Estados Unidos, com base nos achados radiológicos a gravidade da tuberculose pulmonar pode ser classificada em: leve, moderada e avançada e muito avançada. Suave ou doença mínima apresenta-se com menos de um lobo de envolvimento do pulmão. Casos moderados e avançados são aqueles que apresentam uma área de infiltração em um lobo do pulmão e/ou uma cavidade inferior a 4 cm de diâmetro. Casos muito avançados envolvem áreas mais amplas e/ou cavidades de mais de 4 cm de

diâmetro. Em casos difíceis de diagnosticar a tomografia computadorizada pode ser útil (Amin, 2006).

4.3 Diagnóstico Imunológico

4.3.1 Sorologia

O diagnóstico sorológico é um dos métodos imunológicos que vem sendo estudado. Este método é baseado na detecção de anticorpos específicos no soro ou outros fluidos do corpo, pois foi reconhecido que pacientes com tuberculose produzem grandes quantidades deste anticorpo. Embora este método possa ser uma estratégia promissora para simples e rápido diagnóstico aplicável para uso em campo, a falta de antígenos específicos de *M. tuberculosis* tem dificultado o desenvolvimentos de tais testes com alta sensibilidade e especificidade (Amin, 2006).

Existe atualmente uma evolução no diagnóstico sorológico com a possibilidade de uso de antígenos purificados, protéicos ou glicolipídeos, na tentativa de se alcançar maiores índices de sensibilidade e especificidade dos testes para o *M. tuberculosis*. Porém, vários fatores estão associados ao limitado rendimento dos testes sorológicos avaliados até hoje: técnica sorológica, tipo de antígeno empregado, classe de imunoglobulina pesquisada, população estudada, situação imunológica, variações genéticas individuais, possibilidade de sensibilização prévia com outras micobactérias, produção de diferentes classes de anticorpos em momentos distintos da doença (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004).

De acordo com as determinações da Organização Mundial da Saúde os testes sorológicos para o diagnóstico de tuberculose devem apresentar índices de sensibilidade e especificidade iguais ou superiores a respectivamente 80% e 95%.

Os ensaios sorológicos podem dosar anticorpos das classes IgG, IgM e IgA, na tentativa de avaliar qual ou quais anticorpos são secretados nas diferentes fases da doença, que possam caracterizar a tuberculose. As pesquisas têm sugerido que os antígenos de baixo peso molecular apresentam melhor imunodominância, tais como o CFP-10, CFP-21, MPT-51, ESAT-6, MPT-63, MPT-64, GlcB, GroES, HspX e o Antígeno 85 entre outros (Sable et al., 2005b).

O teste mais estudado para o diagnóstico sorológico é a técnica de ELISA, pelo baixo custo e capacidade de automação. Singh et al. (2003) avaliaram a resposta humoral por ELISA a dois antígenos: MPT-32 e GlcB de pacientes com tuberculose pulmonar ativa. A sensibilidade do teste foi de 68% (MPT-32) e 75% (GlcB). Conde et. al. (2004) estudaram pacientes com tuberculose pulmonar ativa e contato para avaliação sérica de IgA e IgG contra o antígeno P-90 e observaram que IgA, apresentou sensibilidade (74%) e especificidade (68%) maiores no teste, do que para IgG, sensibilidade 69% e especificidade 64%. No entanto para os dois anticorpos houve resultados falso-positivos no grupo dos controles saudáveis.

Raja et. al (2004), avaliaram o reconhecimento do antígeno 85B (Ag 30kDa) por ELISA estudando anticorpos da classe IgG, IgA e IgM, de indivíduos com tuberculose pulmonar. A sensibilidade do teste de 67,4% para IgG, 14,8% para IgA e 14,3% para IgM, e especificidade de 99%, 96,7% e 92% respectivamente.

Wang et al. (2005), mostraram a resposta do anticorpo IgM aos antígenos CFP-21, ESAT-6, MPT-63 e MPT-64, obtendo sensibilidade de 34,6%, 60,3%, 52,6%, 78,2% respectivamente e para o anticorpo IgG foi 46,2%, 64,1%, 93,6%,

57,7%. Quando o ensaio ELISA foi realizado com todos os antígenos associados essa porcentagem aumentou 96,2% (IgM) e 84,6% (IgG), sugerindo que a combinação de um ou mais antígenos pode aumentar a acurácia do teste.

Bezerra et al., (2009), avaliou o desempenho da técnica de ELISA para a detecção de anticorpos IgA contra o *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes preparações antigênicas, cepa clínica obtida em cultura, antígeno recombinante TbF6/DPEP e antígeno glicolipídico. Foram utilizadas amostras de soros de 49 pacientes com tuberculose pulmonar, coletadas antes e após o início do tratamento específico. Os controles consistiram de amostras de soro de pacientes saudáveis, sem qualquer contato prévio com a bactéria e as amostras de soro de pacientes com outras pneumopatias. O melhor desempenho diagnóstico foi obtido com o antígeno glicolipídico, com uma sensibilidade de 88% e especificidade variando de 88 a 100% no grupo controle.

Mizusawa e colaboradores (2008) estudaram o teste de ELISA com antígeno glicolipídico de *M. tuberculosis*, antígeno da parede celular muito utilizado em testes sorológicos. Foram avaliados anticorpos IgA e IgG anti *M. tuberculosis* em amostras de sangue de pacientes com tuberculose pulmonar ativa microbiologicamente confirmados, desses 59 apresentaram lesões cavitárias em radiografias de tórax, esses pacientes apresentaram níveis mais elevados de anti-IgA e anti-IgG em relação aos outros pacientes estudados.

Estudo realizado para determinar a avidez de anticorpos para *Mycobacterium tuberculosis* de 22 pacientes com tuberculose pulmonar antes e durante o tratamento e 24 pacientes com outras doenças pulmonares. O teste realizado foi ELISA com antígeno sonicado de *M. tuberculosis* Os níveis de anticorpos IgG e avidez foram significativamente maiores em pacientes com tuberculose não tratados

do que no controles. Pacientes com tuberculose, com uma longa duração dos sintomas tinham maior avidez de anticorpos do que aqueles com um recente início dos sintomas, indicando a maturação de afinidade de anticorpos específicos durante a doença ativa. No início do tratamento, uma diminuição da avidez dos anticorpos foi observada para 73% dos pacientes com tuberculose, acompanhado por um aumento inicial nos níveis de anticorpos IgG em 36% desses pacientes. (Arias-Bouda et al., 2003).

Gupta e colaboradores (2005), estudaram a resposta de anticorpos IgG subclasses por ELISA em 104 indivíduos, sendo 79 pacientes com tuberculose pulmonar e 25 indivíduos saudáveis. Os casos novos de tuberculose apresentaram aumento de anticorpos IgG1 e IgG3, observados com o aumento da carga bacilar. Recidivas e casos crônicos também mostraram aumento IgG1 e IgG3, enquanto a positividade para IgG2 foi diminuída. Os casos crônicos mostraram um aumento moderado de anticorpos IgG4. Assim, IgG1 e IgG3 foram predominantes em todas as formas de tuberculose.

A imunocromatografia é também um teste sorológico rápido que pesquisa anticorpos específicos para antígenos do *M. tuberculosis*, porém apresenta a desvantagem do custo elevado. Um teste de imunocromatografia detectando anticorpos IgG contra antígenos do *M. tuberculosis*, usando sangue total, plasma e soro. Os melhores resultados foram obtidos na dosagem realizada no soro, onde a sensibilidade do teste foi de 65% e especificidade de 67% (Gounder et al., 2002). Outro trabalho utilizando cinco antígenos, incluindo o de 38kDa teve uma sensibilidade de 33,3% e especificidade de 100% em estudos prévios realizados com o soro de pacientes com tuberculose pulmonar da Turquia. Os índices foram calculados comparados com a pesquisa de BAAR no escarro (Ongut et al., 2006).

Além da pesquisa de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos (ELISA e imunocromatográficos) para o diagnóstico da tuberculose, muitos estudos têm sido realizados para tentar determinar perfis de reatividade sorológicos por “Western-Blotting”, que possibilitem caracterizar a presença da tuberculose ativa ou indiquem fase ou extensão da doença. Resultados mais promissores foram observados com antígenos de baixo peso molecular, uma vez que estudos realizados por “Western-Blotting” demonstraram maior especificidade para antígenos de *M. tuberculosis* situados na região entre 43 e 6 kDa (Bassey et al., 1996).

Franco et. al, 2001 estudaram o Western Blotting contra antígeno H37Rv sonicada, foram analisados 43 pacientes com tuberculose pulmonar ativa. Foram obtidas respostas de anticorpos dirigido contra quatro frações antigênicas com massas moleculares de 71, 65, 26-38 e 19 kDa.

Beck et al. (2005a) verificaram que a reatividade de anticorpos IgG contra as frações proteínas de 6 e 16 kDa, 6 e 38 kDa, 16 e 38 kDa em indivíduos contactantes sugere a presença de tuberculose latente com um mau prognóstico, ou seja, com um risco maior de desenvolver a doença ativa já que a reatividade com esses perfis estava ausente em indivíduos sadios e em indivíduos com outras pneumopatias não tuberculosas e presentes nos pacientes com tuberculose ativa.

Beck et al. (2005b) associaram os resultados dos testes ELISA TBF6®/DPEP® e “Western-Blotting” em 52 pacientes com tuberculose pulmonar ativa e obtiveram uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 100%, sendo o grupo controle composto de 22 indivíduos sadios e 30 pacientes com outras pneumopatias que não tuberculose. Os autores sugerem que a utilização dos testes pode auxiliar na elucidação de casos onde os métodos microbiológicos tradicionais não são suficientes para o diagnóstico da doença.

Kanunfre (2007) avaliou o desempenho diagnóstico do método de “Western-Blotting” para pesquisa de anticorpos IgG anti – *Mycobacterium tuberculosis* em 31 pacientes com tuberculose pulmonar diagnosticados por critérios clínicos e laboratoriais. Os resultados mostraram que o Western Blotting apresentou sensibilidade de 94% e especificidade de 96% no diagnóstico da tuberculose pulmonar, atendendo os requisitos da OMS para testes sorológicos. Os resultados do Western Blotting quando associados com a baciloscopia obteve sensibilidade superior a 95%; e quando associados à cultura a sensibilidade encontrada foi de 100%. O Western Blotting demonstrou ser uma ferramenta útil como auxiliar no diagnóstico da tuberculose pulmonar mesmo em pacientes com baciloscopia negativa.

Apesar dos estudos realizados, até o momento nenhum teste sorológico é recomendado pela Comunidade Internacional de Tuberculose, para ser utilizado na rotina clínico-laboratorial de investigação da tuberculose (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004; API TB Consensus Guidelines 2006; WHO/TDR/FIND 2006).

4.3.2 Prova Tuberculínica

A prova tuberculínica (PPD) também faz parte dos métodos de abordagem diagnóstica e estaria indicada como método de triagem para o diagnóstico de tuberculose. A prova tuberculínica, isoladamente, indica apenas infecção e não é suficiente para o diagnóstico de tuberculose doença (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004; Teixeira et al., 2007).

Conhecido como teste de Mantoux, consiste na reação intradérmica à inoculação de 0,1 mL de tuberculina ou PPD na face anterior do antebraço. O teste é

considerado negativo para pacientes que desenvolvem uma área endurecida entre 0 e 5 mm de diâmetro no local da injeção 48 horas após, fraco reatos para áreas entre 5 e 10 mm e fortemente reator para áreas acima de 10 mm (Ducati et al., 2005).

A prova tuberculínica deve ser interpretada de forma especial nas pessoas vacinadas com BCG há menos dois ou três anos. Outras situações que podem interferir no resultado: a) doenças imunodepressoras, neoplasias malignas e linfoproliferativas; b) vacinação com vírus vivos; c) gravidez; d) tratamento com corticóides e imunodepressores; e) crianças com menos de dois meses de idade; f) pessoas com mais de 65 anos de idade (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004).

O fato de o PPD ainda continuar em uso, não obstante essas limitações revelam a necessidade urgente de viabilizar testes mais precisos para o diagnóstico da TB.

4.3.3 Detecção e quantificação de Interferon–Gama (IFN-γ):

Os testes imunológicos relacionados à produção de interferon-gama (IFN-γ) por células T, em resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis*, vêm sendo desenvolvidos na tentativa de substituir o PPD. Uma alta produção de IFN-γ em resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis* indica sensibilização prévia, mas não necessariamente implica em doença ativa. Dois testes baseados na produção de IFN-γ por linfócitos T em cultura utilizando antígenos do M. tuberculosis, estão disponíveis comercialmente (Pai, Reley e Colford, 2004).

O primeiro deles é “QuantiFERON®” (Cellestis Limited, Austrália) aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) em 2001 e que usava como antígeno o PPD, já a segunda versão do teste, “QuantiFERON® - TB Gold” (QTF-G) aprovado em 2004 pela FDA, se diferencia do teste anterior por usar antígenos específicos do *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10). Este teste baseia-se na detecção de IFN-γ produzido por amostras de sangue periférico, cultivadas em placas previamente preparadas, e o sobrenadante é analisado através do método de ELISA. Outro teste também desenvolvido a partir da detecção de IFN-γ é o ELISPOT (“Enzyme Linked Immunospot Assay”) onde o número de células produtoras de IFN-γ específicas para um determinado antígeno pode ser quantificado, o T SOPT.TB® (Oxford Immunotec, Oxon, UK) baseado neste mesmo método espera aprovação pela FDA (Kobashi et. al, 2008; Pai, Reley e Colford, 2004).

Oznur et. al (2009), avaliaram o teste QuantiFERON-TB Gold em comparação ao teste de PPD em 44 pacientes com tuberculose pulmonar e 21 pacientes com tuberculose extrapulmonar. QuantiFERON-TB Gold foi positivo em 75% dos casos de tuberculose pulmonar e em 76,2% nos pacientes com tuberculose extrapulmonar, já o PPD foi positivo em 68,2 e 62% respectivamente dos casos. Estes resultados demonstram um melhor desempenho do QuantiFERON-TB Gold em relação ao uso do PPD.

A utilização do ensaio QuantiFERON-TB Gold como um auxílio no diagnóstico de TB pulmonar foi testada na população brasileira em 32 pacientes com tuberculose pulmonar ativa e 23 indivíduos saudáveis com teste tuberculínico negativo formaram o grupo controle. Usando a curva ROC (*Receiver Operation Curve*), uma medida de precisão para a definição de *cut off*, o corte foi ajustado para ≥ 0,20 UI / ml. A sensibilidade aumentou para 86%, com 100% de especificidade,

atendendo aos critérios exigidos pela OMS. Todos os pacientes com TB com baciloscopia negativa e cultura negativa apresentaram resultados positivos com este teste (KANUNFRE et al., 2008).

Alguns estudos demonstram que os testes de detecção de IFN-γ demonstraram índices de sensibilidade abaixo de sensibilidade variáveis e em alguns estudos abaixo do índice preconizado pela OMS (Lee et al., 2006; Ferrara et al., 2006; Tsiouris et al., 2006; Dewan et al., 2007).

4.4 Diagnóstico Molecular

Os testes moleculares para o diagnóstico da TB são baseados na amplificação e detecção de sequências específicas de ácidos nucléicos do complexo *M tuberculosis* em amostras clínicas, fornecendo resultados em 24-48 h. Os sistemas desenvolvidos em laboratórios de pesquisa, de caráter manual, são denominados *in house*. Alguns sistemas já estão comercialmente disponíveis sob a forma de *kits* padronizados (Mello et al., 2005; Palomino, 2005; Flores et al., 2005).

A acurácia de diferentes métodos moleculares *in house* para o diagnóstico da TB pulmonar é heterogênea. Os métodos comerciais apresentam elevadas sensibilidade (96%) e especificidade (85%) em amostras com pesquisa de BAAR positiva, mas limitada sensibilidade (66%), apesar de alta especificidade (98%), em amostras BAAR negativas. Na prática clínica, os testes moleculares permitem o diagnóstico precoce de TB em cerca de 60% dos casos com BAAR negativo (e posterior cultura positiva) e a diferenciação entre TB e micobactérias não tuberculosas (MNTB) em pacientes com BAAR positivo (em regiões com alta

prevalência de doença pulmonar por MNTB) (III Diretrizes Brasileiras de Tuberculose, 2009).

Os testes moleculares foram aprovados pelo FDA apenas para uso em amostras respiratórias, ou seja, para a investigação de TB pulmonar. Os testes não devem ser utilizados para o monitoramento do tratamento e não substituem o exame de cultura para micobactérias (CDC, 2009).

Estudos de acurácia de novos métodos estão sendo testados no Brasil para a validação para diagnóstico, como por exemplo, o método com fita GenoType® MTBDR (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha) e GeneXpert®System (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) (III Diretrizes Brasileiras de Tuberculose, 2009).

5. JUSTIFICATIVA

A tuberculose humana continua aumentando no mundo inteiro e preocupando as autoridades sanitárias que clamam por recursos inovadores que possam controlar a doença. Métodos microbiológicos tradicionais, recomendados pelo Consenso Brasileiro de TB (2009), apresentam limitações tanto na sensibilidade como na especificidade, o que dificulta o diagnóstico precoce para instituição de um tratamento rápido e eficaz.

Nos últimos dez anos o Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMTSP, tem dedicado parte de seu desenvolvimento em inovação laboratorial em projetos envolvendo pacientes com tuberculose pulmonar, em parceria com a Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas FMUSP.

Duas teses de doutorado e uma dissertação de mestrado foram concluídas e os resultados obtidos abriram novas perspectivas para o diagnóstico imunológico e monitoramento de pacientes ambulatoriais. Neste trabalho procuramos ampliar nossos estudos para um melhor conhecimento da resposta imunológica dos pacientes, avaliando as diferentes classes de imunoglobulinas, subclasses IgG1 e IgG3 e a avidez de anticorpos IgG, contra diferentes componentes antigênicos de *M. tuberculosis* por Wester Blotting.

Procuramos também associar os resultados com os obtidos pelo método QuantiFERON TB Gold® como tentativa para aprimorar o diagnóstico uma vez que em estudo anterior obtivemos bons indicies de sensibilidade e especificidade utilizando como marcador imunológico o anticorpo IgG.

Esperamos que os nossos resultados somados a de outros pesquisadores possam construir subsídios para que as autoridades possam ter em mãos as ferramentas que buscavam para controlar a doença.

OBJETIVOS

1. Padronizar e avaliar o comportamento de imunoglobulinas IgG, IgA, IgM; subclasses IgG1 e IgG3; e avidez de anticorpos IgG, contra diferentes componentes antigênicos da cepa clínica de *M. tuberculosis* por Western Blotting, em amostras de soros de pacientes com tuberculose pulmonar atendidos no ambulatório de Tuberculose do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2. Associar resultados do Western blotting e do reagente comercial QuantiFERON TB Gold®, visando obter informações que aprimorem o conhecimento da resposta imunológica de pacientes com tuberculose pulmonar.

MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Grupo I: Pacientes com tuberculose pulmonar

Foram colhidas amostras de sangue de 42 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, independente de idade, sexo e grupo étnico atendidos no ambulatório de tuberculose do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-SP). Foram selecionados pacientes que tiveram resultado de pesquisa direta para o bacilo de Koch (BK) positiva ou apresentaram sintomas e alterações radiológicas sugestivas de infecção tuberculosa. Desses pacientes colhemos uma amostra de sangue no início e outra ao final do tratamento, após seis meses. Desses pacientes, 24 tiveram amostras de soros colhidas nas mesmas condições para serem utilizadas em estudo anterior. Essas amostras estavam mantidas a -20ºC e já foram processadas para QuantiFERON TB Gold®.

Grupo II: Indivíduos sadios

Foram colhidas amostras de sangue de 15 indivíduos adultos (18 a 55 anos), sadios, independente de sexo e grupo étnico, entre funcionários do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMTSP. Foram selecionados indivíduos que nunca tiveram contato com pacientes tuberculosos ou indivíduos suspeitos da doença.

2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os indivíduos incluídos no estudo foram informados sobre os aspectos científicos da pesquisa de forma clara e simples e da necessidade de se colher sangue por punção intravenosa.

Também foi assegurado que se algum indivíduo se recusasse a participar do estudo, não seria discriminado ou punido por parte da Instituição de Saúde e que todas as informações obtidas serviriam apenas ao propósito da pesquisa, sendo totalmente confidenciais. As amostras de sangue foram colhidas dos indivíduos somente após assinatura do termo de consentimento, conforme resolução do Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 de outubro de 1996.

Segundo parecer da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da FMUSP, nenhuma objeção foi feita à utilização de material biológico estocado, originalmente colhido no contexto de pesquisas afins com o atual projeto, desde que garantida a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos envolvidos e a conservação e utilização eticamente corretas do material, bem como das informações obtidas a partir dele. Este trabalho foi aprovado pela CAPPesq sob o parecer n° 0105/08.

3. OBTENÇÃO DE ANTÍGENO DE *Mycobacterium tuberculosis*

3.1 Cultivo e obtenção de antígenos de *M. tuberculosis*:

O cultivo *in vitro* de *M. tuberculosis* foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia do HC-SP, com a aprovação da Comissão de Ensino e Pesquisa da Divisão de Laboratório Central sob o protocolo PR-507.

A cepa clínica de *M. tuberculosis* utilizada para cultivo inicial foi isolada no laboratório de microbiologia do HC-SP, a partir de amostra de escarro de paciente com tuberculose pulmonar ativa e a espécie confirmada por métodos microbiológicos e através de sonda de DNA específica para o complexo *M. tuberculosis*. A bactéria foi repicada e cultivada em meio Löwestein-Jensen a 37 ºC por 30 dias.

A partir do crescimento da bactéria em meio de Löwestein-Jensen foi realizado um repique em meio líquido de Sauton, como descrito por Beck (2003). Após 4 semanas de incubação a 37ºC, a película bacteriana crescida na superfície do meio foi utilizada para a inoculação em frascos contendo 250 mL de meio líquido de Sauton, que foram incubados por mais 10 semanas.

Após esse tempo foi coletada da superfície do meio a massa bacteriana crescida e transferida com alça descartável para tubo plástico, contendo 20 mL de solução salina tamponada com fosfatos 0,01M (PBS) acrescida de fluoreto de fenilmetil-sulfonida (PMSF), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e dietiltreitol (DTT) na concentração final de 1 mM cada. Este composto foi centrifugado a 5000 x *g* por 15 minutos a 5ºC. Após a centrifugação o sedimento obtido foi ressuspendido em 10 mL da solução (PBS/PMSF/EDTA/DTT), essa mistura foi submetida a

sonicação por 20 ciclos de 1 minuto/ 80 Watts, em banho de gelo, utilizando o sonicador Vibra Cell™ 72405 (BioBlock Scientific).

Todo este processo foi realizado no laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas com aprovação número em nível III de segurança em condições totalmente estéreis.

Após a sonicação, centrifugou-se o material a 10.000 x *g* por 30 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se, sob constante agitação e em banho de gelo, a solução de sulfato de amônia saturada 80% (v/v) para a precipitação das proteínas. Esta solução foi mantida a 4ºC por 24 horas, sendo posteriormente centrifugada a 10.000 x *g* por 30 minutos a 4ºC.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com solução de sulfato de amônia 40% e centrifugado conforme a descrição anterior. O sedimento foi ressuspenso em 1,5mL de solução fisiológica, a mistura foi dialisada com membrana de diálise (Sigma D-7884) com capacidade de retenção de proteínas com peso molecular maior que 2000 Dalton, contra solução fisiológica por 24 horas, a 4ºC.

Foi obtido um lote de extrato antigênico com um volume de 2,5 mL, mantido em alíquotas congelado em N_2 líquido. O conteúdo protéico foi determinado pelo reagente comercial “Bio Rad Dc Protein Assay Reagent” (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) fundamentado no método de Lowry et al., (1951).

Foi obtido um lote antigênico e a sua reprodutibilidade foi analisada por Wester-Blotting, comparado a lotes de cepa padrão e cepa clínica estocados no laboratório.

4. WESTERN BLOTTING

4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Proteínas do extrato antigênico de *M. tuberculosis* foram separadas pela técnica de SDS-Page, como descrito por Laemli (1970). Para diluição do antígeno foi utilizada titulação em bloco sendo a melhor quantidade a concentração de 2 µg/mm de gel. O extrato antigênico foi diluído em tampão e fervido por dois minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida a 15% e a 18%, como descrito por Beck (2003) e Kanunfre (2007) em sistema vertical e descontínuo. Sendo a melhor visualização de bandas em gel de poliacrilamida a 15%. A eletroforese foi feita com voltagem inicial de 60V por 30 minutos, utilizou-se então voltagem de 120V até que o corante indicador atinja o final do gel de separação. O padrão de peso molecular que foi utilizado é o Rainbow™ (Amersham Biosciences, RPN 755E) pré-corado, as massas moleculares definidas pelo fabricante são: 38 kDa (azul), 31 kDa laranja, 24 kDa (verde), 17 kDa (azul), 12 kDa (vermelho), 8,5 kDa (amarelo) e 3,5 kDa (azul).

As frações antigênicas separadas por SDS-Page foram transferidas eletroforeticamente do gel de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose (Bio Rad nº162 – 0115n), como descrito por Towbin et al., 1979. Foi realizada transferência úmida e semi-seca, sendo definida a transferência úmida por 18 horas em voltagem constante de 20V, a 4ºC, em aparelho Mini Protean III® (Bio-Rad) o uso de marcador de peso molecular pré-corado auxiliou na verificação da eficiência do processo. Após a transferência a membrana de nitrocelulose foi bloqueada por 15 minutos, à temperatura ambiente com PBS Tween 20 a 0,05% (PBS-Tw20)

contendo 5% de leite desnatado. Em seguida foi feita uma rápida lavagem com água destilada e a membrana cortada em tiras verticais de 4 mm.

4.2 Reação imunoenzimática

Cada tira foi incubada com os soros diluídos a 1/100 após definição em titulação em bloco em leite desnatado 0,5% em PBS-Tw20, por 2 horas, a temperatura ambiente, para as reações de anticorpos IgG, IGA e IgM. Após lavagem com PBS-Tw20 por três vezes de 5 minutos cada, foi adicionado o conjugado enzimático diluído à 1/500 (definido após titulação em bloco) em leite desnatado 0,5% em PBS-Tw20. Após incubação por 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação contínua, novo ciclo de lavagens foi realizado. O complexo formado foi revelado com solução cromogênica contendo 4-cloro-α-naftol (Sigma Chemical C., St. Louis, MO, USA) em metanol e H_2O_2. Após 15 minutos ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela lavagem das membranas com água destilada.

Os conjugados utilizados nestas reações foram gentilmente cedidos pela BioMérieux e marcados com peroxidase em nosso laboratório como descrito por

Para a reação de subclasses de IgG1 e IgG3, as tiras foram incubadas com soro diluído a 1/10 em leite desnatado 0,5% em PBS-Tw20, por 2 horas, a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tw20 por três vezes de 5 minutos cada, foi adicionado o conjugado enzimático (anti IgG1 ou anti IgG3, ambos Sigma(Sigma Chemical C., St. Louis, MO, USA) diluído a 1/100 em leite desnatado 0,5% em PBS-Tw20. Após incubação por 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação contínua, novo ciclo de lavagens foi realizado. Foi adicionada a solução de estreptoavidina (Sigma Chemical C., St. Louis, MO, USA) diluída a 1/100 em leite

desnatado 0,5% em PBS-Tw20 por 1 hora. O complexo formado foi revelado com solução cromogênica contendo 4-cloro-α-naftol (Sigma Chemical C., St. Louis, MO, USA) em metanol e H_2O_2. Após 15 minutos ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela lavagem das membranas com água destilada.

A reação de avidez de anticorpos IgG foi realizada seguindo o protocolo de reação de anticorpos IgG total, com as amostras em duplicata, sendo que a primeira lavagem de uma das amostras foi feita com Uréia 8M e o resto do protocolo foi seguido.

Todas as reações foram realizadas em agitação constante.

5. QUANTIFICAÇÃO DE INTERFERON-GAMA (IFN- γ)

Para a quantificação de IFN-γ utilizou-se o reagente comercial QuantiFERON® - TB Gold (Cellestis Limited, Austrália), sendo o seu princípio baseado na detecção de IFN-γ produzido por células T após terem sido estimuladas por antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10), através da técnica de ELISA.

Foram incubadas alíquotas de 1 mL de sangue total heparinizado de cada paciente com antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10) e controles do teste a 37 ºC, *overnight*.

O sobrenadante foi retirado e adicionado 50 µL às cavidades das placas de poliestireno previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti - IFN-γ humano, juntamente com 50 µL do conjugado enzimático (anti - IFN-γ humano – peroxidase). A placa foi incubada 120 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, após lavagem adicionou-se às placas 100 µL da solução cromogênica (tetrametilbenzidina – TMB/H2O2) e as placas foram incubadas a 30 minutos.

Adicionou-se então 50 μL de solução bloqueadora (H2SO4 0,5M). As densidades ópticas obtidas foram lidas em leitor de ELISA a 450 nm. Em cada ensaio realizado foram incluídos quatro padrões de IFN-γ humano, em duplicata, fornecidos pelo fabricante.

RESULTADOS

1. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO DE *Mycobacterium tuberculosis:*

Após a obtenção do lote de antígeno, do cultivo "in vitro" de cepa clínica de *M. tuberculosis,* o conteúdo protéico foi determinado pelo reagente comercial "Bio Rad Dc Protein Assay Reagent" ®. O resultado obtido da extração antigênica, foi de 2,9 mg/mL, com um volume final de 2,5 mL.

Ao avaliarmos o padrão de proteínas comparando o lote antigênico obtido de cepa clínica, com cepa clínica (2002) e cepa padrão (2005), (figura 2) observamos que as proteínas de baixo peso molecular, de grande importância na definição dos perfis sorológicos estavam presentes e bem conservadas o que assegurou a obtenção de resultados confiáveis. Essas proteínas apresentam massa molecular estimada em 38, 30, 26, 16 e 6kDa.

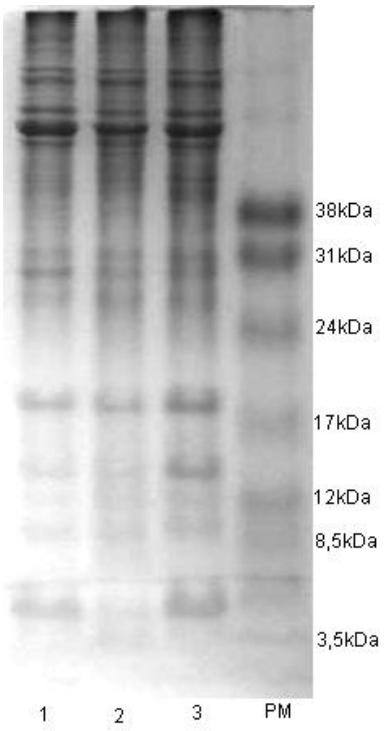

Figura 2: Análise do perfil de proteínas do extrato antigênico obtido.
1: Extrato antigênico obtido neste projeto; 2: Cepa clínica 2005; 3: Cepa padrão H37Rv; PM: Peso molecular.

2. DEFINIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE GEL E EXTRATO ANTIGÊNICO:

Foram avaliadas as concentrações de 18% e 15% no gel de poliacrilamida como descritas por Beck (2003) e Kanunfre (2007) respectivamente. O padrão de proteínas observado em gel de poliacrilamida de 15% apresentou melhor resultado do que no gel de 18%, quando foi analisado o perfil das frações antigênicas reconhecidas por anticorpos de pacientes com tuberculose pulmonar ativa.

A concentração de 2µg/mm de gel apresentou melhor definição do perfil de frações antigênicas. Não foi utilizado 2 mercaptoetanol no tampão de amostra, pois segundo Kanunfre (2007) e Beck (2003), com introdução desta substância não alterou o padrão de corrida. O extrato antigênico aquecido por 2 minutos foi o que apresentou melhores resultados quando testados com soros de pacientes com diferentes perfis sorológicos.

3. WESTERN BLOTTING

Kanunfre (2007) padronizou o Western Blotting utilizando cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv. Baseando-se nessa padronização fizemos um Western Blotting com antígenos protéicos da cepa clínica de *M. tuberculosis*. Ao final da reação verificamos que a definição das frações protéicas reconhecidas pelos anticorpos dos pacientes foi satisfatória, pois conseguimos definir os perfis de reatividade observados anteriormente para proteínas de baixo peso molecular.

Para realização da reação para pesquisa de anticorpos IgA e IgM, seguimos o protocolo da reação para anticorpos IgG, e não sendo necessárias alterações. Para

as subclasses de IgG (IgG1 e IgG3), melhores resultados foram obtidos com soro diluído a 1/10 e conjugado a 1/100.

O tempo e a temperatura de incubação das amostras de soros, foram avaliados a 18hs a 4 ºC e 2hs a temperatura ambiente. Os resultados apresentados na figura 3, não apresentaram grandes diferenças e optamos por trabalhar com tempo de incubação em 2h a temperatura ambiente.

Figura 3: Comparação entre tempos e temperaturas da reação imunoenzimática.
PM: Peso molecular; 1: Paciente forte reator; 2: Pacientes fraco reator; 3: Paciente médio reator

Para assegurarmos a qualidade da corrida eletroforética, fizemos o controle de qualidade de todas as membranas. Para tanto foram retiradas para análise fitas correspondentes as posições inicial, intermediária e final das membranas. A

membrana foi considerada aprovada quando as fitas controle apresentavam as bandas importantes bem definidas e homogêneas.

4. RECONHECIMENTO DAS FRAÇÕES ANTIGÊNICAS:

4.1 Grupo I: Pacientes com tuberculose pulmonar

A reatividade de anticorpos IgG, IgM, IgA, subclasses de imunoglobulinas IgG_1 e IgG_3 e avidez de anticorpos IgG, contra diferentes componentes antigênicos de *M. tuberculosis*, por Western Blotting podem ser observadas nos anexos A e B.

Para anticorpos IgG a região mais reconhecida foi a de 38kDa, estando presente em 40 pacientes (95,3%) tanto na primeira quanto na última amostra de soro. A região de 30kDa foi reconhecida por 38 pacientes (90%) também em ambas as amostras de soros. Em relação a região de 16 e 6kDa houve um aumento do reconhecimento dessas bandas na última amostra em relação a primeira amostra de soro, 8 pacientes (19%) apresentaram a banda de 16kDa e/ou a banda de 6kDa apenas na última amostra de soro. A região de 26kDa também foi reconhecida na primeira amostra de soro de 16 pacientes (38%) e na última amostra de soro e 19 pacientes (45,2%) (figura 4)

Para anticorpos IgA 27 pacientes (64,3%) apresentaram positividade a pelo menos uma fração antigênica em ambas as amostras de soro, sendo a região de 30kDa a região mais reconhecida, 24 pacientes (57,2%) na primeira amostra e 25 pacientes (59,5%) na última amostra. A região de 38 kDa foi reconhecida por 12 pacientes (28,5%) em ambas as amostras de soro, assim como a região de 26kDa

que foi reconhecida por 8 pacientes (19%). Resultados negativos foram encontrados em 15 pacientes (31%) (figura 4).

Anticorpos IgM mostraram melhor reatividade na região de 30kDa, com reatividade em 35 pacientes (83%) na primeira amostra e 37 (88%) na segunda amostra de soro; a região de 38kDa foi reconhecida por 11 pacientes (26%) na primeira e última amostra de soro. A região de 16kDa foi reconhecida por 1 paciente e não houve reconhecimento na região de 6kDa; 6 pacientes (14%) obtiveram resultados negativos para esta imunoglobulina (figura 4).

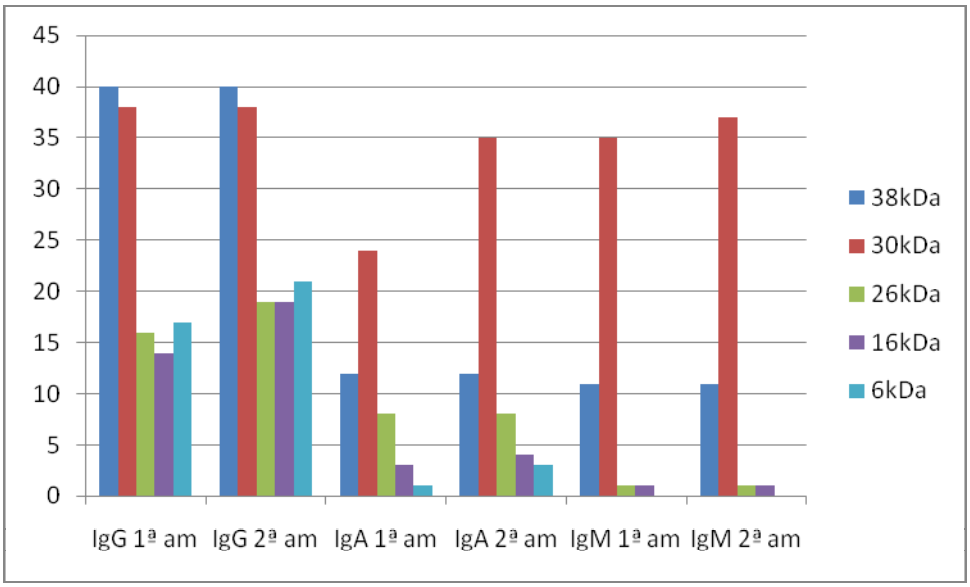

Figura 4: Frequência de reconhecimento de frações antigênicas do antígeno protéico de *M. tuberculosis* por anticorpos IgG, IgM e IgA em amostras de soros de pacientes colhidas antes do início do tratamento (1ªam) e ao final do tratamento (2ªam).

A subclasse IgG1 reconheceu melhor a região de 38 kDa, 33 pacientes (78,5%); seguida pela região de 30kDa, 31 pacientes (74%) na primeira amostra e 32 pacientes (76%) na segunda amostra de soro. 15 pacientes reconheceram a região de 26kDa na primeira amostra e 17 pacientes (40%) na segunda amostra de soro; a região de 16kDa foi reconhecida por 15 pacientes (36%) na primeira e segunda amostra. A região de 6kDa foi reconhecida por 11 pacientes (26%) na primeira

amostra e por 13 pacientes (31%) na segunda amostra de soro. A subclasse IgG3 foi reconhecida por 7 pacientes (16%) na primeira amostra e 6 pacientes (14%) na segunda amostra de soro na região de 38kDa; 14 pacientes (33%) reconheceram a região de 30kDa na primeira e segunda amostra de soro; 3 pacientes (7%) reconheceram a região de 26kDa na primeira e segunda amostra; 3 pacientes (7%) reconheceram a região de 16kDa na primeira amostra e 4 pacientes (9,5%) na segunda amostra de soro; a região de 6kDa foi reconhecida por 1 paciente (2%) em ambas as amostras de soro (figura 5)

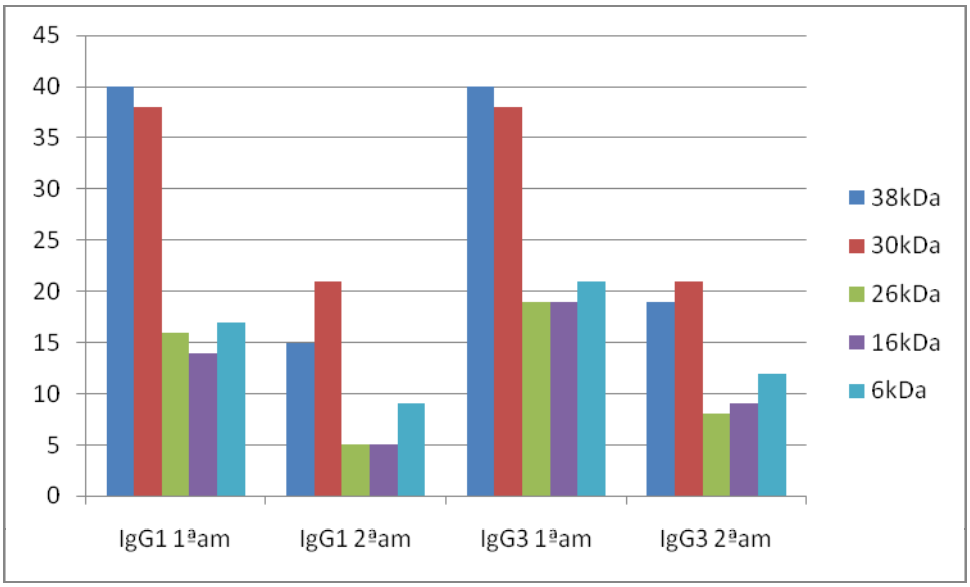

Figura 5: Frequência de reconhecimento de frações antigênicas do antígeno protéico de *M. tuberculosis* por subclasses de anticorpos IgG: IgG1 e IgG3 em amostras de soros de pacientes colhidas antes do início do tratamento (1ªam) e ao final do tratamento (2ªam).

Em relação a avidez de anticorpos IgG a região mais resistente a lavagem com solução de Uréia 8M foi a de 30kDa, onde de 38 pacientes que reconheceram essas bandas e 21 (55%) mantiveram a reatividade após a lavagem. Dos 40 pacientes que reconheceram a região de 38kDa, 15 (37,5%) mantiveram a banda na primeira amostra e 19 (47,5%) na segunda amostra de soro. A região de 26 e 16kDa foram as mais sensíveis a lavagem. A região de 6kDa foi reconhecida por 17 pacientes e

apenas 9 (53%) mantiveram essa banda após a lavagem na primeira amostras e dos 21 que reconheceram essa região na segunda amostra 12 pacientes (57%) mantiveram essa banda (figura 6).

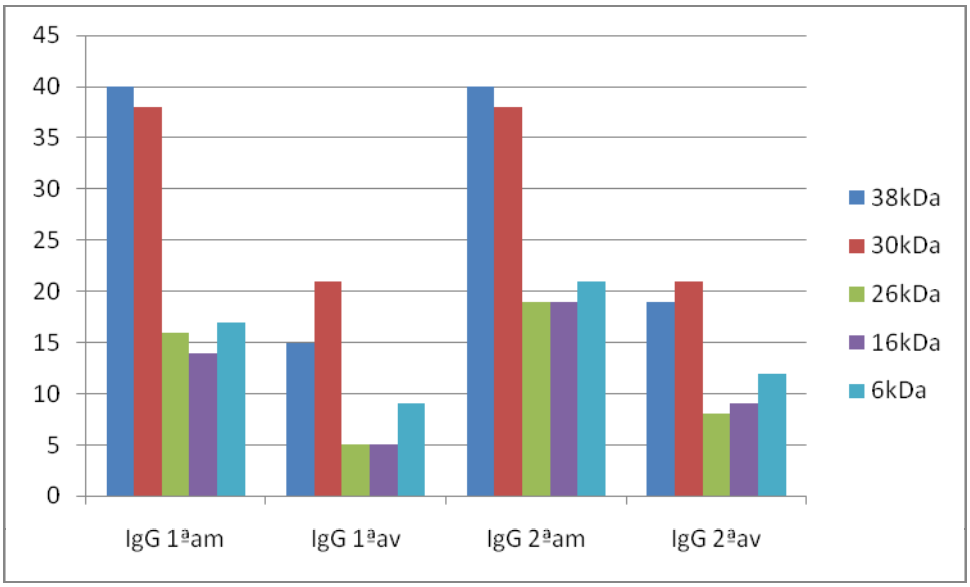

Figura 6: Frequência de reconhecimento de frações antigênicas do antígeno protéico de *M. tuberculosis* de amostras de soros de pacientes colhidas antes do início do tratamento (1ªam) e com o uso de solução de Uréia 8M (1ªav); e ao final do tratamento (2ªam) e uso de solução de Uréia 8M (2ªav).

4.2 Grupo II: Indivíduos sadios

Neste grupo, para os anticorpos IgG, houve reconhecimento antigênico para frações protéicas de *M. tuberculosis* em 2 indivíduos (13%), um reconhecendo a região de 38 e 6kDa e outro a região de 16kDa e essas regiões desapareceram após a lavagem com uréia.

Para anticorpos IgA, 1 indivíduo (7%) reconheceu a região de 38kDa e outro a região de 16kDa. Para anticorpos IgM houve reconhecimento por 3 indivíduos (20%) todos na região de 38kDa.

A subclasse IgG1 obteve reatividade em pelo menos uma região antigênica por 2 pacientes (14%) , 1 na região de 38 e 6kDa e 1 na região de 16kDa. Nas subclasse IgG3 todos os indivíduos desse grupo foram negativos.

5. DESEMPENHO DO WESTERN BLOTTING NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR

Levando em consideração as bandas de 38, 30, 26, 16 e 6kDa como as mais importantes para o diagnóstico da tuberculose pulmomar, analisamos parâmetros sorológicos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo.

Calculamos os parâmetros levando em consideração a reatividade para 4, 3, 2 e 1 fração antigênica estudada. Para análise dessas reatividade utilizamos tabelas de contigência 2x2, sendo considerado como grupo controle (indivíduos sadios) os resultados negativos e como verdadeiros positivos os pacientes com tuberculose pulmonar com confirmação do diagnóstico pela baciloscopia e/ou cultura do escarro, análise do lavado bronco alveolar e/ou biópsia (n=42). Na tabela 1 apresentamos os resultados dos parâmetros sorológicos para anticorpos IgG, IgM e IgA.

Tabela 1 – Parâmetros sorológicos para anticorpos IgG, IgA e IgM para diferentes reatividades contra frações antigênicas de *M. tuberculosis*

	IgG				IgA				IgM			
Reatividade	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)
4 frações antigênicas	29	100	100	56	0	100	0	26	0	100	0	26
3 frações antigênicas	71	100	100	55	19	100	100	30	5	100	100	28
2 frações antigênicas	93	93	98	82	36	100	100	36	24	100	100	33
1 fração antigênica	100	87	95	100	64	87	93	46	86	80	93	67

A sensibilidade foi calculada pela taxa de verdadeiros positivos em amostras de soros colhidas de pacientes com tuberculose pulmonar e a especificidade pela taxa de verdadeiros negativos entre os indivíduos sadios.

Como demonstrado na tabela 1, para anticorpos IgG os melhores parâmetros foram obtidos com reatividade para duas frações antigênicas. Para anticorpos IgA e IgM, temos melhores resultados quando consideramos a reatividade para uma única fração antigênica.

Os mesmos parâmetros foram calculados para os anticorpos subclasse IgG1 e IgG3 (tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros sorológicos para anticorpos subclasse IgG1 e IgG3 para diferentes reatividades contra frações antigênicas de *M. tuberculosis*

	IgG1				IgG3			
Reatividade	S (%)	E(%)	VPP (%)	VPN (%)	S (%)	E(%)	VPP (%)	VPN (%)
4 frações antigênicas	33	100	100	35	2	100	100	27
3 frações antigênicas	48	100	100	41	10	100	100	28
2 frações antigênicas	76	93	91	58	25	60	100	32
1 fração antigênica	93	86	95	81	36	100	100	36

Avaliando os resultados apresentados na tabela 2, temos melhores resultados de IgG1 e IgG3 com reatividade para uma fração antigênica.

Baseado nos melhores resultados de sensibilidade e especificidade, 1 fração antigênica para anticorpos IgM e IgA e duas frações antigênicas para anticorpos IgG apresentamos na tabela 6 os resultados de “Likelihood Ratio” (LR) positivos e negativos.

Tabela 3 – Resultados de “Likelihood ratio” positivo e negativo para anticorpos IgG, IgM e IgA

Anticorpo	LR+	LR-
IgG	13,2	0,07
IgA	4,76	0,43
IgM	4,3	0,176

LR+: Likelihood ratio positivo; LR-: Likelihood ratio negativo

Analisamos a eficiência diagnóstica das imunoglobulinas IgG, IgM e IgA. Para anticorpos IgG, levando em consideração a positividade para duas frações antigênicas temos 93% de eficiência diagnóstica. Para anticorpos IgA e IgM a positividade foi em relação a uma fração antigênica e os resultados encontrados foram de 68% e 84% respectivamente.

Ao associarmos os resultados das imunoglobulinas IgG, IgM e IgA, obtivemos uma sensibilidade de 59% e uma especificidade de 94%; a associação de anticorpos IgG e IgM apresentou uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 87%; e a relação IgG e IgA teve uma sensibilidade de 64% e uma especifiicidade de 87%. Esses resultados referem-se a positividade para apenas uma fração antigênica.

6. ASSOCIAÇÃO DOS RESULTADOS SOROLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS

6.2 Western blotting – Baciloscopia – Cultura

Considerando como positividade no Western blotting a reatividade de anticorpos IgG presentes nos soros dos pacientes para duas frações antigênicas,

apresentamos na tabela 4 os resultados de Western blotting associados aos resultados de baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar.

Tabela 4 – Associação dos resultados de Western blotting para anticorpos IgG, baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar

Western	Baciloscopia			Cultura		
Blotting	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	23	15	38	30	8	38
Negativo	2	1	3	2	1	3
Total	25	16	41	32	9	41

Um paciente foi diagnosticado por biópsia pulmonar não possuindo resultados de baciloscopia e cultura.

Dos 25 pacientes que apresentaram resultados positivos na baciloscopia, 23 (%) apresentam reatividade para anticorpos IgG e 2 pacientes foram negativos no Western blotting; 16 pacientes apresentaram resultados negativos na baciloscopia, desses 15 foram positivos no Western blotting e 1 paciente foi negativo.

Em relação a cultura 32 pacientes apresentaram resultados positivos, 30 pacientes obtiveram resultados positivos no Western blotting para anticorpos IgG e 2 pacientes resultados negativo. A cultura apresentou 9 resultados negativos, onde 8 pacientes foram positivos para o western blotting e 1 apresentou resultado negativo.

Essas asociações foram realizadas para anticorpos IgA com reatividade para apenas uma fração antigênica (tabela 5), assim como para IgM (tabela 6).

Tabela 5 – Associação dos resultados de Western blotting para anticorpos IgA baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar

Western	Baciloscopia			Cultura		
blotting	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	18	8	26	21	5	26
Negativo	7	8	15	11	4	14
Total	25	16	41	32	9	41

Para anticorpos IgA, dos 25 pacientes positivos na baciloscopia, 18 foram positivos no Western blotting e 7 pacientes apresentaram resultados negativos; dos 16 pacientes negativos na baciloscopia, 8 apresentaram resultados positivos e 8 apresentaram resultados negativos para o Western blotting.

Ao associarmos a cultura aos resultados de anticorpos IgA, dos 32 pacientes positivos na cultura, 21 foram positivos no Western blotting e 11 pacientes apresentaram resultados negativos; 9 pacientes que tiveram resultados negativos na cultura, 5 foram positivos no Western blotting e 4 pacientes negativos para o teste.

Tabela 6 – Associação dos resultados de Western blotting para anticorpos IgM baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar

Western	Baciloscopia			Cultura		
Blotting	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	21	14	35	29	6	35
Negativo	4	2	6	3	3	6
Total	25	16	41	32	9	41

Em relação aos anticorpos IgM, dos 25 pacientes com resultados positivos na baciloscopia, 21 foram positivos no Western blotting e 4 pacientes foram negativos; dos 16 pacientes negativos a baciloscopia, 14 foram positivos no Western blotting e 2 apresentaram resultados negativos.

A cultura foi positiva em 32 pacientes, desses 29 foram positivos no Western blotting para anticorpos IgM e 3 foram negativos; 9 pacientes que apresentaram resultados negativos na cultura, 6 foram positivos e 3 negativos no Western blotting.

As subclasses IgG1 e IgG3 foram analisadas comparadas a baciloscopia e cultura como demonstrado nas tabelas 7 e 8 respectivamente.

Tabela 7 – Associação dos resultados de Western blotting para anticorpos IgG1 baciloscopia e cultura do escarro de 41 pacientes com tuberculose pulmonar

Western	Baciloscopia			Cultura		
Blotting	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	24	14	38	29	9	38
Negativo	1	2	3	3	0	3
Total	25	16	41	32	9	41

Para subclasse IgG1, dos 25 pacientes positivos na baciloscopia, 24 foram positivos no Western blotting e 1 pacientes apresentou resultado negativo; dos 16 pacientes negativos na baciloscopia, 14 apresentaram resultados positivos e 2 apresentaram resultados negativos para o Western blotting.

Na associação da IgG1 e cultura, dos 32 pacientes positivos na cultura, 29 foram positivos no Western blotting e 3 pacientes apresentaram resultados negativos; 9 pacientes que tiveram resultados negativos na cultura os 9 foram positivos no Western blotting.

Tabela 8 – Resultados dos testes Western blotting para anticorpos IgG3 baciloscopia e cultura de 41 pacientes com tuberculose pulmonar

Western	Baciloscopia			Cultura		
Blotting	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Positivo	11	4	15	12	3	15
Negativo	14	12	26	20	6	26
Total	25	16	41	32	9	41

Em relação a subclasse IgG3, dos 25 pacientes com resultados positivos na baciloscopia, 11 foram positivos no Western blotting e 14 pacientes foram negativos; dos 16 pacientes negativos a baciloscopia, 4 foram positivos no western blotting e 12 apresentaram resultados negativos.

A cultura foi positiva em 32 pacientes, desses 12 foram positivos no Western blotting para anticorpos IgM e 20 foram negativos; 9 pacientes que apresentaram resultados negativos na cultura, 3 foram positivos e 6 negativos no Western blotting.

6.3 Western blotting – QuantiFERON TB Gold

Realizamos a associação dos resultados de QuantiFERON TB Gold com os resultados de Western blotting. Na tabela 9, demonstramos os resultados de Western blotting de anticorpos IgG para duas frações antigênicas.

Tabela 9 – Comparação dos resultados de Western blotting de anticorpos IgG e QuantiFERON TB Gold (QTF – G) de 24 pacientes com tuberculose pulmonar.

Western	QTF - G		
blotting	Positivo	Negativo	Total
Positivo	18	3	21
Negativo	3		3
Total	21	3	24

Dos 21 pacientes positivos no QTF-G, 18 pacientes foram positivos para Western blotting IgG e 3 apresentaram resultados negativos para o teste; os 3 pacientes negativos no QTF-G são positivos no Western blotting.

Para os anticorpos IgA os 21 resultados positivos no QTF-G, 10 foram positivos no Western blotting e 11 pacientes foram negativo levando em consideração uma fração antigênica. Dos 3 resultados negativos no QTF-G, 2 foram positivos no Western blotting para anticorpos IgA e 1 paciente foi negativo para o teste (tabela 10).

Tabela 10 – Resultados de Western blotting de anticorpos IgA e QuantiFERON TB Gold (QTF – G) de 24 pacientes com tuberculose pulmonar.

Western	QTF - G		
blotting	Positivo	Negativo	Total
Positivo	10	2	12
Negativo	11	1	12
Total	21	3	24

O teste de Western blotting para anticorpos IgM foi positivo em 17 pacientes dos 21 positivos no QTF-G e 4 pacientes foram negativos no Western blotting. Dentre os resultados negativos no QTF-G, 2 foram positivos no western blotting e 1 foi negativo (tabela 11).

Tabela 11 – Resultados de Western blotting de anticorpos IgM e QuantiFERON TB Gold (QTF – G) de 24 pacientes com tuberculose pulmonar.

Western	QTF - G		
blotting	Positivo	Negativo	Total
Positivo	17	2	19
Negativo	4	1	5
Total	21	3	24

Em relação a subclasse IgG1, dos 21 pacientes positivos no QTF-G, 14 foram positivos e 7 negativos para o Western blotting. Os resultados negativos no QTF-G também foram negativos no Western blotting (tabela 12).

Tabela 12 – Resultados de Western blotting de anticorpos subclasse IgG1 e QuantiFERON TB Gold (QTF – G) de 24 pacientes com tuberculose pulmonar.

Western	QTF - G		
blotting	Positivo	Negativo	Total
Positivo	14	3	17
Negativo	7	0	7
Total	21	3	24

Para a subclasse IgG3, dos 21 pacientes positivos no QTF-G, 6 foram positivos no Western blotting e 15 apresentaram resultados negativos; dos 3 resultados negativos do QTF-G, 2 foram positivos e 1 foi negativo no Western blotting (tabela 13).

Tabela 13 – Resultados de Western blotting de anticorpos subclasses IgG3 e QuantiFERON TB Gold (QTF – G) de 24 pacientes com tuberculose pulmonar.

Western	QTF - G		
blotting	Positivo	Negativo	Total
Positivo	6	2	10
Negativo	15	1	17
Total	21	3	24

DISCUSSÃO

A tuberculose humana continua em franca assenção em todas as partes do mundo. Já está fazendo mais de 10 anos que a Conferência Ministerial sobre Tuberculose realizada em Amsterdã, Holanda fez uma declaração “Amsterdan Declaration to Stop TB” na qual explanava a necessidade de medidas para o controle da doença incluindo um substancial aporte de capital e definição política.

Entre as medidas sugeridas a padronização de teste visando rapidez e eficiência diagnóstica foi a que representou maior repercussão entre pesquisadores do mundo inteiro. Tendo como meta a recomendação dada pela WHO para valores de sensibilidade e especificidade para testes, imunologistas, biologistas moleculares procuraram atender ao apelo da organização, buscando financiamentos e parcerias que pudessem sustentar suas pesquisas.

Embora avanços tenham sido alcançados nas pesquisas demonstrados por inúmeras publicações pouco tem sido aproveitado na prática que ainda mantém como referência para o diagnóstico a baciloscopia e a cutura, cujas limitações têm sido amplamente informadas.

Recentemente abriu-se uma expectativa muito grande utilizando-se o método da dosagem de interferon-gama produzido por células T de pacientes suspeitos de tuberculose, após o estímulo das células com antígenos específicos.

Utilizando reagente comercial bem padronizado o método foi utlilizado por inúmeros pesquisadores e pelos resultados apresentados países da Ásia e da Europa registraram o produto para ser utilizado na rotina laboratorial. No Brasil o método foi registrado junto a ANVISA em 2010 para ser comercializado em todo o território nacional.

O custo do teste, a dificuldade de importação do produto e a falta de informações, tem limitado sua utilização. Paralelamente a essas pesquisas o

Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMTSP padronizou o método de Western blotting para pesquisa de anticorpos IgG anti *M. tuberculosis*, avaliando o valor clínico dos resultados obtidos em frações antigênicas de baixo peso molecular e comparou os resultados obtidos com a dosagem de IFN- γ e métodos microbiológicos. Os resultados mostraram que o Western blotting padronizado, poderia ser não apenas uma boa alternativa para o diagnóstico da tuberculose pulmonar humana, mas também para avaliação prognóstica dos pacientes (Beck, 2004; Kanunfre, 2007). O Western blotting deverá ser avaliado para outras formas de tuberculose e, em pacientes imunodeprimidos deverá ser avaliado ao longo da imunodepressão para verificar a mudança do perfil de reatividade das bandas de baixo peso molecular, consideradas importantes pelos pesquisadores, pelos resultados já obtidos.

Neste trabalho procuramos complementar informações sobre a resposta imunológica de pacientes com tuberculose pulmonar pesquisando além de anticorpos IgG, anticorpos IgA e IgM, subclasses de anticorpos IgG e avidez desses anticorpos contra frações antigênicas de *M. tuberculosis* de baixo peso molecular.

Inicialmente definimos o antígeno utilizado. Pela dificuldade em obter a cepa padrão H37Rv optamos em trabalhar com cepa clínica recentemente isolada e identificada por métodos moleculares e enzimáticos.

Por apresentar o mesmo perfil de proteínas, com painel de soros padrão, que a cepa padrão H37Rv e com cepa clínica obtida em 2005 utilizada em projetos anteriores, não tivemos dúvida em utilizá-la para obtenção do extrato antigênico em todo o projeto. Posteriormente definimos e padronizamos a concentração do gel em 15%, pela qualidade e homogeneidade das bandas nos diferentes géis produzidos. Também foram definidas por exaustiva padronização a concentração de antígeno, a

diluição de soros para diferentes classes de imunoglobulinas e subclasses, a diluição de conjugados e tempos de reação.

Padronizado o método para o objetivo do projeto passamos a utilizar a casuística selecionada para obtenção dos resultados.

Como casuística utilizamos amostras de soro colhidas de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e amostras de soros mantidas em laboratório a -20°C colhidas de pacientes que apresentavam as mesmas características clínica e laboratorial.

Uma dificuldade que encontramos para a realização do projeto foi a importação do reagente para dosagem de interferon-gama. Para evitar esse problema e analisando o comportamento desse reagente nas amostras de sangue que estavam sendo colhidas resolvemos utilizar as amostras que estavam armazenadas no laboratório e proveniente de paciente que já tinham sido previamente avaliados para a presença de interferon-gama.

O perfil da resposta de anticorpos IgG do Western blotting padronizado mostrou identidade com o perfil obtido anteriormente com cepa padrão, o que assegurou a qualidade das amostras de soros para o desenvolvimento dos objetivos do projeto.

Como observado anteriormente tivemos muita dificuldade em discutir os nossos resultados, pela falta de trabalhos científicos que utilizassem o Western blotting na avaliação da resposta humoral de pacientes com tuberculose pulmonar ou mesmo os que utlizassem outros testes imunológicos.

A frequência de reconhecimento de frações antigênicas com peso molecular entre 38 e6kDa consideradas de grande importância para fins diagnósticos e prognósticos, mostrou que a fração de massa molecular de 30kDa foi a mais

reconhecida pelas diferentes classes de imunoglobulinas e subclasses IgG, provavelmente por estar relacionada com a atividade do microrganismo e a patogenia da doença. Esse resultado está de acordo com as observações publicadas por Uma Devi em 2003.

Analisando individualmente as diferentes respostas imunológicas verificamos que anticorpos para a fração de massa molecular de 38kDa estavam presentes em 40 dos 42 pacientes para anticorpos IgG, em 11 pacientes para anticorpos IgM e 12 pacientes para anticorpos IgA. Em relação as subclasses esses anticorpos estavam presentes em 33 amostras de soros para IgG1 e 7 para IgG3. A presença desse anticorpo, como descrito em outros trabalhos está relacionada com processos avançados da doença (Bothamley, 1995; Samanich et al., 2001).

Em relação aos anticorpos designados contra a fração protéica de massa molecular de 16kDa verificamos que essa região foi melhor reconhecida na última amostra de soro colhida após o tratamento. Conforme já descrito por Demissie et al., (2006) a presença de anticorpos contra essas frações poderiam evoluir para a infecção latente.

Em relação a presença de anticorpos contra a fração protéica de 6kDa não observamos reatividade para anticorpos IgM e apenas 2 pacientes apresentaram reatividade para anticorpos IgA. Como esta fração está relacionada com a fase recente de infecção nossos resultados foram compatíveis com a fase da doença que estamos estudando por se tratar de uma doença crônica (Smith, 2003).

Em relação a avidez de anticorpos IgG, poucas informações foram obtidas por estarmos trabalhando com uma população de pacientes com uma patologia predominantemente crônica. Mesmo assim observamos que anticorpos contra fração de 38kDa manteveram-se presente em 37% dos 40 pacientes reativos para a

1ª amostra e 47% para a 2ª amostra. Anticorpos reagentes contra a fração de 30kDa mantiveram-se presentes em 55% das amostras de soros tanto na 1ª como na 2ª amostra.

Para anticorpos dirigidos contra fração de 26kDa apenas 4 amostras de soro (25%) mantiveram o anticorpo após o tratamento com uréia. Para a 2ª amostra de soro tivemos um aumento significativo de resistência de anticorpos. Assim tivemos 47% das amostras resistentes a lavagem com uréia. Esse resultados foram também observados para anticorpos contra a fração de 16kDa.

Para Arias-Bouda et al. (2003), a baixa avidez pode estar realcionada a uma intensa estimulação da resposta humoral por antígenos liberados a partir de bactérias mortas, refletindo a atividade bactericida dos tuberculostáticos levando à produção de anticorpos de baixa afinidade contra estes antígenos liberados. No nosso estudo como os pacientes não iniciaram o tratamento na primeira amostra de soro, poderiamos explicar este fenômeno pela multiplicação bacilar, demonstrada pela presença de reatividade para outras frações protéicas, onde na presença de novos bacilos sendo formados como consequência direta temos novos anticorpos na circulação de baixa avidez.

Considerando a reatividade de diferentes imunoglobulinas e subclasses de IgG para frações antigênicas de massas moleculares de 38, 30, 26, 16 e 6kDa, conforme descrito nas tabelas 1 e 2. Verificamos que para anticorpos IgG a reativiadade para pelo menos uma fração antigênica correspondeu a 100%; para anticorpos IgA a reatividade para uma fração foi observada em 27 amostras de soro, correspondente a 64%; e para anticorpos IgM a reatividade para uma fração antigênica estava presentem em 36 amostras de soro, correpondendo a 86%. Esses dados referem-se a primeira amostra de soro colhidas dos pacientes.

Como apresentado em estudo anterior (Kanunfre, 2007), estabelecemos quatro critérios (reatividade para 1, 2, 3 ou 4 frações antigênicas) para definirmos cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo, e Likelihood ratio (razão de verossimilhança) de Western blotting para as imunoglobulinas e subclasses.

Melhores resultados foram observados para duas frações antigênicas para anticorpos IgG, sendo que esses resultados estão em conformidade com os critérios exigidos pela WHO para sensibilidade e especificidade. Os resultados para pesquisa de anticorpos IgA e IgM, na casuística estudada, não foram suficientes para considerar esses anticorpos como marcadores imunológicos de diagnóstico.

Os valores de Likelihood ratio foram bem significativos para anticorpos IgG (13,2 para LR+ e 0,07 para LR-) o que é importante para valorizar a avaliação pré-teste e pós-teste dos pacientes. Esse resultados estão em conformidade com os resultados obtidos por Kanunfre em 2007.

Ao analisarmos a associação de resultados microbiológicos e WB IgG observamos que os resultados foram significativamente melhores para o Western blotting. Em relação a IgG1, IgA e IgM observamos que o Western blotting teve melhor desempenho que a baciloscopia e comparada com os resultados da cultura observamos que os resultados de IgM e IgG1 foram melhores que os observado para IgA. Dos 3 pacientes considerados como negativos no Western blotting IgG apresentavam reatividade apenas para uma fração antigênica sendo portanto considerados negativo pelo critério estabelecido.

Ao analisarmos a associação de resultados da dosagem de interferon-gama com as do Western blotting, observamos que a melhor associação foi a de WB IgG,

considerando duas frações antigênicas reativas para Western blotting. Nossos resultados estão em conssonância com resultados obtidos por Kanunfre em 2007.

A eficiência diagnóstica das imunoglobulinas e subclasses mostrou que o Western blotting para pesquisa de anticorpos IgG dirigidos contra pelo menos duas frações antigênicas foi de 93%, superior ao obtido com as demais imunoglobulinas estudadas.

CONCLUSÃO

1. Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que o melhor marcador imunológico para fins diagnóstico da tuberculose pulmonar humana, por Western blotting, foi a imunoglobulina IgG.

2. A subclasse do anticorpo IgG, IgG1 apresentou resultados próximos aos obtidos para anticorpos IgG e poderá se constituir em um marcador imunológico.

3. O estudo da avidez de anticorpos IgG mostrou resultados interessantes relacionados com a multiplicação bacilar.

4. Na casuística estudada as imunoglobulinas IgA e IgM não apresentaram bom desempenho diagnóstico e deverão ser avaliadas para outras formas clínicas da doença.

ANEXOS

ANEXO A - Reatividade das diferentes imunoglobulinas, subclasses de IgG (IgG_1 e IgG_3) e avidez de IgG, presentes nas amostras de soros de pacientes com TB pulmonar, colhidas recentemente, contra componentes antigênicos de *M. tuberculosis*

Pacientes		IgG	IgG/ Avidez	IgG1	IgG3	IgA	IgM	PBAAR	CBAAR
1	1ª	38; 30	38; 30-	neg	38	38-; 30; 26	38; 30	positivo	positivo
	2ª	38; 30; 26; 16	16 --	16; 26	negativo	38; 30; 26	38; 30		
2	1ª	38; 30	negativo	neg	negativo	38; 30; 26	30	negativo	positivo
	2ª	38; 30; 26; 16	fraca reação	30; 26	negativo	38; 30; 26	30+		
3	1ª	30; 26; 16	fraca reação	38; 30; 26; 16	38; 30; 26	30	30- 30-	positivo	positivo
	2ª	30; 26	30; 26-	38; 30; 26	38; 30; 26	30	30		
4	1ª	38; 30; 26; 16; 6	30; 6-	38; 30; 16; 6	negativo	30	30	positivo	positivo
	2 ª	38; 30; 26; 16; 6	30; 6-	38; 30	negativo	30	38; 30; 16		
5	1ª	38; 30; 16	38; 30; 16	38; 30; 26	negativo	38; 30; 16	38; 30; 16-	positivo	positivo
	2ª	38; 30; 16	38; 30; 16	38; 30; 26	negativo	38; 30; 16	30		
6	1ª	38; 30; 26; 16; 6	38; 30; 26-; 16-; 6-	38; 30; 26; 16	30-	38; 30	30	positivo	positivo
	2ª	38; 30; 26; 16; 6	38; 30; 26; 16-; 6-	38; 30; 26; 16	negativo	38; 30; 6	30		
7	1ª	38; 30; 16	negativo	30; 16	30; 16	38; 30; 26	30	negativo	negativo
	2ª	38; 30; 16	negativo	30; 16	30; 16	38; 30; 26	30		
8	1ª	38; 30; 6	negativo	38; 30; 26; 16	38; 30; 26; 16	negativo	30	positivo	positivo
	2ª	38; 30; 26; 6	38; 30; 26; 6-	38; 30; 26; 16	38; 30; 26; 16	negativo	30		
9	1ª	38; 30; 26	30	30; 26	30	30	38; 30	negativo	negativo
	2ª	38; 30; 26; 6	30	30; 26	30	30	38; 30		
10	1ª	30; 26; 6	30-; 26-; 6-	30; 26; 16; 6	negativo	30; 26	30	positivo	positivo
	2ª	30; 26; 16	30; 16; 26	30; 26; 16; 6	negativo	30; 26	30		
11	1ª	38; 30; 26; 6	negativo	30; 26; 16; 6	30	30; 26; 16	negativo	positivo	positivo
	2ª	38; 30; 26; 6+	fraca reação	30; 26; 16	30	30; 26; 16	30		
12	1ª	30; 38	30; 38-	38; 30; 16; 6	negativo	30	30	positivo	positivo
	2ª	30; 38; 6	30; 38; 6-	38; 30; 16; 6	negativo	30	30		
13	1ª	38; 30; 16	16	38; 30; 16; 6	negativo	30-	30	positivo	positivo
	2ª	38; 30; 16	16-	38; 30; 16; 6	negativo	30; 16; 6	30		
14	1ª	38; 30; 26	fraca reação	38; 30	negativo	30	30	não colheu	não colheu
	2ª	38; 30; 26	fraca reação	38; 30	negativo	30	30		
15	1ª	38; 30; 26	fraca reação	30; 26	negativo	negativo	30	negativo	negativo
	2ª	38; 30; 26; 16	fraca reação	30; 26	30; 16	negativo	30		
16	1ª	38; 30; 26	38; 30; 26	negativo	negativo	30	30	negativo	positivo
	2ª	38; 30; 26	38; 30; 26	neg	negativo	30	30		
17	1ª	38; 30; 26	30	30; 16	negativo	negativo	30	positivo	positivo
	2ª	38; 30; 26	30; 16	30; 10	negativo	negativo	30		

ANEXO B – Reatividade das diferentes imunoglobulinas, subclasses de IgG (IgG_1 e IgG_3) e avidez de IgG, presentes nas amostras de soros de pacientes com TB pulmonar, amostras armazenadas, contra componentes antigênicos de *M. tuberculosis*

Pacientes		IgG	IgG/Avidez	IgG1	IgG3	IgA	IgM	PBAAR	CBAAR	QTF-G
1	1ª	38, 30, 16, 6	30, 6	38, 30	negativo	negativo	30	negativo	negativo	positivo
	2ª	38, 30, 16, 6	30, 6	38, 30	negativo	negativo	30			
2	1ª	38, 30, 16	30	38	negativo	38, 30	30	negativo	positivo	positivo
	2ª	38, 30, 16	38, 30	38, 30	negativo	38, 30	30			
3	1ª	38	negativo	38	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo
	2ª	38, 6	6	38	negativo	negativo	negativo			
4	1ª	38, 30, 16, 6	38	38, 30, 16, 6	30, 6	30	38, 30, 26	negativo	positivo	positivo
	2 ª	38, 30, 16, 6	38, 30, 6-	38, 30, 16, 6	30, 6	30	38, 30, 26			
5	1ª	38, 30, 6	38, 6	38, 30, 26	38, 30	38, 30, 26	30	positivo	positivo	positivo
	2ª	38, 30, 6	38, 6	38, 30, 26, 16, 6	38, 30	38, 30, 26	30			
6	1ª	38, 30	38, 30	38	negativo	negativo	30	positivo	positivo	positivo
	2ª	38, 30	38, 30	38, 30	negativo	negativo	30			
7	1ª	38	negativo	38	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo
	2ª	38	negativo	38	negativo	negativo	negativo			
8	1ª	38, 30, 26	negativo	38, 30, 26	30, 26	38, 30	30	negativo	positivo	positivo
	2ª	38, 30, 26, 16, 6	38	38, 30, 26, 16, 6	30, 26	38, 30	30			
9	1ª	38	negativo	38	negativo	negativo	30	negativo	positivo	positivo
	2ª	38	38	38	negativo	negativo	30			
10	1ª	38, 30, 26, 6	38, 30, 26, 6	38, 30, 26, 16, 6	38, 30, 16	38	38, 30	positivo	positivo	positivo
	2ª	38, 30, 26, 6	38, 30, 26, 6	38, 30, 26, 16, 6	38, 30, 16	38	38, 30			
11	1ª	38, 30, 26, 16	38, 30	38, 30	negativo	negativo	30	negativo	negativo	positivo
	2ª	38, 30, 26, 16	38, 30	38, 30	negativo	30	30			
12	1ª	38, 30	30	38	negativo	negativo	30	negativo	positivo	positivo
	2ª	38, 30	30	38	negativo	negativo	30			
13	1ª	38, 30	negativo	38, 30	negativo	30	38, 30	positivo	positivo	NR
	2ª	38, 30, 16	negativo	38, 30	negativo	30	38, 30			
14	1ª	38, 30	negativo	38, 30, 26	negativo	38	38	positivo	positivo	positivo
	2ª	38, 30	negativo	38, 30, 26	negativo	38	38			
15	1ª	38, 30, 6	30	38, 30, 26, 6	38, 30	30, 26	30	positivo	positivo	positivo
	2ª	38, 30, 6	30	38, 30, 26, 6	38, 30	30, 26	30			
16	1ª	38, 30, 16, 6	6	38, 30, 16, 6	negativo	30, 16	30	negativo	negativo	positivo
	2ª	38, 30, 16, 6	6	38, 30, 16, 6	negativo	30, 16	30			
17	1ª	38, 6	negativo	38, 6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
	2ª	38, 6	negativo	38, 6	negativo	negativo	negativo			
18	1ª	38, 30, 16, 6	38, 30, 16, 6	38, 30, 16, 6	38, 30, 16	30	38, 30	positivo	positivo	positivo
	2ª	38, 30, 16, 6	38, 30, 16, 6	38, 30, 16, 6	38, 30, 16	30	38, 30			
19	1ª	38, 30, 26, 6	38, 30, 26	38, 30, 26	negativo	38, 30, 26	30	positivo	positivo	positivo
	2ª	38, 30, 26, 6	38, 30, 26	38, 30, 26	negativo	38, 30, 26	30			
20	1ª	38, 30, 16, 6	30, 6	38, 30	negativo	negativo	38, 30	negativo	negativo	positivo
	2ª	38, 30, 16, 6	30, 6	38, 30	negativo	30	38, 30			
21	1ª	38, 30, 26	negativo	38, 30, 26	negativo	30, 26	negativo	positivo	positivo	negativo
	2ª	38, 30, 26	38, 30, 26	38, 30, 26	negativo	30, 26	30			
22	1ª	38, 30, 26	38, 30	38, 30	30	negativo	38, 30	positivo	positivo	negativo
	2ª	38, 30, 26, 16, 6	38, 30, 26, 16	38, 30, 6	30	negativo	38, 30			
23	1ª	38, 30, 6	38, 30, 6	38, 30	neg	negativo	30	positivo	positivo	positivo
	2ª	38, 30, 6	38, 30, 6	38, 30	negativo	negativo	30			
24	1ª	38, 30	negativo	38	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
	2ª	38, 30	negativo	38	negativo	negativo	negativo			
25	1ª	38, 30 16, 6	38, 30, 16, 6	38, 30, 16, 6	30, 6	38, 30, 6	38, 30	positivo	positivo	negativo
	2ª	38, 30, 16, 6	38, 30, 16, 6	38, 30, 16, 6	30,6	38, 30, 6	38, 30			

ANEXO C – Tabela de contingência 2x2 para cada critério avaliado o Western Blotting para anticorpos IgG

Reatividade anticorpos IgG para 4 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	12	0	12
Negativo	30	15	45
Total	42	15	57

S= 12/42 = 29%
E= 15/15 = 100%
VPP= 15/15 = 100%
VPN = 15/27 = 56%

Reatividade anticorpos IgG para 3 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	30	0	30
Negativo	12	15	27
Total	42	15	57

S= 30/42 = 71%
E= 15/15 = 100%
VPP= 30/30 = 100%
VPN= 15/27 = 55%

Reatividade anticorpos IgG para 2 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	39	1	40
Negativo	3	14	17
Total	42	15	57

S= 39/42 = 93%
E= 14/15 = 93%
VPP= 39/40 = 98%
VPN= 14/17 = 82%

Reatividade anticorpos IgG para 1 fração antigênica

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	42	2	44
Negativo	0	13	13
Total	42	15	57

S= 42/42 = 100%
E=13/15 = 87%
VPP = 42/44 = 95%
VPN=13/13 = 100%

ANEXO D – Tabela de contingência 2x2 para cada critério avaliado o Western Blotting para anticorpos IgA

Reatividade anticorpos IgA para 4 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	42	15	57
Total	42	15	57

S= 0/42 = 0%
E= 15/15 = 100%
VPP= 0/0 = 0%
VPN = 15/57 = 26%

Reatividade anticorpos IgA para 3 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	8	0	8
Negativo	34	15	49
Total	42	15	57

S= 8/42 = 19%
E= 15/15 = 100%
VPP= 8/8 = 100%
VPN = 15/49 = 30%

Reatividade anticorpos IgA para 2 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	15	0	15
Negativo	27	15	42
Total	42	15	57

S= 15/42 = 36%
E= 15/15 = 100%
VPP= 15/15 = 100%
VPN = 15/42 = 36%

Reatividade anticorpos IgA para 1 fração antigênica

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	27	2	29
Negativo	15	13	28
Total	42	15	57

S= 27/42 = 29%
E= 13/15 = 87%
VPP= 27/29 = 93%
VPN = 13/28 = 46%

ANEXO E – Tabela de contingência 2x2 para cada critério avaliado o Western Blotting para anticorpos IgM

Reatividade anticorpos IgM para 4 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	42	15	57
Total	42	15	57

S= 0/42 = 0%
E= 15/15 = 100%
VPP= 0/0 = 0%
VPN = 15/57 = 26%

Reatividade anticorpos IgM para 3 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	2	0	2
Negativo	40	15	45
Total	42	15	57

S= 2/42 = 5%
E= 15/15 = 100%
VPP= 2/2 = 100%
VPN = 15/45 = 28%

Reatividade anticorpos IgM para 2 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	11	0	11
Negativo	31	15	46
Total	42	15	57

S= 11/42 =24%
E= 15/15 = 100%
VPP= 11/11 = 100%
VPN = 15/46 = 33%

Reatividade anticorpos IgM para 1 fração antigênica

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	36	3	39
Negativo	6	12	18
Total	42	15	57

S= 36/42 = 86%
E= 12/15 = 80%
VPP= 36/39 = 93%
VPN = 12/18 = 67%

ANEXO F – Tabela de contingência 2x2 para cada critério avaliado o Western Blotting para anticorpos subclasse IgG1

Reatividade anticorpos subclasse IgG1 para 4 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	14	0	14
Negativo	28	15	43
Total	42	15	57

S= 14/42 = 33%
E= 15/15 = 100%
VPP= 14/14 = 100%
VPN = 15/43 = 35%

Reatividade anticorpos subclasse IgG1 para 3 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	20	0	20
Negativo	22	15	37
Total	42	15	57

S= 20/42 = 48%
E= 15/15 = 100%
VPP= 20/20 = 100%
VPN = 15/37 = 41%

Reatividade anticorpos subclasse IgG1 para 2 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	32	1	22
Negativo	10	14	24
Total	42	15	57

S= 32/42 = 76%
E= 14/15 = 93%
VPP= 32/33 = 91%
VPN = 14/24 = 58%

Reatividade anticorpos subclasse IgG1 para 1 fração antigênica

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	39	2	41
Negativo	3	13	16
Total	42	15	57

S= 39/42 = 93%
E= 13/15 = 86%
VPP= 39/41 = 95%
VPN = 13/16 = 81%

ANEXO G – Tabela de contingência 2x2 para cada critério avaliado o Western Blotting para anticorpos subclasse IgG1

Reatividade anticorpos subclasse IgG1 para 4 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	1	0	1
Negativo	41	15	56
Total	42	15	57

S= 1/42 = 2%
E= 15/15 = 100%
VPP= 1/1 = 100%
VPN = 15/56 = 27%

Reatividade anticorpos subclasse IgG1 para 3 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	4	0	4
Negativo	38	15	53
Total	42	15	57

S= 4/42 = 0%
E= 15/15 = 100%
VPP=4/4 = 100%
VPN = 15/53 = 28%

Reatividade anticorpos subclasse IgG1 para 2 frações antigênicas

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	10	0	10
Negativo	32	15	47
Total	42	15	57

S= 10/42 = 24%
E= 15/15 = 100%
VPP= 10/10 = 100%
VPN = 15/47 = 32%

Reatividade anticorpos subclasse IgG1 para 1 fração antigênica

	Doença		
Teste	Presente	Ausente	Total
Positivo	15	0	15
Negativo	27	15	42
Total	42	15	57

S= 15/42 = 36%
E= 15/15 = 100%
VPP= 15/15 = 100%
VPN = 15/42 = 36%

REFERÊNCIAS

Amin Z. Clinical Tuberculosis Problems and Management. *Acta Med Indones-Indones J Intern Med*. 2006; 38 (2): 109-116.

Andersen AB, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun*. 1989;57:2481-2488.

Andersen AB, Ljungqvist L, Olsen M. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J Gen Microbiol*. 1990;136:477-480

API TB Consensus Guidelines 2006: Management of pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situation. *JAPI*. 2006;54:219-34.

Arias-Bouda LMP; Kuijper S; Van Der Werf A; Nguyen LN; Jansen HM; Arend HJ; Kolk. Changes in Avidity and Level of Immunoglobulin G Antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in Sera of Patients Undergoing Treatment for Pulmonary Tuberculosis *Cli. Diagn Lab. Immunol.* 2003;10 (4): 702–709.

Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ. Disruption of the genes encoding antigen 85A and 85B of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infect Immun*. 2000;68:767-778.

Bassey EOE, Catty D, Kumaratne DS, Raykendalia C. Candidates antigens for improved serodiagnosis of tuberculosis. *Tuberc Lung Dis.* 1996;77:136-45.

Beck ST. Padronização e desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico da tuberculose humana. São Paulo, 2003. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Beck ST, Leite OHM, Arruda RS, Ferreira AW. Humoral response to low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. *Braz J Med Biol Res.* 2005a;38:587-96.

Beck ST, Leite OHM, Arruda RS, Ferreira AW. Combined use of Western Blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis. *Braz J Infect Dis.* 2005b;9:35-43.

Bezerra JM, Beck ST, Kanunfre KA, Leite OM, Ferreira AW. A study of IgA antibody response to different mycobacterium tuberculosis antigens in the diagnosis and monitoring of pulmonary tuberculosis. *Braz J Infect Dis*. 2009; 13(1):53-8.

Bierrenbach AL, Gomes ABF, Noronha EF, Souza MFM. Tuberculosis incidence and cure rates, Brazil, 2000-2004. *Rev Saude Publica*. 2007;41(Suppl.1):24-33.

Bodnar KA, Serbina NV, Flynn JL. Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells. *Infect Immun.* 2001;69:800-809.

Brenner JD, Krieg RN, Staley TJ. Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria: introductory essays. 2.ed. New York: Springer; 2005.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, Van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proccedings of National Academy of Sciences of United States of America***.** 2002; 99:3684-3689.

Bothamley GH. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respr J*. 1995;8(suppl 20):676-88.

Caccamo N, Barera A, Di Sano C, Meraviglia S, Ivanyi J, Hudecz F, Bosze S, Dieli F, Salerno A. Cytokine profile, HLA restriction and TCR sequence analysis of human CD4+ T clones specific for an immunodominant epitope of Mycobacterium tuberculosis 16-kDa protein. *Clinical and Experimental Immunology*. 2003;133(2):260-266.

Camus JC, Pryor MJ, Medigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Microbiology*. 2002 148:2967-2973.

Carvalho WS; Miranda SS; Pesquero JL; Gomes MA. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* a rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. *Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas*. 2007;43:31-38.

Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58(1):7-10.

Conde MB, Suffys P, Lapa ESJR, Kritski AL, Dorman SE. Immunoglobulin A (IgA) and IgG immune responses against P-90 antigen for diagnosis of pulmonary tuberculosis and screening for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11:94-97.

II Consenso Brasileiro de Tuberculose. *J. bras. pneumol.*, 2004;30(Suppl.1):4-23.

Cooksey RC. Recent advances in laboratory procedures for pathogenic micobacteria. *Clin Lab Med.* 2003; 23:801-21.

van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(2):294-309.

Demissie A, Leyten EMS, Abebe M, Wassie I, Aseffa A, Abate G, Fletcher H, Owiade P, Hill PC, Brookes R, Rook G, Zulma A, Arend SM, Klein M, Ottenhoff THM, Andersen P, Dorherty TM, Vacsel Study Gropu. Recognition of stage-specifi micobactéria antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis. Clin Vaccine Immunol*.2006;13:179-86.

Dewan PK; Grinsdale J; kawamura LM. Low sensitivity of a whole-blood interferon-gama release assay for detection of active Tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007;44:69-73.

III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J. bras. pneumol.* São Paulo 2009;35(10):1018-1048.

Dorronsoro I; Torroba L; Microbiología de la tuberculosis. *An. Sist. Sanit. Navar*. 2007; 30 (2): 67-84.

Ducati RG, Basso LA, Santos DS. Micobactérias, cap.56 In Microbiologia. Luiz Rachid Trabulsi e Flavio Alterthum, 4ª ed, p. 409, Atheneu, SP. 2005.

Dunlap, NE; Bass J; Fujiwara P; Hopewell, P; Horshburg, CR; Simone PM. Diagnostic Standards and Classification of tuberculosis in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000;161: 1376-1395.

Ernst JD; Trevejo-Nuñez G; Banaiee N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest*. 2007; 117 (7): 1738-1745.

Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. [acesso em 8 de novembro de 2010]. Disponível em: http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html.

Ferrara G; Losi M; D'Amico R; et al. Use in routine clinical pratice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: prospective study. *Lancet*. 2006;367:1328-34.

Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(11):1387-97.

Ferreira AAA; Queiroz KCS; Torres KP; Ferreira MAF; Accioly H; Alves MSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia. *Rev. Bras. Epidemiol*. 2005;8(2):142-9.

Flores LL, Pai M, Colford JM Jr, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens: metaanalysis and meta-regression. *BMC Microbiol*. 2005;5:55.

Franco J; Camarena JJ; Nogueira JM: Blanquer R; Ruiz MJ; Marín J. Serological response (Western blot) to fractions of *Mycobacterium tuberculosis* sonicate antigen in tuberculosis patients and contacts. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001; 5(10):958–962.

Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet.* 2003;362: 887-99.

Ganguly NK, What is new in the diagnosis of tuberculosis? Part I: techniques for diagnosis of tuberculosis. *ICMR Bulletin*. 2002:32 (8).

Garg SK; Tiwari RP; Tiwari D; Singh R; Malhotra D; Ramnani VK; Prasad GBKS; Handra R; Fraziano M; Colizzi V; Bisen OS. Diagnosis of tuberculosis: available Technologies, limitantions and possibilities. *J Clin Lab Anal*. 2003;17:155-63

Gazetta CE; Ruffino-Netto A; Pinto Neto JM; Santos MLSG; Cury MRCO; Vendramini SHF; Villa TCS. O controle de comunicantes no programa de controle da tuberculose em um município de médio porte da região sudeste do Brasil, em 2002. *J Bras Pneumonol*. 2006;32 (6):559-65.

Goletti D, Carrara S, Vincenti D, Saltini C, Rizzi EB, Schinina V, Ippolito G, Amicosante M, Girardi E. Accuracy of na immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:544-550.

Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):569-76.

Gupta S; Shende N; Bhatia AS; Kumar S; Harinath BC. IgG subclass antibody response to mycobacterial serine protease at different stages of pulmonary tuberculosis *Med Sci Moni.* 2005; 11(12): 585-588.

Haddad N, Masselot M, Durand B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Research in Veterinary Science*. 2004;76:1-18.

Harboe M, Wiker HG. The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J Infect Dis*. 1992;166(4):874–884.

Harth G, Horwitz MA, Tabatadze D, Zamecnik PC. Targeting the Mycobacterium tuberculosis 30-32 kD mycolyl transferase complex as a therapeutic strategy against tuberculosis: Proof of principle by using antisense technology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15614-15619.

Haslov KAB, Andersen L, Ljungqvist MWB. Comparison of the immunological activity of five defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in seven inbred guinea pig

strains. The 38-kDa antigen is immunodominant. *Scand J Immunol*. 1990;31:503-514.

Hernandez C, Cetner AS, Jordan JE, Puangsuvan SN, Robinson JK. Tuberculosis in the age of biologic therapy. *J Am Dermatol*. 2008;59:363-380.

Hijjar MA et al. A tuberculose no Brasil e no mundo. *Bol. Pneumologia Sanitária*. 2001; 9: 9-16.

Iademarco MF, Castro KG. Epidemiology of tuberculosis. *Semin.Respir. Infect.* 2003;18.225-40.

Kanunfre, KA. Tuberculose pulmonar: aumento da eficiência diagnóstica pela associação de métodos microbiológicos e imunológicos para pesquisa de anticorpos IgG anti – *Mycobacterium tuberculosis* por *Western blotting* e interferon-gama. São Paulo, (2007). Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Kadival GV, Chaparas SD, Hussong D. Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38-kDa antigen isolated from Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*. 1987;139(7):2447–2451.

Kanunfre KA, Leite OH, Lopes MI, Litvoc M, Ferreira AW. Enhancement of diagnostic efficiency by a gamma interferon release assay for pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Jun;15(6):1028-30.

Kitaura H, Ohara N, Naito M, Kobayashi K, Yamada T. Fibronectin-binding proteins secreted by *Mycobacterium avium*. *Apmis*. 2000;108:558-564.

Kobashi Y; Mouri K; Yagi S; Obase Y; Miyashita N; Okimoto N; Matsushima T; Kageoka T; Oka M. Clinical Utility of the QuantiFERON TB-2G Test for Elderly Patients With Active Tuberculosis. *Chest.* 2008:133 (5): 1196-1202.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 682-05.

Lee JY; Choi HJ; Park IN. Comparison of two commercial interferon-gamma assays dor diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J*. 2006: 28: 24-30.

Lewis KN, Liao R, Guin KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. Deletion RD1 from Mycobacterium tuberculosis mimics bacilli Calmete-Guerin attenuation. *J Infect Dis*. 2003;187: 117-123.

Lowry OH, Rosebrough D, Farr C, Randal RJ. Protein measure with the phenol reagent. *J Biochem*. 1981;193:265-75.

Magota K, Otsuji N, Miki T, Horiuchi T, Tsunasawa S, Kondo J, Sakiyama F, Amemura M, Morita T, Shinagawa H, et al. Nucleotide sequence of the phoS gene, the structural gene for the phosphate-binding protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1984;157(3):909–917.

Mahairas GG, Sabo PJ, Hickei MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996;178:1274-1282.

Mehrotra J, Bishai WR. Regulation of virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2001; 291(2):171-182.

Mello FC, Fonseca-Costa J. The utility of molecular biology in the diagnosis of tuberculosis. *J Bras Pneumol.* 2005;31(3):187-9.

Mizusawa M; Kawamura M; Takamori M; Kashiyama T; Fujita A; Usuzawa M; Saitoh H; Ashino Y; Yano I; Hattori T. Increased Synthesis of Anti-Tuberculous Glycolipid Immunoglobulin G (IgG) and IgA with Cavity Formation in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 3 (15): 544–548.

Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun* 1991;59 372-382.

North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:599-623.

Ongut G, Ogunc D, Gunseren F, Ogus C, Donmez L, et al. Evaluation of the ICT tuberculosis test for the routine diagnosis of tuberculosis. *Infect Dis.* 2006;6: 37.

Oznur Ak; Dabak G; Ozer S; Saygi A; Dabak R. The evaluation of the Quantiferon-TB Gold Test in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 2009; 62: 149-151.

Pai M; Riley IW; Colford JMJ. Interferon-assays the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:761-6.

Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J*. 2005;26(2):339-50.

Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. From basic science to patient care. *Tuberculosis* 2007; 3:687.

Park HD, Guinn KM, Harrell MI, Liao R, Voskuil MI, Tompa M, Schoolnik GK, Sherman DR. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*. 2003;48 (3): 833-843.

Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol* 2004;17:98-106.

Qamra R, Mande SC, Coates AR, Henderson B. The chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb.* 2005;85:385-394.

Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ. Improved diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of free and immune complex-bound anti-30kDa antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;50:253-259.

Rambukkana A, Das PK, Kolk AH, Burggraaf JD, Kuijper S, Harboe M. Identification of a novel 27kDa protein from Mycobaterium tuberculosis culture fluid by a monoclonal antibody specific for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Scand J Immunol*. 1993;37:471-478.

Rastogi N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. *Res Microbiol*. 2001;142:464-476.

von Reyn CF, Vuola JM. New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2002;35:465-474.

Rinke de Wit TF, Bekelie S, Osland A, Wieles B, Janson AA, Thole JE. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C and related MPT51 proteins. *Infect Immun.* 1993;61:3642-3647.

Rodrigues L, Barreto M, Kramer M, Barata RCB. Resposta brasileira à tuberculose: contexto, desafios e perspectives. *Revista de Saúde Púbica*. 2007; 41:1-2.

Rosenkrands I, Slayden RA, Crawford J, Aagaard C, Barry CE, Andersen P. Hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *Journal of bacteriology*. 2002;184 (13): 3485-3491.

Sable SB, Kaur S, Verma I, Khuller GK. Immunodominance of low molecular weight secretory polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis* to induce cytotoxic I-lymphocite responde. *Vaccine*. 2005a;23:4947-4954.

Sable SB, Kumar R, Kalra M, Verma I, Khuller GK, Dobos K, Belisle JT. Peripheral blood and pleural fluid mononuclear cell responses to low-molecular-mass secretory polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis* in human models of immunity to tuberculosis. *Infect Immun*. 2005b;73:35473558.

Sable SB, Kumar R, Kalra M, Verma I Khuller GK, Dobos K, Belisle JT. Peripheral blood and pleural fluid mononuclear cell responses to low-molecular-mass secretory of *Mycobacterium tuberculosis* in human models of immunity to tuberculosis. *Infect Immun*. 2005;73:3547-3558.

Samaninch k, Belisle JT, Laal S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immunity*. 2001;69:4600-09.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de controle de doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Tuberculose no Estado de São Paulo indicadores de morbidade e indicadores de desempenho. *Boletim Epidemiológico Paulista*. 2006. 4 (Suppl), 3:7-37.

Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, Liao R, Harrell MI, Schoolnik GK. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding α-crystallin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001; 98(13):7534-7539.

Silva JRL; Boéchat N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2004; 30(4):478-484.

Singh KK, Dong Y, Hinds L, Keen MA, Belisle JT, Zolla-Pazner S, Achkar JM, Nadas AJ, Arora VK, Laal S. Combined use of serum and urinary antibody for diagnosis of tuberculosis of tuberculosis. *J Infect Dis*. 2003;188: 371-377.

Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AP. Purification an characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995;63: 1710-1717.

Smith J. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:463-96.

Surin BP, Jans DA, Fimmel AL, Shaw DC, Cox GB, Rosenberg H. Structural gene for the phosphate-repressible phosphate-binding protein of *Escherichia coli* has its own promoter: complete nucleotide sequence of the phoS gene. *J Bacteriol*. 1984;157(3):772–778.

Tan T, Lee WL, Alexander DC, Grinstein S, Liu J. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of Mycobacterium marinum modulates phagosome maturarion. *Cell Microbiol* 2006;8:1417-1429.

Teixeira HC; Abramo C; Munk ME. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *J. Bras. Pneumonol.* 2007; 33 (3): 323-334.

Towbin N, Satehelin T, Bordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1979;76:43650-4.

Tsiouris SJ; Coetzee D; Toro PL; Austin J; Stein Z; El-Sadr W. Sensitivity analysis and potential uses of a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2844-50.

Ulrichs T, Kaufmann SH. 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol*. 2006;208:261-269.

Uma Devi KR, Ramalingam B, Raja A. Antibody response to Mycobacterium tuberculosis 30 and 16kDa antigens in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46:205-09.

Vendramini SHF et al. Tuberculose em município de porte médio do sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e de mortalidade, de 1985 a 2003**.** *J. Bras. Pneumologia.* 2005;31:237-243.

Viana-Niero C; Leão SC. Limitações do uso do fragmento *mtp40* como marcador de diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*. *J. bras. pneumol.* 2004; 30:4.

Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, Harrell MI, Dolganov GM, Sherman DR, Schoolnik GK. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(5):705-713.

Wang BL, Xu Y, Li ZM, Xu, YM, Weng XH e Wang HH. Antibody response to four secretory proteins for *Mycobacterium tuberculosis* and their complex antigen in TB patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;91327-1334.

Wilson RA, Rai S, Maughan WN, Kremer L, Besra GS, Futterer K. The structure of Mycobacterium tuberculosis MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. *J Mol Biol*. 2004;335:519-530.

Wilson RA, Rai S, Maughan WN, Kremer L, Kariuki BM, Harris KD, Wagner T, Besra GS, Futterer K3. Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of Mycobacterium tuberculosis FbpC1 (Rv3803). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2003;59:2303-2305.

World Health Organization. Diagnostics for tuberculosis: global demand and mark potential / TDR, FIND SA. 2006. Available from: http://www.who.org.

World Health Organization. Report – Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. 2006. Available from: http//www.who.org.

World Health Organization. Report - Global tuberculosis control : epidemiology, strategy, financing. 2009. Available from: http//www.who.org.

Yuan Y, Crane DD, Barry C. Stationary phase-associated protein expression in Mycobacterium tuberculosis: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *Journal of Bacteriology*. 1996;178(15):4484-4492.

Zengyi C, Abha CS, Raju L, Florante A, Quiocho S. The Immunodominant 38-kDa Lipoprotein Antigen of Mycobacterium tuberculosis Is a Phosphate-binding Protein *The Journal of Biological Chemist*. 1994;269(3):1956-1968.

Zhang Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 2005; 45: 529-64.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ( ) F ( )

DATA NASCIMENTO: / /

ENDEREÇO Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE:

2.RESPONSÁVEL LEGAL :

NATUREZA:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M( ) F( )

DATA NASCIMENTO: / /

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE:

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CLÍNICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Avaliação da resposta imunológica de pacientes com tuberculose pulmonar, por Western Blotting (classes e subclasses de imunoglobulinas), QuantiFERON® TB Gold (Interferon Gama) e ELISA (moléculas de adesão) durante e após o tratamento.

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira

CARGO/FUNÇÃO: Vice Diretor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP) da Universidade de São Paulo.

REGISTRO NO CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA Nº: 4806

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: Risco Mínimo

4.DURAÇÃO DA PESQUISA :24 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) em uma pesquisa para a padronização e desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico rápidp e específico da tuberculose humana, infecção causada pelo bacilo de *M. tuberculosis*. Antes de decidir se quer ou não participar, você precisa compreender o objetivo do estudo, como sua participação poderá ajudá-lo, os riscos decorrentes de sua participação e o que é esperado de você durante o estudo.

SEUS DIREITOS

Este termo de consentimento livre e esclarecido explica a pesquisa, porém o pesquisador responsável pelo projeto também poderá ler com você e dar as explicações, assim como poderá responder a qualquer dúvida que você venha a ter. Se você concordar em participar, você será solicitado(a) a assinar este termo de consentimento livre e esclarecido e receberá uma cópia para guardar. Ninguém pode forçá-lo(a) a participar deste estudo. Mesmo se concordar em participar agora, você poderá mudar de idéia e retirar seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a assistência a que tenha direito. Por favor, tenha certeza de ter revisado completamente este documento e de perguntar quaisquer dúvidas que lhe ocorram antes de assinar o mesmo.

OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo do estudo é padronizar testes de laboratório, para diagnóstico de pessoas infectadas com o bacilo da tuberculose. Com o resultado será possível iniciar rapidamente o tratamento das pessoas que se encontrarem com a doença ativa, contendo a sua transmissão.

Serão colhidas amostras de sangue dos seguintes grupos:

Grupo I: Pacientes com tuberculose

Serão colhidas amostras de sangue de 30 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, independente de idade, sexo e grupo étnico que estiverem sendo atendidos no ambulatório de tuberculose do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-SP). Serão selecionados os pacientes que tiverem resultado de pesquisa direta para o bacilo de Koch (BK) positiva ou apresentarem sintomas e alterações radiológicas sugestivas de infecção tuberculosa. A espécie da micobactéria será definida posteriormente por métodos microbiológicos e moleculares. Somente será feita colheita de amostra de sangue dos pacientes que ainda não iniciaram o tratamento. Será colhida uma amostra de sangue pré-tratamento, após dois meses, ao final do tratamento, perfazendo um total de 90 amostras a serem analisadas.

Grupo II: Indivíduos sadios

Serão colhidas amostras de sangue de 30 indivíduos adultos (18 a 55 anos), sadios, independente de sexo e grupo étnico com intradermoreação negativa.

PROCEDIMENTOS
Se você concordar em participar deste estudo, você será submetido(a) a uma entrevista a respeito das doenças que já teve, um exame clínico, exames de sangue.
Durante a pesquisa, será retirada uma amostra de sangue. Essas amostras serão usadas para verificar a presença de componentes antigênicos de micobactérias e anticorpos formados contra o bacilo da tuberculose. A presença destes anticorpos pode indicar se você entrou em contato, de alguma forma, com o agente causador da Tuberculose. Caso você esteja com tuberculose ativa, será necessário solicitar a presença das pessoas que convivem com você, para que estas sejam exminadas, para verificar se elas também estão com a doença.

DESCONFORTOS E RISCOS

O sangue será coletado dentro das normas de segurança e dentro das dependências do hospital ou laboratório, com risco mínimo para você.

BENEFÍCIOS
Você estará colaborando para a realização de um teste que poderá auxiliar, no futuro, no diagnóstico da tuberculose. Este estudo não trará benefício direto para você.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá a garantia, a qualquer tempo, que receberá as informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para o esclarecimento de qualquer dúvida.
2. Você não terá custos adicionais ao participar deste estudo. Todos os custos da consulta, dos profissionais médicos e enfermeiros e exames laboratoriais que forem parte deste estudo serão fornecidos gratuitamente. Você ou seu provedor de assistência médica serão responsáveis por quaisquer outros custos de assistência médica.

3. As pessoas envolvidas neste estudo, inclusive médicos e investigadores, terão acesso aos prontuários de forma que possam acompanhar o progresso da pesquisa. Não haverá nomes nem outra identificação dos pacientes em nenhum relatório ou publicação do estudo. Toda a informação médica adquirida durante este estudo será tratada como confidencial e será apenas dada a conhecer aos investigadores. Só os dados anônimos serão usados para possível publicação em publicações científicas.

4. Disponibilidade de assistência no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, por eventuais danos à saúde, decorrentes desta pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Caso você apresente algum evento fora de seu período avaliação, você deverá entrar em contato com os investigadores e coordenadores deste projeto de pesquisa. Os investigadores são os Dr. Antonio Walter Ferreira, ou Clara Felix, pelos telefones: 3061-0416 (horário comercial) ou 2557-5928.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Nenhuma

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Apenas voluntários serão incluídos como participantes neste estudo.
Recebi e li as informações relativas a este estudo. O desenho e o objetivo do estudo foram explicados de forma adequada, tive ampla oportunidade para fazer perguntas que foram respondidas satisfatoriamente. Estou ciente dos possíveis riscos (para a minha saúde e bem estar) envolvendo a minha participação neste estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido, estou ciente que posso abandonar este estudo em qualquer altura, sem para isso dar razão e sem que isso tenha conseqüência negativa para o meu tratamento futuro. Consinto que se envie uma carta ao meu médico acerca da minha participação neste estudo, se for o caso. Consinto em participar deste estudo como descrito neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
Quando você assinar na linha abaixo, isto significa que concorda em participar da pesquisa descrita acima. É preciso que a sua assinatura seja obtida antes da realização de qualquer procedimento do estudo.

Data ___/___/ ___ Hora: ___:___

_____

assinatura do paciente ou do responsável legal

Data ___/___/ ___ Hora: ___:___

_____

assinatura do pesquisador responsável