

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Padronização e desenvolvimento de testes sorológicos para o
diagnóstico da tuberculose humana**

Sandra Trevisan Beck

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientador:
Prof. Dr Antônio Walter Ferreira**

**São Paulo
2003**

T
616.0256-9

B393 p

17762

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005740

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Beck, Sandra Trevisan
B393p **Padronização e desenvolvimento de testes sorológicos
para o diagnóstico da tuberculose humana / Sandra Trevisan
Beck. -- São Paulo, 2003.**

168p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Ferreira, Antônio Walter

I. Imunodiagnóstico : Medicina 2. Tuberculose I. T.
II. Ferreira, Antônio Walter, orientador.

616.0756-9 CDD

Sandra Trevisan Beck

Padronização e desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico da tuberculose humana.

Comissão Julgadora
Tese para obtenção do grau de
Doutor

Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2003.

Aos meus pais Ivo e Therezinha Beck
pelo carinho e apoio que sempre recebi
para trilhar o meu próprio caminho.

*“Não se contente em trilhar um caminho estabelecido. Ao contrário, vá para onde não há
caminho algum e deixe seu rastro.”*
(Muriel Strode)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Antônio Walter Ferreira, o qual não só orientou a execução deste trabalho, como me estimulou a crescer profissionalmente, mostrando caminhos, dando apoio, e tornando-se um grande amigo, que continuará presente mesmo após o final desta jornada.

Ao Dr Olavo Munhoz Leite, pela oportunidade de acompanhar o atendimento no ambulatório de tuberculose do Hospital das Clínicas, permitindo a elaboração da soroteca utilizada neste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas, que tão bem me receberam, permitindo acesso a estrutura necessária para realização do cultivo de *M. tuberculosis*, sem o qual não seria possível realizar parte importante da pesquisa desenvolvida.

A todos os funcionários do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical – SP que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

A todas as minhas colegas e amigas do laboratório de malária, que estiveram presente nos momento de angustia e alegria nestes quatro anos. Fabiana, sempre organizada, encontrando o que precisasse ser localizado. Kelly Kanunfre, minha companheira, inclusive nos longos finais de semana. Érika, a nossa maior líder de idéias. Guita e Carmem, que no decorrer do tempo associaram-se ao grupo não só

para bons trabalhos, mas grandes comemorações. Amanda, Mônica, Janaína, trazendo muita alegria e bons momentos para serem recordados. Kelly Dias, Patrícia, Juliana, Melissa, enfim, todos vocês foram a minha família longe de casa, tornando todos estes anos não só produtivos profissionalmente, mas muito importante na minha vida pessoal.

A Sandra do Lago Moraes, minha consultora para as mais variadas situações. Minha amiga! Se fosse agradecer por todas as vezes que me ajudou, teria que citar teu nome em cada um destes parágrafos. Obrigada por tudo e por sua amizade.

A Elaine Antunes de Lemos, minha nova irmã de coração, por todo apoio, carinho, amizade.

A Deus, sempre presente no meu caminho.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada querer. Um dia é preciso parar de sonhar, tirar os planos das gavetas e de algum modo, partir.”
Amir Klink

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Epidemiologia	16
1.2	Agente Etiológico	20
1.3	Patogenia da Tuberculose	22
1.4	Aspectos Clínicos	25
1.5	Diagnóstico da Tuberculose	26
1.5.1	Diagnóstico microbiológico.....	27
1.5.1.1	Baciloscopia.....	27
1.5.1.2	Cultura e Identificação micobacteriana.....	28
1.5.2	Diagnóstico Imunológico.....	29
1.5.2.1	Antígenos micobacterianos.....	29
1.5.2.2	Testes sorológicos.....	34
1.5.2.3	Imunidade celular.....	37
1.5.3	Diagnóstico Molecular.....	39
1.5.4	Métodos de Imagem.....	41
1.6	Justificativa	41
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivos Gerais	44
2.2	Objetivos Específicos.....	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	Casuística	46
3.2	Aspectos éticos da pesquisa	49
3.3	Obtenção de Antígeno bruto de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
3.3.1	Cultivo de <i>M. tuberculosis</i>	50
3.3.2	Extração do antígeno bacteriano bruto.....	51
3.4	Avaliação do antígeno bruto	52
3.4.1	Dosagem protéica.....	52
3.4.2	Determinação da reprodutibilidade na produção do extrato antigênico	53
3.4.2.1	Coloração pela prata.....	53
3.5	Padronização de Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) e Western blotting	54
3.5.1	Visualização das frações protéicas através do western blotting.....	55
3.5.2	Tempo de incubação do soro no ensaio western blotting.....	56

3.6	Antígenos Recombinantes	57
3.7	Padronização do Teste Imunoenzimático	58
3.7.1	Estudo da diluição dos soros e concentração de antígenos.....	58
3.7.1.1	Antígeno Bruto.....	58
3.7.1.2	Antígenos recombinantes.....	58
3.7.2	Fase sólida.....	59
3.7.3	Obtenção do Conjugado Enzimático.....	60
3.7.4	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	60
3.8	Determinação do Limiar de Reatividade	61
3.8.1	Curvas ROC.....	62
3.8.2	Índice de Youden.....	62
3.8.3	Índice Kappa.....	64
3.9	Análise Estatística	65
4	RESULTADOS	66
4.1	Avaliação do Antígeno Bruto	67
4.1.1	Dosagem do conteúdo Protéico.....	67
4.1.2	Definição das concentrações de gel e extrato antigênico.....	67
4.1.3	Reprodutibilidade dos lotes antigênicos.....	69
4.2	Tempo de incubação da amostra no western blotting	69
4.3	Padronização do teste ELISA com os diferentes antígenos	70
4.3.1	Antígeno bruto de <i>M. tuberculosis</i>	70
4.3.2	Antígenos Recombinantes.....	74
4.4	Determinação do Limiar de reatividade	75
4.4.1	Análises de curvas ROC.....	77
4.5	Aplicação do ELISA em diferentes populações	81
4.5.1	Resultados dos testes nas diferentes populações.....	81
4.5.2	Avaliação em diferentes formas de tuberculose, micobacterioses e contactantes.....	85
4.5.3	Acompanhamento de pacientes submetidos à quimioterapia.....	90
4.6	Associação dos resultados sorológicos com dados microbiológicos e radiológicos	94
4.6.1	ELISA relacionado ao exame radiológico.....	94
4.6.2	ELISA relacionado a baciloscopia.....	94
4.7	Western-blotting IgG com antígeno bruto de <i>M. tuberculosis</i>	96
4.7.1	Pacientes com tuberculose pulmonar.....	96
4.7.2	Indivíduos com outras pneumopatias que não tuberculose.....	98
4.7.3	Indivíduos contactantes.....	98
4.7.4	Indivíduos sadios.....	98
4.7.5	Doadores de banco de sangue.....	99

4.7.6	Determinação de perfis de reatividade.....	100
4.7.6.1	Pacientes com tuberculose pulmonar.....	101
4.7.6.1.1	Perfil sorológico associado ao exame radiológico.....	104
4.7.6.2	Indivíduos sadios e com outras pneumopatias não tuberculosa.....	105
4.7.6.3	Indivíduos contactantes e doadores de banco de sangue.....	107
4.7.6.4	Pacientes com micobacteriose pulmonar por <i>M. kansasii</i>	110
4.7.6.5	Pacientes com tuberculose ganglionar.....	111
5	DISCUSSÃO	112
6	CONCLUSÕES	138
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
8	APENDICES	
	A- Características e dados microbiológicos e radiológicos dos pacientes com tuberculose pulmonar.....	158
	B- Características e dados microbiológicos e radiológicos dos pacientes com tuberculose ganglionar.....	160
	C- Reatividade dos soros de indivíduos sadios frente a diferentes antígenos e resultado do teste intradérmico (PPD).....	161
9	ANEXOS	
	A – Termo livre esclarecido.....	162

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática da parede celular de micobactérias p.21
- Figura 2** Western blotting realizado após separação eletroforética do antígeno bruto em gel gradiente (7%-20%) p. 68
- Figura 3** Reprodutibilidade de diferentes lotes de extrato antigênico em SDS-PAGE corado pela prata p.69
- Figura 4** Western blotting realizado em diferentes tempos de incubação p.70
- Figura 5** Determinação da concentração antigênica do antígeno bruto p.72
- Figura 6** Reatividade de amostras de soro de pacientes tuberculosos com alta, média e baixa reatividade e indivíduos saudáveis, em diferentes diluições frente ao antígeno bruto p.73
- Figura 7** Reatividade de amostras de soro de pacientes tuberculosos com alta, média e baixa reatividade e indivíduos saudáveis, em diferentes diluições frente a diferentes antígenos recombinantes p.74
- Figura 8** Determinação do limiar de reatividade: densidades ópticas observadas nos soros de indivíduos saudáveis p. 76
- Figura 9** Curva ROC para antígeno bruto p.78
- Figura 10** Curva ROC para antígeno TbF6 p. 78
- Figura 11** Curva ROC para antígeno TbF10 p. 79
- Figura 12** Curva ROC para antígeno Mtb81 p.79
- Figura 13** Curva ROC para antígeno TbF6/DPEP p.80
- Figura 14** Representação associada das curvas ROC elaboradas para cada antígeno p.80
- Figura 15** Reatividade dos soros das diferentes populações estudadas em testes ELISAs com diferentes antígenos p.83
- Figura 16** Correlação entre antígeno TbF6 e TbF6/DPEP em soros de pacientes tuberculosos p.84
- Figura 17** Resultado da pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos TbF6 e TbF6/DPEP nos soros das diferentes populações estudadas p.86
- Figura 18** Resultado da pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos TbF10, bruto e Mtb81 nos soros das diferentes populações estudadas p. 87

- Figura 19** Média das densidades ópticas apresentadas por contactantes e indivíduos sadios nos testes ELISAs p.89
- Figura 20** Evolução sorológica dos pacientes tuberculosos observada para os diferentes antígenos estudados p91
- Figura 21** Mediana das densidades ópticas observadas no ELISA realizado com diferentes antígenos, relacionadas com a pesquisa direta (BK) p.95
- Figura 22** Freqüência de reconhecimento das frações antigênicas com diferentes pesos moleculares (kDa) em soro de pacientes tuberculosos colhidos em diferentes momentos p.97
- Figura 23** Freqüência de reconhecimento das frações antigênicas com diferentes pesos moleculares (kDa) em indivíduos não apresentando infecção tuberculosa p.99
- Figura 24** Perfis de reatividade apresentados no western blotting por soro de pacientes com tuberculose ativa p.102
- Figura 25** Perfil de reatividade no western blotting apresentado pelos pacientes com tuberculose pulmonar divididos pelos resultados observados nos ELISAs e baciloscopia direta p.103
- Figura 26** Perfis de reatividade encontrados nos western blotting realizados com soros de pacientes apresentando outras pneumopatias p. 105
- Figura 27** Perfil de reatividade no western blotting apresentado pelos indivíduos sadios e com outras pneumopatias divididos pelos resultados observados nos ELISAs TbF6 e TbF6DPEP p. 106
- Figura 28** Perfil de reatividade encontrados nos western blotting realizados com soros de indivíduos contactantes p.107
- Figura 29** Perfil de reatividade no western blotting apresentado pelos indivíduos contactantes e doadores de banco de sangue divididos pelos resultados observados nos ELISAs TbF6 e TbF6DPEP p. 109

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Diagnósticos estabelecidos para os indivíduos pertencentes ao grupo de outras pneumopatias p. 48
- Tabela 2** Densidades ópticas observadas no ELISA utilizando diferentes concentrações do extrato antigênico bruto de *M. tuberculosis*, em diferentes diluições de soros reagentes e não reagentes p.72
- Tabela 3** Parâmetros sorológicos determinados para os diferentes antígenos nas diferentes populações estudadas p. 81
- Tabela 4** Reatividade apresentada pelos soros colhidos pré-tratamento dos pacientes com tuberculose pulmonar durante terapia medicamentosa p.92
- Tabela 5** Resultados bacteriológicos e sorológicos nos ELISAs com antígeno TbF6 e TbF6/DPEP e perfil de reatividade de anticorpos IgG em soros colhidos pré-tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar confirmada p.103
- Tabela 6** Perfil de reatividade no western blotting e ELISA IgG anti- TbF6 e TbF6/DPEP em indivíduos sadios e com outras pneumopatias p.106
- Tabela 7** Perfil de reatividade no western blottintg e ELISA IgG anti TbF6 e TbF6/DPEP em soros de contactantes e população de doadores de sangue p.109
- Tabela 8** Padrão de reconhecimento de anticorpos IgG (western blotting) reativos contra frações antigênicas obtidas de sonicação de *M. tuberculosis*, presente em soro de pacientes com tuberculose ganglionar, em diferentes tempos p. 110
- Tabela 9** Padrão de reconhecimento de anticorpos IgG (western blotting) reativos contra frações antigênicas obtidas de sonicação de *M. tuberculosis*, presente em soro de pacientes com micobacteriose por *M. kansasii* em diferentes tempos p.111
-

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR: bacilo álcool ácido resistente

BK: bacilo de Koch

BSA: soro albumina bovina

BCG: bacilo de Calmet Guerin

CHP: complexo de histocompatibilidade principal

D.O. : densidade óptica

DOTS: "Directly Observed Therapy-short Course" –Terapia supervisionada

DTT: dietiltreitol

EDTA: etilenodiaminotetracético ácido

ELISA: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"

HIV: Vírus da Imunodeficiência humana

INF- γ - Interferon gama

ME: mercaptoetanol

OMS : Organização Mundial da Saúde

PCR: "Polymerase chain reaction (" reação em cadeia da polimerase ")

PBS – Solução salina tamponada com fosfatos (phosphate buffer saline)

PBS-T: PBS contendo tween 20

PM: Peso molecular

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonida ("phenylmethyl sulfonyl fluoride")

PPD: derivado protéico purificado ("purified protein derivative")

RM: ressonância magnética

ROC: "Receiver Operating Characteristic"

SDS- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio.

SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida

TC: tomografia computadorizada

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF α : Fator de necrose tumoral

RESUMO

Beck S.T. – Padronização e desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico da tuberculose humana. – São Paulo, 2003, 1v. 168 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

A identificação e caracterização de antígenos de *M. tuberculosis* que tenham papel relevante durante a resposta imune, levando a formação de anticorpos específicos, que possam ser detectados durante a infecção tuberculosa, e a formatação de testes diagnósticos, têm sido alvo de inúmeras pesquisas nos últimos anos. Diversos antígenos e combinação de antígenos recombinantes ou sintéticos têm sido empregados em diferentes métodos sorológicos. No presente trabalho a eficiência diagnóstica dos antígenos recombinantes, específicos de *M. tuberculosis*, TbF6, TbF10, Mtb81, a associação TbF6/DPEP, e antígeno protéico bruto foi avaliada através do método de ELISA. Por western blotting com antígeno protéico bruto de *M. tuberculosis* procuramos definir perfis sorológicos avaliando a resposta imune contra diferentes frações antigênicas, principalmente as de baixo peso molecular. Foram avaliadas 132 amostras de soro colhidas de 44 pacientes com tuberculose pulmonar confirmada por critérios clínicos e microbiológicos, acompanhados até o final do tratamento, 25 amostras obtidas de indivíduos contactantes, 30 amostras de indivíduos saudáveis, com teste intradérmico conhecido, 50 amostras de indivíduos portadores de outras pneumopatias e 200 amostras de indivíduos doadores de sangue. Os melhores resultados para o método ELISA foram obtidos com a associação de antígenos TbF6/DPEP, o qual apresentou 86% de sensibilidade e 91% de especificidade. Associando os resultados de ELISA e western blotting obtivemos 93% de sensibilidade. Os valores preditivos positivos para os perfis determinados através da reatividade simultânea para as frações antigênicas 6-16- kDa, 6-38kDa e 16-38kDa foi de 100%, uma vez que estes perfis encontravam-se ausentes em indivíduos saudáveis e com outras pneumopatias. Estas associações encontraram-se presentes em 67% dos pacientes com tuberculose ativa e em 8% dos contactantes. Nesses indivíduos, a alta especificidade observada para estes perfis sugere não doença corrente, mas presença de tuberculose latente, com risco de reativação quando dados epidemiológicos, radiográficos ou sinais clínicos significantes estiverem presentes.

Palavras chave: diagnóstico, *M. tuberculosis*, recombinantes, anticorpos.

ABSTRACT

BECK, Sandra Trevisan - Standardization and development of serological test to diagnosis of human tuberculosis – São Paulo, 2003, 1v. 168 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

For a number of years, much effort has been devoted to the identification of immunologically important antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and to the combination of target antigens to which antibodies from serum of tuberculous patients could react specifically. Many antigens have been employed in ELISA method. To compare the efficacy of different mycobacterial specific antigens and to assess the applicability of the combination of several different antigens in the diagnosis of tuberculosis, ELISA tests based on the recombinant TbF6[®], TbF10[®], Mtb81 association TbF6/DPEP and crude antigens of *M. tuberculosis* were evaluated. To detect differences in the antibody response to low molecular weight antigens between patients with pulmonary tuberculosis and contacts we searched, by Western blot analysis, for IgG antibodies specific for 45 to 6 kDa obtained after sonication of the wild well-characterized *M. tuberculosis* strain. Specific IgG antibodies were detected of 132 serum samples collected from 44 patients with confirmed pulmonary tuberculosis well defined by clinical and microbiological criteria followed for six months of therapy. We also analyzed 25 samples obtained from contacts, as well as 30 samples from healthy individuals with known tuberculin status, 50 samples from patients with other lung diseases and 200 samples from healthy blood donors. Best ELISA results were obtained with the TBF/DPEP antigen combination, which presented 86,36% sensitivity and 91% specificity. ELISA sensitivity improved from 86% to 93% when the Western blot results were associated. Profiles by western blotting analysis shown positive predictive value of 100% for associated IgG reactivity against the 6 kDa and 16kDa antigens, 6kDa and 38kDa, and 16kDa and 38kDa once none of the patients with other lung disease or healthy individuals reacted simultaneously with the bands mentioned above. This association was observed in 67% of the patients, and in 8% of the contacts. The high specificity obtained for the reactivity profile may suggest future active, but not current disease when present in people with latent tuberculosis, with higher risk of reactivation when additional clinical, epidemiological or radiographic features were present.

Key-words: diagnosis, *M. tuberculosis*, recombinant antigens, low molecular mass

1-INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa, severa, de distribuição universal, responsável pela morte de aproximadamente dois milhões de pessoas a cada ano. É causada por *Mycobacterium tuberculosis* e tem como foco inicial os pulmões. Corresponde a 2,5% das doenças existentes no planeta, com 22 países concentrando 80% dos casos existentes no mundo. O Brasil encontra-se em 14º lugar, considerando-se o número total de casos novos. É um problema cada dia mais grave, permanecendo como uma das três principais doenças infecciosas fatais, junto com a síndrome da imunodeficiência (SIDA) e malária.

1.1-EPIDEMIOLOGIA:

Desde o início dos tempos a tuberculose tem acompanhado a humanidade, permanecendo até hoje como um problema relevante para a saúde pública mundial. No início do século XVII era tida como doença hereditária, por acometer pessoas aparentadas que compartilhavam a mesma habitação.

A revolução industrial em meados de 1760 (século XVIII), o crescimento urbano e a pobreza foram responsáveis por uma epidemia de tuberculose na Europa, disseminada para o resto do mundo através da migração intercontinental (BATES e STEAD, 1993).

Em 1865, Jean Antoin VILLEMIN, inoculando material infectante obtido de cadáveres, em cobaias, defendeu a hipótese da transmissibilidade da doença. Em 1882, Robert Koch publicou os primeiros trabalhos sobre a identificação do agente etiológico da doença. (KOCH, 1982).

A descoberta do agente etiológico teve pouca influência na queda da mortalidade e morbidade da tuberculose, uma vez que não havia como instituir

tratamento adequado. A idade e sexo eram os fatores importantes relacionados com a epidemia existente. Foi a introdução da isoniazida como droga terapêutica em 1952, que fez com que estes índices apresentassem um declínio real (BIGNALL, 1971).

Em 1971, devido ao tratamento com quimioterápicos e com a melhoria das condições de vida nos países desenvolvidos, previu-se em congresso médico que a erradicação da doença ocorreria até o ano de 2010 (BIGNALL, 1971).

Porém, desde 1985, o número de casos de tuberculose voltou a aumentar. Os problemas sócio-econômicos mundiais, o aparecimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistentes e a deficiência dos programas de controle, junto com a co-infecção tuberculose/HIV, impediram que a erradicação da infecção tuberculosa fosse alcançada.

Em 1993, o crescimento da incidência da tuberculose no mundo, e a previsão de que no ano de 1997, um terço da população mundial (2 bilhões de pessoas) estaria infectada por *M. tuberculosis* e 5% desenvolveriam a doença ativa durante os primeiros anos após a exposição, se não houvesse esforço para o seu combate, levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar estado de urgência para essa patologia (RAVAGLIONE et al, 1995).

Em diversos países foi proposta a introdução do tratamento supervisionado ("Directly Observed Therapy-short Course" -DOTS), com o objetivo de tratar o paciente com tuberculose ativa, limitando assim a transmissão da doença. (WHO, 1995). Porém muitos países em desenvolvimento não conseguiram implantar o programa com eficiência necessária, e em março de 2000, a OMS lançou uma declaração mundial, a "*Amsterdam Declaration to Stop TB*" clamando por uma

expansão e rapidez nas medidas de controle da tuberculose, e aumento de recursos financeiros e políticos para o controle mundial. (WHO/ maio /2000).

Hoje, a OMS estima que ocorram no mundo cerca de 8 a 9 milhões de casos novos de tuberculose por ano com aproximadamente 3 milhões de mortes.

A variação da incidência de tuberculose no mundo está diretamente ligada as diferenças existentes entre as condições sócio-econômicas de cada país. Os coeficientes de incidência por 100.000 habitantes são mais elevados na Ásia (400 nas Filipinas, 220 na Índia) e na África (222 na Nigéria, 104 na África do Sul), e mais baixos nos países desenvolvidos (8,5 nos Estados Unidos) sendo que nestes, a doença é mais freqüente entre pessoas idosas, minoria étnica e imigrante estrangeiros. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a incidência varia de 50 a 90 por 100.000 habitantes (MAHER e RAVIGLIONE, 1999), acometendo principalmente os adultos jovens, na idade produtiva entre 20 e 40 anos (WHO/CDS/2000).

Para o Brasil, a estimativa é uma incidência de 129 mil casos por ano, evidenciando um sério problema de saúde pública, que nunca deixou de existir. Estima-se que 50 milhões de habitantes estejam infectados pelo bacilo da tuberculose. (FUNASA,1998). Até a década de 90, as taxas de incidência de tuberculose estavam declinando cerca de 2% a 4% ao ano. Este declínio na última década foi de aproximadamente 0,4%, refletindo um aumento na incidência da doença. (KRITSKI e RUFFINO-NETTO, 2000).

No início do ano de 1997, o Ministério da Saúde lançou um plano emergencial para o controle da doença. Porém, em 1998, por persistirem problemas como o baixo percentual de cura e detecção dos casos, foi lançado o Plano Nacional

de Controle da Tuberculose, e introduzido o tratamento supervisionado. (RUFFINO-NETTO, 2001)

Apesar de todos os esforços, a situação continuou grave. Os maiores números de casos notificados em 2000, em ordem decrescente, ocorreram nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Minas Gerais, e Rio Grande do Sul, sendo que Rio de Janeiro e São Paulo detém 50% dos casos do Brasil. Foram 80.600 casos novos no país, com um coeficiente de incidência de 50-60 casos/100.000 habitantes, no entanto, em alguns municípios brasileiros chega a 210/100.000 (Cedro-PE) ou 160/100.000 (RJ). As taxas de mortalidade ainda são consideradas elevadas, variando entre 5,9 a 3,6 por 100 mil habitantes. (FUNASA, 2002). A forma pulmonar é predominante (80% dos casos) principalmente em pacientes maiores de 15 anos, com 30% dos casos não sendo detectados pela baciloscopia. Em indivíduos menores de 15 anos, aumentam os casos de tuberculose extrapulmonar, neste grupo, 80% das formas pulmonares não conseguem ser confirmadas através da pesquisa baciloscópica. (FUNASA-1999/2000). Entre os casos de sida no momento da notificação, tem-se observado um percentual de associação de tuberculose, de todas as formas, próximo a 30%, sendo a segunda causa de óbito depois de outras pneumopatias. (HIJJAR et al, 2001).

Recentemente, a OMS passou também a considerar como relevante o risco ocupacional entre profissionais de saúde com atividades assistenciais de controle da tuberculose em países em desenvolvimento (WHO/CDC/TB/99.269).

Dados de um inquérito de prova tuberculínica realizada em 351 profissionais do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), mostraram uma taxa de conversão tuberculínica

(marcador de infecção recente pelo bacilo) com intervalo de 1 ano, de 8,0%, sendo maior, comparativamente nos médicos (15%) e enfermeiros (13%) do que nos profissionais que ocupavam cargo administrativo (0,9%) e à taxa estimada na população geral do Brasil (1%) e nos países africanos (2% a 4%) (KRITSKI et al, 2000).

A OMS considera que uma reversão deste panorama atual demandará investimentos nas pesquisas de novas vacinas, novas drogas e novos esquemas terapêuticos, mas também em novas estratégias para melhorar a qualidade do diagnóstico da tuberculose, com uma detecção de casos mais eficiente. Uma maior detecção de casos deverá reduzir isoladamente a incidência em 41% em 20 anos, ao passo que novos esquemas terapêuticos medicamentosos poderão determinar uma redução de 59%, segundo modelos estatísticos. A associação de novos métodos diagnósticos e novas drogas poderá reduzir a incidência em 76%, no mesmo período (WHO, junho, 2000).

1.2 - O AGENTE ETIOLÓGICO:

O agente etiológico da tuberculose humana pertence à ordem *Actinomycetales* família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. O complexo *M. tuberculosis* inclui as espécies causadoras de tuberculose humana ou animal que não façam parte do meio ambiente. O complexo é formado por: *M. tuberculosis* (causadora da tuberculose humana), *M. bovis* (tuberculose bovina), bacilo de Calmette-Guérin (variante atenuada de *M. bovis* usada como cepa vacinal), *M. africanum* (tuberculose humana na África) e *M. microti* (tuberculose murina). Mais de 100 outras espécies que fazem parte do meio ambiente são classificadas como

micobactérias atípicas ou micobactérias não tuberculosas, não são patógenas em condições habituais, comportando-se como micobactérias oportunistas (MANZANO et al, 1998; NANCY et al, 2000).

O bacilo da tuberculose é um microorganismo aeróbico, intracelular facultativo, de crescimento lento, com multiplicação a cada 18-24 horas. São bacilos delgados ($0,2-0,5\mu\text{m}$), ligeiramente encurvados com raras formas ramificadas. Lipídios correspondem à cerca de 27% do peso seco das células intactas e a 60% da parede celular (figura 1). Esse elevado teor de lipídios, sobretudo na parede celular, explica várias propriedades do bacilo como a dificuldade de penetração de corantes, a ácido-resistência e a formação de película nos meios líquidos. Quando o meio é glicerinado, o bacilo da tuberculose cresce formando uma película enrugada, que atinge o máximo de desenvolvimento em 4 a 6 semanas e tende a subir pelas paredes.

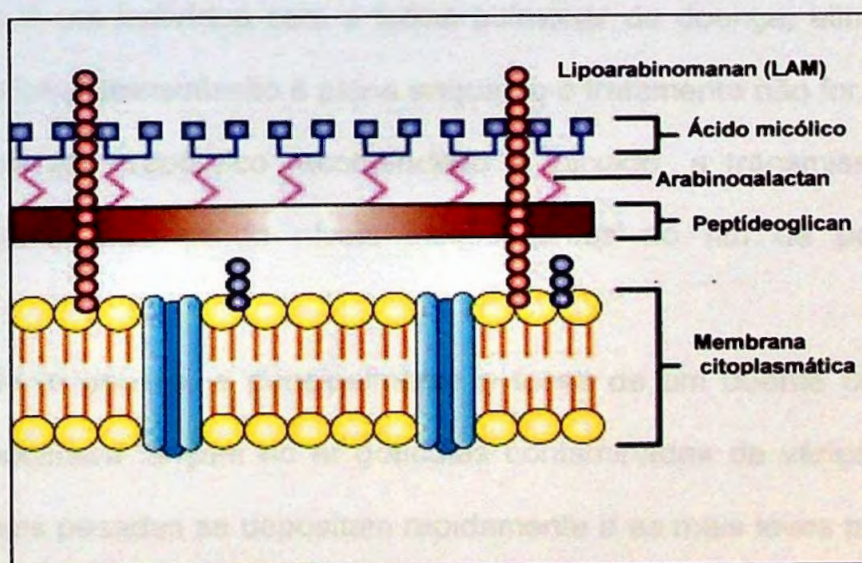


Figura 1: Representação esquemática da parede celular de micobactérias

O tratamento da parede celular com enzimas proteolíticas e depois com solventes de lípidios dá origem a uma estrutura básica composta de dois polímeros: o peptidoglicano e o micolato de arabinogalactan.

Características de cultivo, bioquímicas e moleculares permitem a diferenciação entre as diversas espécies de micobactérias. Em pesquisas empregam-se cepas especiais, como as cepas de origem humana, rugosas (R), denominadas H37Ra (avirulenta) e H37Rv (virulenta). Cepas clínicas também podem ser utilizadas, uma vez que um estudo comparativo entre a cepa de referência e sete isolados clínicos mostrou, diferenças quantitativas, mas não qualitativas, em relação aos antígenos revelados por western blotting (WB) entre as cepas estudadas (ROJAS-ESPINOSA et al, 1999).

1.3- PATOGENIA DA TUBERCULOSE

O homem é o principal reservatório de *M. tuberculosis*. Comumente, a fonte de infecção é um indivíduo com a forma pulmonar da doença, eliminando bacilos para o exterior. A transmissão é plena enquanto o tratamento não for iniciado. Assim que o esquema terapêutico recomendado é iniciado, a transmissão é reduzida gradativamente, alcançando níveis insignificantes ao fim de poucos dias ou semanas.

A fala, o espirro, e principalmente a tosse de um doente com tuberculose pulmonar bacilífera lançam no ar gotículas contaminadas de vários tamanhos. As gotículas mais pesadas se depositam rapidamente e as mais leves permanecem em suspensão no ar. Somente os núcleos secos das gotículas (Núcleos de Wells), com

diâmetro de até 5μ e com 1 a 2 bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos e aí iniciar a multiplicação.

Após a inalação, os bacilos podem ser fagocitados pelos macrófagos alveolares através de receptores inespecíficos para carboidratos, receptores para porção Fc de imunoglobulinas, ou receptores para frações do complemento (CR1, CR3) depositadas na superfície da micobactéria (HIRSCH et al, 1994). Se a multiplicação do bacilo não for contida nos linfonodos regionais, o bacilo avança para a corrente circulatória, e ocorre a disseminação.

Dentro do endossoma do macrófago alveolar, a micobactéria pode se multiplicar ou ser destruída pela célula do hospedeiro. A sobrevivência do patógeno dentro da célula é mediada principalmente pela sua habilidade de interromper a acidificação do fagossoma e prevenir a fusão fagossoma-lisossoma. A inibição do crescimento intracelular da micobactéria pode ocorrer através de diferentes funções dos macrófagos ativados, induzidas por citocinas produzidas por células T (KAUFMANN, 1993).

Os antígenos micobacterianos, processados dentro do endossoma, são apresentados para células T CD4+ associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) classe II. Alternativamente, o *M. tuberculosis* pode entrar no citoplasma permitindo que componentes do microorganismo aí permaneçam e associados às moléculas de classe I do CHP sejam apresentados aos linfócitos T CD8+.

A exposição contínua aos antígenos da micobactéria e a sensibilização das células T induzem a um estado de memória imunológica, que na maioria dos casos leva a hipersensibilidade do tipo tardio, resultando freqüentemente em destruição tecidual. O grau de ativação das células T e a concentração local de antígeno têm

grande influência no desenvolvimento da tuberculose. Macrófagos infectados formam a lesão inicial, mediada por citocinas, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (KINDLER et al,1989). Uma resposta intensa de células T e uma carga antigênica pequena geram um granuloma formado por linfócitos, macrófagos, células epitelióides gigantes e fibroblastos. Uma vez que as células T atinjam um nível capaz de lisar os macrófagos infectados, bactérias que conseguem escapar são fagocitadas e destruídas por macrófagos ativados que estejam próximos. Passa a haver, então, no local da inoculação inicial, um foco pequeno, arredondado, de 1 a 2 mm, de consistência central amolecida e constituído principalmente por material caseoso. Este foco, sendo uma reação tissular bem sucedida, pode deter a infecção e em alguns casos levar a uma esterilização do tecido caseoso. Por outro lado, uma resposta de células T ativadas a uma alta carga bacilar, leva a formação de um processo granulomatoso menos organizado. A liquefação resultante do tecido caseoso devido a enzimas líticas liberadas da degeneração dos macrófagos na reação exudativa tecidual, facilita o crescimento do bacilo. Esse processo pode causar destruição do tecido pulmonar com formação de cavidades adjacentes aos brônquios, e permitir que a micobactéria se espalhe para outros tecidos e para o ambiente. Nesses termos, a tuberculose clínica parece estar diretamente associada com a reatividade das células T à micobactéria, controlando a concentração local de bacilo tuberculoso e seus antígenos. Está bem determinado que as células T CD4+ sub população Th1 (T helper 1) estão preferencialmente envolvidas no desenvolvimento de resistência adquirida ao *M. tuberculosis*. Uma das citocinas da resposta Th1 principalmente envolvida na resposta protetora é o interferon- γ (IFN- γ), levando a crer que a finalidade do acúmulo de linfócitos ao redor da lesão, é secretar IFN- γ , o qual ativará macrófagos epitelióides que contêm o bacilo vivo. (ORME,

1998). Monócitos secretores de Interleucina 12 (IL12) também contribuem para a resposta imune contra micobactérias, induzindo resposta das células Th1 (MUNK e EMOTO, 1995).

A imunidade natural está relacionada com a capacidade do indivíduo desenvolver uma imunidade adquirida de forma rápida e eficaz, o que é controlada geneticamente. Porém, o risco de adoecimento, entre os infectados aumenta em diversas situações. A infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), desnutrição, uso de drogas, câncer, diabetes, insuficiência renal e o uso de drogas terapêuticas imunossupressoras podem alterar o estado de latência de *M. tuberculosis* levando ao desenvolvimento de doença ativa. Estudos epidemiológicos mostram que a infecção por HIV aumentou o risco de reativação que era de 2-25% durante a vida do indivíduo para 5-10% por ano (PARRISH et al, 1998).

1.4- ASPECTOS CLÍNICOS DA TUBERCULOSE PULMONAR

Após o contato com *M. tuberculosis*, 70% dos indivíduos não desenvolvem infecção, provavelmente devido à morte dos bacilos pelos macrófagos alveolares, antes de atravessarem a membrana alveolar (ORNE, 2001). Os indivíduos infectados podem desenvolver uma resposta imune satisfatória e vir a controlar a Infecção. Após aproximadamente 15 dias da primo-infecção, os bacilos que chegaram aos alvéolos pulmonares podem se multiplicar, uma vez que ainda não existe uma imunidade adquirida. A partir dessa lesão pulmonar, os bacilos podem atingir as vias linfo-hematogênicas, comprometendo linfonodos e diversos órgãos como fígado, medula óssea, rins e sistema nervoso. Essa disseminação de poucos bacilos tem pouca gravidade, pois ficarão latentes ou serão destruídos pela

imunidade que se instalará. (DANNENBER e ROOK, 1994). Apesar da transiente bacteremia, neste início de infecção o indivíduo apresenta-se assintomático. Na maioria dos indivíduos imunocompetentes, uma resposta imune secundária é formada e a infecção é controlada, formando-se então o complexo primário de Ranke. O foco pulmonar regressivo, que pode ser visto em radiografia, chama-se foco de Gohn.

A tuberculose pós-primária ocorre em conseqüência do recrudescimento de algum foco pré-existente (reativação endógena) ou por receber nova carga bacilar do exterior (reinfecção exógena). O quadro clínico observado normalmente é febre baixa vespertina, sudorese noturna, inapetência e emagrecimento, provavelmente devido a efeitos de $TNF\alpha$ liberado durante a infecção (ROOK e HERNANDEZ-PANDO, 1996). Quando o bacilo atinge os pulmões, o indivíduo pode apresentar dor torácica, tosse produtiva, podendo ou não ser acompanhado de escarro hemoptóico. Uma das formas mais graves é a tuberculose miliar, decorrente de disseminação hematogênica com acometimento sistêmico, quadro tóxico infeccioso importante com grande risco de meningite. Tuberculose ganglionar, pleural, óssea e genitourinária também podem ocorrer, apresentando sintomas mais freqüentemente localizados com envolvimento pulmonar variável (DUNLAP et al, 2000).

1.5- DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

A tuberculose pode ser diagnosticada com base na clínica e no laboratório, estando fundamentada nos seguintes métodos: microbiológicos (baciloscopia e cultura), imagem (Radiografia de tórax (RX), Tomografia computadorizada (TC), Ressonância magnética (RM) e métodos de Medicina nuclear), prova tuberculínica,

anátomo-patológico (histológico-citológico), sorológico, bioquímico e de biologia molecular.

Como aproximadamente 90% das formas clínicas da tuberculose são pulmonares, os sintomas respiratórios são os mais comuns indicadores da doença. Por ser a principal forma clínica responsável pela propagação da doença, o diagnóstico da tuberculose pulmonar torna-se prioritário nas ações para o controle da doença. Estudos intensivos têm sido realizados com este objetivo.

1.5.1- Diagnóstico microbiológico

1.5.1.1- Baciloscopia:

A pesquisa direta de bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR) pela técnica mais convencional, a coloração de Ziehl-Neelsen, é um método indispensável por permitir a identificação da fonte mais importante de infecção: o paciente bacilífero. Contudo, a presença de BAAR no material examinado apenas indica a existência de uma micobacteriose, não sendo possível distinguir entre as diferentes espécies de micobacterias, necessitando identificação posterior. Além disto, para que uma amostra seja positiva à baciloscopia, um mínimo de 5.000 bacilos por mililitro devem estar presentes, motivo pelo qual esse método pode resultar negativo nos pacientes com a forma paucibacilar da doença. (HOBBY et al 1973). Apesar da tuberculose ser transmitida principalmente por pacientes com resultado de BAAR no escarro positivo, segundo estudos feitos em São Francisco por Behr et al (1999), os pacientes paucibacilares podem ser responsáveis por 17% dos casos de

transmissão da doença, sendo importante a existência de um método alternativo para auxílio ao diagnóstico destes indivíduos.

1.5.1.2- Cultura e identificação micobacteriana:

A cultura é o método que permite isolar e identificar *M. tuberculosis*, diferenciando-o de outras micobactérias através de testes específicos. É indicada para diagnóstico em pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar com exame direto persistentemente negativo, uma vez que este exame é mais sensível que a baciloscopia, necessitando da presença de 10 a 100 bacilos por mililitro para resultado positivo (YEAGER et al, 1967). Junto com exame anátomo-patológico (histológico e citológico), a cultura é de grande valia para o diagnóstico de formas extrapulmonares, como meníngea, renal, pleural, óssea e ganglionar. Se houver suspeita de resistência bacteriana, o teste de sensibilidade é solicitado. O inconveniente desse método é o tempo necessário para liberação do resultado. Pelo lento crescimento bacilar, as culturas somente são passíveis de leitura após três a seis semanas de inoculação, com observação semanal. Os meios comumente utilizados são Löwenstein Jensen e Middlebrook. Sistemas automatizados têm abreviado este tempo para 15 a 21 dias. Consistem em meios de base líquida que incorporam marcadores de crescimento bacteriano detectados por sistemas radiométricos ou fluorimétricos. Culturas positivas são detectadas pela presença de substâncias radioativas liberadas devido ao crescimento bacteriano, ou pelas alterações metabólicas que ocorrem no meio de cultura (ex: BACTEC 460TB, BACTEC MGIT 960 - Becton Dickinson) (AGY et al, 1989).

A identificação da espécie isolada em cultivo deve ser realizada através de testes bioquímicos ou moleculares, principalmente nos espécimes de pacientes co-infectados por HIV, nos quais a prevalência de micobacterioses não tuberculosas é mais freqüente (HOPEWELL, 1992). Até o momento, a bacteriologia continua sendo o método de certeza para o diagnóstico.

1.5.2- Diagnóstico Imunológico

1.5.2.1 Antígenos de Micobactérias

Apenas alguns antígenos de micobactérias encontram-se caracterizados sob o ponto de vista físico-químico e biológico. A estrutura básica da parede das micobactérias é conhecida à longo tempo, contudo os processos biossintéticos envolvidos na sua formação, são informações recentemente descritas. Os principais grupos de componentes micobacterianos são os lipídios e carboidratos da parede celular e proteínas de diferentes pesos moleculares, sendo estas citoplasmáticas (enzimas ou proteínas de stress) ou secretadas (membrana celular ou associadas à parede celular e exportada para o exterior) (DANIEL e ELLNER, 1993). Entre os antígenos mais estudados estão os antígenos somáticos, derivados principalmente da destruição do bacilo durante a fase tardia da infecção e os antígenos secretados, produzidos por micobactérias metabolicamente ativas e que estão mais relacionados com a fase inicial da infecção (ANDERSEN, 1994).

Polissacárideos quimicamente semelhantes têm sido isolados de várias espécies dos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium*. Ocorrem geralmente sob a forma de complexos com lipídeos ou proteínas. Alguns de seus

determinantes antigênicos, os arabinogalactans, podem ser encontrados em muitos outros microrganismos.

A parede celular das micobacterias, inclusive na cepa *M. tuberculosis*, contém um complexo macromolecular chamado lipoarabinomanan (LAM). É um dos principais imunógenos para linfócitos B na tuberculose e lepra, responsável pela supressão não específica da ativação de linfócitos T e inibição da apresentação de antígenos (MISAKI et al, 1977).

Os ácidos micólicos , dos maiores componentes da parede celular das micobacterias, são ácidos graxos complexos, contendo 60 a 90 átomos de carbono. Estão presentes em outras bactérias (*Corynebacterium*, *Nocardia*), mas com tamanho menor, sendo então chamados corinomicólico (22-36 carbonos) ou nocardomicólicos (44-60 carbonos). A análise da sua estrutura pode auxiliar na identificação da espécie de micobactéria.

Alguns glicolipídios são utilizados em testes aplicados ao diagnóstico da tuberculose, como o 2,3, diaciltrealose (DAT), antígeno espécie específico, previamente referido como antígeno SL-IV, os glicolipídios fenólicos (PGL Tb1), as frações 4 e 5 de glicolipídio polar pertencente a família lipo-oligosacariídeos (LOS), e o 6,6' – dimecolato de D-trealose, chamado fator corda, associado à virulência bacteriana (BERLIE et al,1991; SAAD et al,1996; SIMONNEY et al, 1997).

Em relação ao estudo das proteínas de micobactérias, muitos avanços foram realizados desde que Robert Koch, em 1890, obteve um produto protéico bruto (tuberculina) a partir de culturas autoclavadas do bacilo da tuberculose. Posteriormente, esta preparação deu origem ao derivado protéico purificado (PPD – " Protein Purified Derivative"), ainda hoje utilizado em testes intradérmicos (teste de Mantoux) de hipersensibilidade.

Filtrados do meio de cultura do bacilo, e rompimento da célula bacteriana por ultra-som também são procedimentos utilizados para se obter antígenos bacterianos. Ambas preparações apresentam conteúdo protéico similar, uma vez que a maioria das proteínas presentes no filtrado do meio de cultura são encontradas na mistura de proteínas solúveis no interior da bactéria (CLOSS et al, 1980). Essas moléculas purificadas ou complexos antigênicos podem ser posteriormente avaliadas quanto ao seu potencial imunogênico.

O conhecimento adquirido nos últimos anos em relação às novas proteínas identificadas, ocorreu principalmente devido aos esforços empreendidos na busca de um antígeno de *M. tuberculosis* no diagnóstico da doença. Com isto, novos epítomos reconhecidos por linfócitos T e B foram identificados, sendo que recentemente, a atenção tem se voltado para as proteínas de baixo peso molecular, entre 6 e 12 kDa, com inúmeras pesquisas em relação a sua relevância imunológica (ANDERSEN e HERON, 1993; COLER et al, 1998).

Entre os antígenos purificados mais estudados encontram-se: Antígeno de 38kDa: proteína ligada a fosfato ("phosphate binding protein") (CHANG et al, 1994), inicialmente isolado como componente do antígeno 5, por cromatografia de afinidade, e relatada como sendo específica do complexo *M. tuberculosis* por Daniel et al, 1979, em estudo feito com *M. tuberculosis*, *M.bovis* e 14 outras espécies. Sua função é adicionar e disponibilizar o fosfato para a bactéria. Encontra-se principalmente na parede e superfície celular (ESPITIA et al, 1992).

Antígeno MPT51 (27kDa) e MPT64 (26kDa) possuem epítomos para células B que reagem de forma cruzada com os antígenos do complexo 85. Não existem informações sobre a função dessas moléculas (WIKER et al, 1992).

Antígeno de 14/16 kDa: descrita por Verbon et al (1992a) como proteína com 14kDa, possui quatro epítomos reconhecidos por linfócitos B específicos de micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Posteriormente foi caracterizada e nomeada como proteína de 16kDa (VERBON et al 1992b). Pertence à superfamília α -cristalina de pequenas proteínas de choque térmico referida como sHsp 16, Hsp.16.3, Acr, e MPT63. O gene *mpt63* é encontrado apenas nas espécies do complexo *M. tuberculosis*, como foi demonstrado por estudos de hibridização de DNA (MANCA et al, 1997). *In vitro* o antígeno de 16kDa é predominantemente expresso pelo *M. tuberculosis* quando submetido à baixa tensão de oxigênio (CUNNINGHAM e SPREADBURY, 1998).

Antígeno de 10kDa: O antígeno GroEs foi o primeiro antígeno identificado nessa região, estando presente no *M. tuberculosis* e no *M. leprae*, tanto em antígenos obtidos de filtrado de cultura como da parede celular (BARNES et al 1992, MEHRA et al, 1992). Sua síntese é aumentada em condições de stress, servindo para a adaptação do microorganismo a mudanças do meio.

Antígeno CPF-10 e ESAT-6: "Southern blotting" do DNA genômico mostrou a presença do gene de ambas proteínas na região RD1 de *M. tuberculosis*, *M. africanum*, e em cepa virulenta do *M. bovis*, estando esses genes ausentes na cepa vacinal BCG e outras micobactérias não tuberculosas, com pequenas exceções (*M. kansasii*, *M. szulgai*, e *M. marinum*) (BERTHET et al, 1998, HARBOE et al, 1996). A análise das frações subcelulares de *M. tuberculosis* mostrou que a ESAT -6 (do inglês, "6-kDa early secretory antigenic target"), encontra-se presente tanto no citoplasma como na parede celular da bactéria (SORENSEN et al, 1995).

Estudos acurados das proteínas pertencentes à região de baixo peso molecular identificaram inúmeras moléculas que possuem homologia com a ESAT-6

baseando-se na análise genômica. Estas moléculas passaram a constituir a família do gene ESAT-6 que é constituída de um grupo de 14 a 23 proteínas (dependendo do critério de inclusão) (SKJØT et al, 2001). Essas moléculas podem estar envolvidas em funções cruciais relacionadas com a sobrevivência intracelular da bactéria. Essa hipótese baseia-se no fato de não terem sido detectadas variações genéticas, principalmente para as proteínas ESAT-6 e tb10.4, quando foram estudadas um grande número de cepas clínicas (MUSSER et al, 2000).

Entre os complexos antigênicos mais estudados encontram-se:

Antígeno 85: principal constituinte do *M.bovis* BCG e *M. tuberculosis*. Foi identificado separadamente como 85 A, 85B, 85C, por grupos independentes (DANIEL e FERGUSNO, 1970; DE BRUYN et al, 1987; FUKUI et al,1985), estando presente em concentração 20 vezes maior em filtrados de meio de cultura do que em preparações sonicadas de *M. tuberculosis* (WIKER et al, 1991).

Antígeno A60: complexo antigênico preparado a partir do citoplasma do *M.bovis* BCG,sendo o principal componente termoestável do PPD. É composto do glicolipideo (lipidoarabinomanana) e proteínas de 65, 40, 38, 35,19 14 kDa, apresentando 7,8% de epítomos espécie - específicos (COCITO e VANLINDEN, 1986; COETSIER et al, 1994), estando presente também nas espécies *Nocardia* e *Corynebacterium*.

Muitas dessas proteínas citadas acima estão sendo isoladas através de tecnologia recombinante de DNA ou produzidas sinteticamente e estudadas quanto à sua imunogenicidade. Também são descritas as proteínas Mtb 48 (LODES et al, 2001) Mtb81 (HENDRICKSON et al, 2000), Mtb 8.4 (COLER et al, 1998), MTB12 (WEBB et al, 1998) e Mpt63 (MANCA et al, 1997).

1.5.2.2- Testes sorológicos

Nos últimos anos, inúmeras pesquisas têm sido realizadas na área imunológica, buscando a possibilidade de diagnóstico da tuberculose através de testes sorológicos. O que encorajou esses estudos desde há muito tempo foi a observação de intensa resposta humoral na tuberculose, detectada por técnica de hemaglutinação. (ARLOING, 1898).

Porém, a sensibilidade e especificidade do método não foram satisfatórias para aplicação em diagnóstico. Melhores parâmetros sorológicos foram obtidos com o desenvolvimento por Engvall e Perlmann, em 1972, da técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), de simples execução, sensível, com baixo custo e reprodutível.

Em 1976, Nassau, Parsons e Johnson descreveram uma técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos para o diagnóstico da tuberculose. Desde então esse método tem sido largamente empregado para a pesquisa de anticorpos contra os diferentes antígenos isolados de micobactérias.

Muitos ensaios para detecção de anticorpos têm utilizado como antígeno extrato sonificado de *M. tuberculosis* ou PPD, apesar da existência de reação cruzada com antígenos de outras micobactérias (DANIEL e DEBANNE, 1987; SAAD et al, 1996).

Atualmente novos testes têm sido desenvolvidos empregando antígenos purificados e recombinantes. Ensaio de competição têm obtido bons resultados utilizando anticorpos monoclonais específicos para determinados epítomos, como o anticorpo monoclonal TB72 que reconhece o epítomo do antígeno de 38kDa, e o anticorpo monoclonal Tb68 que reconhece epítomo do antígeno de 16kDa. No quadro 1

apresentamos um resumo dos principais antígenos e métodos utilizados no diagnóstico sorológico da tuberculose.

Antígeno Epitopo*	Descrição	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)		Método	Ref
			BK+	BK-		
LAM		91	72		ELISA	Sada, 1990
LAM(MicoDot®)	Lipopolisacarídeo	84	26	7	Dot Blot	Somi, 1999
LAM	Antígeno purificado	92,4	63			Antunes, 2002
		93	85-93			Chan, 2000
ICT ®	Associação de 5 antígenos purificados (inclui 38kDa)	93	89	74	Imuno cromatográfico	Cole, 1996
ICT ®		87	46 64,2	33 46,3		Pottumarthy, 2000 Perkins, 2003
38kDa - Rapid test Tb®	Antígeno recombinante	86	25		Imuno cromatográfico	Pottumarthy, 2000
38KDa – Pathozyme-TB®	Antígeno recombinante	97	16		ELISA	Pottumarthy, 2000
		95	78,4	76		Wilkinson, 1997
38kDa	Antígeno purificado	95	83	15	ELISA	Imaz, 2000
TB72	Monoclonal que reconhece epitopo do ag 38kDa	96	84	82	ELISA	Bothamley, 1994
		97,5	69,7			Wilkins, 1991
DAT LOS PGL-Tb1 TBLGs	glicolipídios	96	77		ELISA (imunocomplexo)	Simonney, 1997
		98	71			
		98	18		ELISA	Maekura, 2001
		95	89	70		
A60	Complexo antigênico (glicolipídeos e proteínas)	93	88,5		ELISA	Gupta, 1995
A60(ANDA-TB®)		87	40			Zielonka, 2002
16kDa	Antígeno purificado	95	72	54	ELISA	Imaz, 2000
TB68	Anticorpo monoclonal anti epitopo do ag 16kDa	97,5	35,2		ELISA	Wilkins, 1991
ESAT-6	Antígeno recombinante	97	20		ELISA	Lyashchenko, 1998

*antígeno é especificado pelo peso molecular e o epitopo pelo nome do anticorpo monoclonal utilizado

Quadro 1 - Testes sorológicos para detecção de anticorpos em pacientes com tuberculose pulmonar frente a diferentes componentes antigênicos

Além da pesquisa de anticorpos por métodos enzimáticos para diagnóstico da tuberculose, diferentes estudos têm buscado determinar, perfis de reatividade

através do método de western-blotting que possibilitem caracterizar a presença de doença tuberculosa ativa ou indiquem fase ou extensão da doença (ROVATTI, et al 1996; IMAZ E ZERBINI, 2000; FRANCO et al, 2001; SAMANICH et al, 2001).

O interesse tem se voltado para os antígenos de baixo peso molecular (BECK et al,), uma vez que os estudos realizados por western-blotting, demonstram maior especificidade para os antígenos de *M. tuberculosis* situados na região entre 43 e 12 kDa, (BASSEY et al, 1996) enquanto antígenos de 65, 61, 58,30 e 24 kDa reagem com maior frequência com anticorpos presentes em soros controles (VERBON et al, 1990).

1.5.2.3 – Imunidade celular

A resposta celular de hipersensibilidade retardada a antígenos micobacterianos é verificada através do teste cutâneo de Mantoux, utilizando o derivado protéico purificado (PPD), no Brasil PPD-Rt23, baseado na hipersensibilidade tardia. A aplicação é via intradérmica, na dose de 0,1ml equivalente a 2UT(unidade tuberculina) na parte anterior do antebraço. A leitura da área de induração formada no local da aplicação, indicativo de reatividade, é feita após 72 a 96 horas da aplicação.

Indivíduos não infectados com *M. tuberculosis*, não se tornam reativos ou sensibilizados frente a uma retestagem. Ao contrário de indivíduos infectados ou vacinados com BCG, que podem apresentar efeito “booster”, apresentando área com mais de 10mm de induração, num segundo teste, realizado dentro de uma a duas semanas após o primeiro teste (MENZIES, 1999).

O PPD foi originalmente desenvolvido em 1939 por Florence Siebert no Instituto Phipps da Filadélfia, e renomeado de PPD-S (S do inglês "standard") em 1944 sendo adotado em 1952 como padrão internacional pela Organização Mundial de Saúde (Siebert's Lote 49608) (LEE e HOLZMAN, 2002). Consiste de uma mistura de antígenos compartilhados entre cepas do complexo *M. tuberculosis*, micobacterias ambientais e cepa vacinal do BCG (HARBOE, 1981). A reação positiva indica o contato com as proteínas de micobactérias, mas não necessariamente a presença de doença ativa. Tem ainda outras desvantagens como a necessidade do paciente retornar para a leitura do teste, variabilidade na aplicação e leitura e resultados falso-negativos devido à presença de imunossupressão (HUEBNER et al, 1993).

Indivíduos com teste cutâneo negativo e que venham se tornar positivos numa retestagem após um ano, não apresentando evidência de doença ativa, são classificados como conversores à tuberculina. Essas pessoas provavelmente se infectaram durante o período decorrido do primeiro teste e são candidatas à quimioprofilaxia.

Dar início a um tratamento preventivo, baseado na imunidade mediada por células aos produtos da PPD é uma decisão difícil, uma vez que esse teste é tido como marcador inespecífico da infecção por *M. tuberculosis*, apenas auxiliando no diagnóstico ou em estudos epidemiológicos. Nos últimos tempos, pesquisas têm sido desenvolvidas em busca de um teste que supere as limitações do teste cutâneo.

Métodos como EliSpot (Enzyme linked immunoSpot Assay), originalmente desenvolvido como método para detectar células B secretora de anticorpos, e QuantiFERON[®] -TB, aprovado pelo "Food and drug administration" (FDA, 2002), tem

sido usado para auxiliar o diagnóstico detectando resposta celular a *M. tuberculosis* através da quantificação de interferon gama (IFN- γ).

A maioria dos trabalhos publicados baseia-se no estudo da resposta de células T ao PPD e às proteínas CPF-10, ESAT-6 (*M. tuberculosis* específicas) (BROCK et al, 2001, AREND et al, 2001, CHAPMAN et al, 2002). As proteínas CPF-10 e ESAT-6 mostraram melhor desempenho para discriminar infecção tuberculosa de infecção por outras micobactérias, contudo, níveis altos de interferon- γ produzidos por células T após o estímulo com essas proteínas parecem permanecer após a recuperação da tuberculose pulmonar, não podendo determinar atividade da doença (WU-HSIEH et al, 2001).

1.5.3- Diagnóstico molecular

Mais recentemente o diagnóstico da tuberculose também tem sido realizado através do uso de sondas de DNA específicas para cada espécie. As sondas são baseadas no princípio de complementaridade das fitas de DNA, que se ligam para formar uma fita dupla. O sistema *Accuprobe* (*Gen Probe*) utiliza sonda de DNA para detectar rRNA de *Mycobacterium* (GOTO et al, 1992).

O método da reação em cadeia da polimerase ("Polymerase chain reaction" - PCR) necessita de apenas 1 a 100 microrganismos no material clínico a ser examinado para que se obtenha a amplificação do DNA (EISENSTEIN, 1990). Contudo as taxas de especificidade e sensibilidade da "PCR" dependem de inúmeros fatores, como: tipo de padrão-ouro usado (cultura positiva para BK ou diagnóstico provável de tuberculose); tipo de espécime e características dos pacientes analisados; número de testes de PCR realizados na mesma alíquota ou

em amostras diferentes, método de detecção do produto amplificado (hibridação com sonda DNA específica ou em gel de agarose); método de preparação da amostra para PCR (presença de inibidores, ocorrência de contaminação) e outros (KRITSKI et al, 1997).

Pela razão de apresentarem taxas de sensibilidade consideradas baixas na detecção de pacientes com exame de escarro negativo para BAAR (40-70%), métodos moleculares ainda não são aplicados ao controle da tuberculose, em países em desenvolvimento (PFYFFER et al, 1996; MONTENEGRO et al 2003). A tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos otimiza o tempo gasto para a detecção do microorganismo, mas não substitui nem reduz a necessidade do esfregaço e da cultura, da determinação da espécie (principalmente as não tuberculosas) e dos ensaios de sensibilidade a antibióticos convencionais (KAUL, 2001). A PCR apenas será útil quando houver elevada suspeita clínica de tuberculose pulmonar associada a exame de BAAR de escarro negativo e o resultado da PCR for positivo. Isto influenciará no início da terapia anti-TB, na indicação de isolamento respiratório e avaliação de comunicantes (CANTANZARO et al, 1997).

Além de tudo, a utilidade da PCR para acompanhamento terapêutico esbarra na inabilidade da amplificação de DNA distinguir organismos vivos de mortos (HELLYER et al, 1996). Em pacientes com tuberculose prévia também poderia haver testes com resultados falso-positivos devido à exteriorização de fragmentos de bacilos de focos latentes, somente detectáveis pela PCR, não conseguindo distinguir doença de infecção no passado (SCHLUGER et al, 1994; BRADLEY et al, 1996).

1.5.4-Métodos de Imagem

A radiografia de tórax é bastante útil no diagnóstico da tuberculose pulmonar com a característica presença de infiltrados nos ápices pulmonares, formação de cavernas e focos de disseminação broncogênica. Tem papel importante na diferenciação das formas de tuberculose atípica e no diagnóstico de outras pneumopatias entre os pacientes com SIDA. Está indicado no caso de pacientes sintomáticos respiratórios negativos a baciloscopia direta e comunicantes de todas as idades sem sintomatologia respiratória. As formas extrapulmonares e pulmonares da doença podem ser mais bem caracterizadas com as TC, RM e métodos de Medicina Nuclear (LEITE, 2001).

1.6- JUSTIFICATIVA:

A tuberculose humana tem causado a morte de milhões de pessoas em todo o mundo durante anos. A SIDA e o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes aos quimioterápicos utilizados, alertou o mundo para um problema que parecia estar sob controle: o ressurgimento da infecção tuberculosa. Para que seja possível conter a disseminação da doença são necessários métodos diagnósticos que possibilitem a identificação precoce da doença, sejam rápidos de executar e tenham custo operacional reduzido, características que não se encontram associadas em nenhum dos métodos de diagnóstico atualmente utilizados. Um método sorológico poderia vir a atingir tais objetivos, com a vantagem adicional de não ser necessário manipular amostras de escarro potencialmente contaminadas. A maioria dos laboratórios em nosso meio se encontra devidamente habilitados para

manipulação de soro, o mesmo não ocorrendo em relação às amostras de escarro, que exige nível maior de proteção.

Eliminar a necessidade de procedimentos invasivos como a realização de biópsias para cultivo ou análise por PCR, nos casos extra pulmonares, também torna a sorologia promissora.

O presente trabalho foi realizado buscando o desenvolvimento de testes sorológicos, que poderão ser úteis principalmente em pacientes paucibacilares e crianças, onde as amostras de escarro, necessárias para realização dos testes microbiológicos tradicionais, nem sempre são ideais ou fáceis de serem obtidas. Conseguir contornar tais problemas é fundamental, pois são fatores que podem levar a demora no diagnóstico, retardando o início do tratamento, possibilitando a disseminação da doença.

Por ELISA estudamos a reatividade de anticorpos contra diferentes antígenos recombinantes de *M. tuberculosis*: TbF6, TbF10, Mtb81 e a associação TbF6/DPEP, definindo o teste com melhor potencial para diagnóstico da tuberculose pulmonar. Parâmetros sorológicos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos foram determinados.

Por “western blotting” conhecemos o perfil da resposta humoral contra diferentes antígenos de *M. tuberculosis*, de pacientes com tuberculose pulmonar, em diferentes estágios evolutivos da doença e fases de tratamento e nos contactantes.

2- OBJETIVOS:

2.1 - OBJETIVO GERAL

Padronizar, desenvolver e aplicar testes sorológicos para diagnóstico da tuberculose humana.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Padronizar o teste imunoenzimático ELISA com antígenos recombinantes e antígeno bruto de *M. tuberculosis* obtido através de cultivo de cepa clínica caracterizada como *M. tuberculosis*.
- 2- Verificar comportamento dos testes ELISA durante a evolução do tratamento quimioterápico
- 3- Associar os dados microbiológicos e radiológicos com os resultados obtidos através dos métodos sorológicos
- 4- Verificar perfis da resposta humoral de pacientes com diagnóstico de tuberculose, submetidos a tratamento específico, por "western blotting".
- 5- Correlacionar perfis de reatividade com aspectos da infecção tuberculosa

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- CASUÍSTICA:

Para a realização deste estudo foi utilizado um total de 465 amostras de soro divididas nos seguintes grupos:

GRUPO I: Pacientes com tuberculose

Amostras de soro provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar (N= 51) e tuberculose ganglionar (N=4) foram colhidas antes do início do tratamento. Todos os pacientes tiveram o diagnóstico confirmado por exame direto do escarro e/ou cultura, com identificação da espécie por análise microbiológica e por métodos moleculares. Pacientes nos quais o exame direto do escarro era inviável tiveram análise de lavado bronco alveolar, punção ganglionar ou biópsia para realização da análise citológica.

Foram acompanhados até o final do tratamento todos os casos de tuberculose ganglionar e 44 dos 51 casos de tuberculose pulmonar, e as amostras foram colhidas no tempo zero, depois de dois meses e seis meses, ou no mês correspondente ao final do tratamento, perfazendo um total de 151 amostras analisadas. O acompanhamento foi realizado no período de junho de 2000 a abril de 2002, junto ao ambulatório de tuberculose no Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-SP), o qual recebe pacientes com alta suspeita da doença, previamente triados. Todos os pacientes foram acompanhados com exames microbiológicos e radiológicos periodicamente. (Anexo 1)

A idade média dos pacientes foi de 37 anos (mínima 14 anos, máxima 75 anos). A média de tempo transcorrido entre o aparecimento dos sintomas e o

diagnóstico da doença foi de 5 meses. Entre as doenças associadas encontradas, Diabete *melitus* foi a mais prevalente (6,9%), estando presente também alcoolismo, neoplasia e doença auto-imune em menor proporção (1,7%).

As amostras de sangue colhidas foram imediatamente centrifugadas e os soros foram separados e armazenados em freezer a -20°C até serem utilizados.

GRUPO II: Pacientes com infecção pulmonar por outras micobactérias que não *M.tuberculosis*.

Três das cepas isoladas em cultura e identificadas durante o estudo não eram *M. tuberculosis* sendo identificadas como *M. kansasii*. Estes pacientes tiveram três amostras de soro colhidas da mesma forma que os pacientes com tuberculose pulmonar. Estas nove amostras foram analisadas separadamente.

GRUPO III: Pacientes com outras pneumopatias.

Amostras de soros (50) provenientes de pacientes com outras pneumopatias que não tuberculose foram colhidas junto ao ambulatório de pneumologia do Hospital das Clínicas de São Paulo. Essas amostras provieram de pacientes com os seguintes diagnósticos excluindo a possibilidade de tuberculose pulmonar (tabela 1).

Tabela 1- Diagnósticos estabelecidos para os indivíduos pertencentes ao grupo de outras pneumopatias

Número de casos estudados (n)	Diagnóstico
18	Neoplasia
4	Asma
2	Silicose
2	Aspergilose
7	Pneumonia
4	Fibrose intersticial pulmonar
5	Broncopneumonia
3	Pneumotorax
5	Distúrbio Pulmonar Oclusivo Crônico

As amostras foram colhidas no mesmo momento em que exames de rotina dos pacientes eram colhidos para análise. Após centrifugação do sangue, o soro foi armazenado em freezer – 20°C até sua utilização.

GRUPO IV: Contactantes

Após consentimento, foi colhida uma única amostra de soro de nove indivíduos com exposição ocupacional a pacientes tuberculosos e de 16 indivíduos que entraram em contato com o paciente apresentando tuberculose ativa. Esses indivíduos eram acompanhantes do paciente com tuberculose ativa não tratada, no momento da consulta no ambulatório de tuberculose HC-SP.

A realização do teste tuberculínico intradérmico (PPD) apesar de solicitado não pôde ser realizado em todos os indivíduos. Existiu grande dificuldade de aderência ao estudo, quando solicitado o retorno para o ambulatório de alergia do

hospital, onde seriam realizados os teste e leitura após 72 horas. Por este motivo, este parâmetro não pode ser considerado na análise realizada.

GRUPO V: Indivíduos Sadios

Foram analisadas amostras de soro de 30 indivíduos sadios, 08 com reação intradérmica (PPD) negativa e 22 com PPD positiva, sabidamente não tuberculosos, avaliados clinicamente através de exame físico e entrevista. Esses soros provieram de soroteca utilizada em outro trabalho de pesquisa, com consentimento prévio dos indivíduos envolvidos e do pesquisador responsável.

GRUPO VI: Doadores de Banco de Sangue

Após triagem sorológica, foram analisadas 200 amostras de soro provenientes de doadores de sangue colhidas ao acaso em bancos de sangue de São Paulo. Nenhuma informação quanto ao paciente, aspectos sociais, clínicos ou laboratoriais foi disponível. As amostras foram fornecidas como soros, mantidas congeladas em freezer a -20° centígrados até o momento da realização dos testes.

3.2- ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

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

Também foram assegurados que se algum indivíduo se recusasse a participar do estudo, não seria discriminado dentro 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, contendo as informações que lhe foram fornecidas verbalmente. Indivíduos menores de idade tiveram o termo de consentimento assinado por seu responsável legal.

O estudo proposto foi aprovado pelas Comissões de Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-SP), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Para cultivo de *M. tuberculosis*, o estudo foi analisado pela comissão de ética do Laboratório de Microbiologia do HC-SP, permitindo o uso de suas instalações para desenvolvimento dessa parte experimental do trabalho.

3.3- OBTENÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO DE *M. tuberculosis*

3.3.1 – Cultivo de *M. tuberculosis*.

A cepa de *M. tuberculosis* utilizada para cultivo inicial foi isolada no laboratório de microbiologia do HC-SP no ano de 2000, a partir de amostra de escarro de paciente com tuberculose pulmonar ativa. A bactéria foi cultivada em meio de Löwenstein-Jensen a 37°C por 30 dias, e a espécie confirmada por métodos microbiológicos e através de sonda de DNA específica para o Complexo *M. tuberculosis* (Accuprobe *M. tuberculosis* complex – Gen-Prob® -cat nº2860).

A partir do crescimento obtido no meio de Löwenstein-Jensen foi realizado um subcultivo no meio líquido de Sauton (0,5g MgSO₄, 2g ácido cítrico, 0,65g K₂HPO₄, 4g asparagina, 0,05g citrato férrico amoniacal, 50mL glicerol em água milli Q para 1 litro, com pH final de 7,2). Após incubação a 37°C por quatro semanas, a suspensão bacteriana que cresceu na superfície do meio em forma de película, foi utilizada como pré-cultivo para inocular frascos contendo 250 mL de meio líquido de Sauton, que foram então incubados por mais 10 semanas.

3.3.2- Extração do antígeno bacteriano bruto:

Em capela de fluxo laminar adequada, com proteção nível III, e em condições de trabalho totalmente estéreis, a massa bacteriana foi coletada da superfície e interior do meio líquido com ajuda de alça descartável, e transferida para um tubo plástico de 50mL. Esta massa foi ressuspensa em solução salina tamponada com fosfatos 0,01M (PBS) acrescido de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), dietiltreitol (DTT) na concentração de 1mM final, e centrifugada por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 5° C, na velocidade de 5000 g para retirada do meio de cultivo. Após centrifugação e retirada da porção líquida, a massa foi novamente ressuspensa em 10mL da solução de PBS/EDTA/DTT e submetida a sonicação por 20 ciclos de 1 minuto / 80 Watts, em banho de gelo, utilizando sonicador Vibra Cell™ 72405 (BioBlock Scientific). Após esse processo, o material sonicado foi centrifugado a 10.000g por trinta minutos a 4°C. A centrifugação do sobrenadante foi repetida até não ser verificado mais material particulado no tubo de centrífuga utilizado.

O sobrenadante obtido foi separado em um béquer e a este foi adicionado, solução de sulfato de amônia 80% (vol/vol) para a precipitação das proteínas. Esse procedimento foi realizado em banho de gelo e mantido sob agitação constante nesta condição por 30 minutos. A mistura obtida foi mantida a 4°C por 24 horas, sendo posteriormente centrifugado na velocidade de 10.000 g a 4°C por 15 minutos.

O precipitado obtido foi lavado duas vezes com sulfato de amônia a 40% nas mesmas condições da centrifugação anterior, e foi ressuspenso em 1,5 mL de solução fisiológica. A suspensão foi mantida 24 horas em diálise contra três trocas de solução fisiológica, utilizando membrana de diálise (Sigma D-7884) com capacidade de retenção de proteínas com peso molecular maior que 2000 daltons.

O extrato antigênico obtido foi aliqotado em tubos "ependorfs" e mantido congelado em nitrogênio líquido até o momento do uso.

Foram preparados três lotes de antígeno seguindo os procedimentos já descritos.

3.4 - AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO BRUTO

Os três lotes de extratos antigênicos de *M. tuberculosis* foram analisados quanto ao seu conteúdo e perfil de fracionamento protéicos

3.4.1- Dosagem protéica

Os conteúdos protéicos dos três extratos antigênicos foram determinados pelo método de Lowry et al 1981.

3.4.2- Determinação da reprodutibilidade na produção do extrato antigênico.

A análise do perfil de fracionamento protéico foi realizada para determinar a reprodutibilidade obtida na extração dos três diferentes lotes de antígeno.

Depois de definida a concentração ideal do extrato antigênico e densidade do gel de poliacrilamida a ser utilizada, os três lotes foram processados por SDS-PAGE e o gel corado pelo método da prata, como descrito por MERRIL et al 1984, com limiar de detecção de 2 a 5ng/banda de proteína.

3.4.2.1- Coloração pela prata

Depois da corrida eletroforética, o gel foi fixado com solução contendo ácido tricloroacético 10% por 30 minutos a 4°C e em seguida foi lavado três vezes por 10 minutos cada com solução etanol 10% -ácido acético 5%. A solução oxidante (dicromato de potássio 0,0034M/ ácido cítrico 0,0032N) foi adicionada a seguir e após incubação por 5 minutos, o gel foi lavado com água deionizada duas vezes, 5 minutos cada. A solução de nitrato de prata (204mg/100mL de água deionizada) foi adicionada e mantida por 20 minutos ao abrigo da luz. O gel foi lavado uma vez com água deionizada por 1 minuto e a solução redutora (carbonato de sódio 0,28M adicionado de formaldeído 0,037% no momento do uso) foi colocada por 30 segundos ou menos. Quando desenvolvida a cor por completo, a solução redutora foi removida e adicionado ácido acético 5%. As incubações foram mantidas com agitação leve.

3.5 - PADRONIZAÇÃO DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) E WESTERN BLOTTING.

A concentração do gel de poliacrilamida a ser utilizada para separação por eletroforese na presença de sódio-dodecilsulfato (SDS), conforme descrito por Laemmli (1970), foi definida através de teste em gel gradiente (7-20%).

Ao mesmo tempo em que diferentes concentrações do antígeno eram aplicadas ao gel, para determinação da concentração ideal de antígeno bruto a ser empregada, foi analisada a necessidade de ser utilizado 2-mercaptoetanol (2-ME) no tampão de amostra.

O extrato antigênico de *M. tuberculosis* foi aplicado nas diferentes concentrações (20 μ l, 15 μ l, 10 μ l / cavidade), diluído em tampão de amostra com e sem 2-ME, aquecidas por dois minutos a 100°C e aplicados separadamente no gel, em molde com cavidades múltiplas de 5mm, com espaçador de 1mm. A eletroforese iniciou com 60 Volts por 30 minutos, e após penetração da amostra no gel de corrida, a voltagem foi mantida a 120 Volts até que o corante indicador atingisse o final do gel de separação.

Para verificar qual a condição que permitiu a separação das frações protéicas pela eletroforese de forma ideal, foi realizado posteriormente um western-blotting descrito no item 3.5.1. Utilizou-se para tanto, um soro não reagente de indivíduo sadio e um soro reagente obtido de paciente com tuberculose ativa.

O marcador de peso molecular utilizado após a padronização do SDS-PAGE foi Rainbow™ pré-corado com peso molecular entre 2,5 a 45kDa. As massas moleculares e cores foram definidas pelo fabricante: Ovalbumin (45kDa-Amarelo), Carbonic anhydrase (30kDa- Laranja), Trypsin inhibitor (20,1 kDa-Azul), Lysozyme

(14,3kDa-Magenta), Aprotinin (6,5 kDa- Azul escuro), Insulin (b) chain (3,5kDa-Azul), (Amersham pharmacia biotech, RPN 755).

Posteriormente, para obtenção de lotes de membranas homogêneos, a aplicação das amostras no gel de SDS-PAGE padronizado foi realizada utilizando molde com cavidade única de 67mm.

3.5.1 – Visualização das frações protéicas através do western blotting

As frações protéicas separadas por SDS-PAGE foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose 0,45um (.BioAgency nº 162-0115n) por 18 horas, a 20V em aparelho Mini-Protean II® - BioRad, como descrito por Towbin et al, 1979.

As membranas contendo as frações protéicas de *M. tuberculosis* em diferentes concentrações foram previamente bloqueadas por 15 minutos com PBS-T, contendo 5% de leite desnatado e incubadas separadamente com soro reagente e não reagente para anticorpos anti *M. tuberculosis* diluídos a 1/50 em PBS T, contendo 0,5% de leite desnatado, por 18 horas a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas por seis vezes de 5 minutos com PBS-T. Para a detecção do anticorpo específico que tenha se fixado à proteína, foi adicionado conjugado enzimático anti-IgG humana - peroxidase diluído a 1/1000, no mesmo diluente de soro, e incubado por duas horas, em temperatura ambiente. Novo ciclo de lavagens foi realizado, e a reação foi revelada com solução cromógena composta de 3mg de 4-cloro-naftol (Sigma chemical C., St Louis, MO, USA), para 1mL de metanol, adicionados a 10mL de PBS contendo 4µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30 volumes). Após 15 minutos ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela lavagem

das membranas com água destilada. As membranas foram então analisadas, verificando o padrão de separação das bandas protéicas reveladas através da reatividade imunológica. Todas as incubações foram realizadas sob agitação constante.

3.5.2- Tempo de incubação do soro no western blotting.

As frações antigênicas do antígeno bruto, separadas nas condições padronizadas para o SDS-PAGE (67µg/cavidade de proteína aplicada em molde de cavidade única de 6,7cm, com espaçador de 1mm), foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose 0,45um (.BioAgency nº 162-0115n) por 18 horas, a 20V em aparelho Mini-Protean II® - BioRad, como descrito por Towbin et al, 1979. O uso de marcador de peso molecular pré-corado auxiliou na verificação da eficiência da transferência. Após transferência a membrana de nitrocelulose foi bloqueada por 15 minutos com PBS-T, contendo 5% de leite desnatado, seguida de uma lavagem rápida com PBS -T e cortada em fitas verticais com cerca de 4mm.

As fitas contendo as frações protéicas de *M. tuberculosis* foram inicialmente incubadas com soro reagente, diluído a 1/50 em PBS T, contendo 0,5% de leite desnatado, por duas ou quatro horas em temperatura ambiente e por 18 horas a 4°C, para determinação do tempo de incubação adequado a ser utilizado nos testes posteriores.

Os procedimentos seguintes para verificação da reação imunológica foram realizados conforme descritos no item 3.5.1 desta seção.

3.6 - ANTÍGENOS RECOMBINANTES:

Os antígenos recombinantes foram gentilmente cedidos por Corixa Co. – Seattle, WA, U.S.A. Detalhes da metodologia utilizada na obtenção dos mesmos foi descrita em Houghton et al, 2002.

TbF6[®] : Proteína recombinante resultante de construção genética incorporando quatro genes de interesse (Mtb8, 38kDa, Mtb11 e Mtb48) em um único vetor de expressão com peso molecular aproximado de 102kDa.

TbF10[®]: Proteína recombinante resultante de construção genética incorporando três genes de interesse (Mtb8, 38kDa e Mtb11) em um único vetor de expressão com peso molecular aproximado de 55kDa.

Mtb81: Proteína recombinante identificada originalmente em filtrados de cultura de *M. tuberculosis*.

DPEP: Proteína recombinante também identificada como antígeno MPT32.

3.7 - PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA

3.7.1 – Estudo da diluição dos soros e concentração de antígenos

A diluição ideal de soro a ser usada para a detecção de anticorpos IgG foi estudada frente a diferentes concentrações de antígeno bruto de *M. tuberculosis* e antígenos recombinantes.

3.7.1.1 - Antígeno Bruto

Para a padronização do teste imunoenzimático com antígeno bruto foram estudadas diferentes concentrações de extrato antigênico de *M. tuberculosis*, para sensibilização das microplacas. As concentrações do antígeno variaram de 5 μ g a 0,01 μ g/mL correspondendo a 500ng, 50ng, 5ng, 1ng por poço da microplaca. Os testes foram realizados utilizando-se 3 soros de pacientes com tuberculose ativa (grupo I) e três soros de pacientes sadios (grupo V), diluídos a 1/40, 1/80, 1/160 em solução de leite desnatado a 2% em PBS-T20 0,1% .

3.7.1.2 - Antígenos Recombinantes

Para a padronização dos testes imunoenzimáticos com antígenos recombinantes as concentrações de cada antígeno utilizadas para sensibilização das microplacas de poliestireno, soluções diluentes de soro e bloqueadora foram as descritas pelo fabricante:

- a) Concentrações: TBF6, TBF10, Mtb81; TBF6/DPEP (200ng/poço)

- b) Bloqueador: PBS pH 7,2 + 1% soro albumina bovina –BSA
- c) Diluente de soro: solução de BSA 0,1% em PBS-T20 0,1%

A avaliação da diluição ideal dos soros a ser usada nos ELISAs foi determinada como descrito para o antígeno bruto de *M. tuberculosis*.

3.7.2 - Fase sólida

Placas de poliestireno de fundo plano (Nunc – Immuno Module Maxisorp F 16, DENMARK) foram sensibilizadas com 100µl/cavidade da concentração adequada de cada antígeno, diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M pH 9,6. A sensibilização foi feita durante duas horas a 37°C, seguida de incubação por 18 horas (“overnight”) a 4°C. A solução antigênica foi então descartada por inversão das placas e 200µl da solução bloqueadora (leite desnatado 5% em PBS pH 7,2 para antígeno bruto e solução padrão para antígenos recombinantes) foram adicionados a cada poço, seguindo-se nova incubação de 2 horas a 37°C. Foram então realizadas três lavagens com tampão PBS -Tween 20 0,05% (PBS-T), seguidas de duas lavagens com água de mili-Q. Após, as placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C até secar e acondicionadas individualmente em envelopes de alumínio, seladas e mantidas a 4°C até o momento do uso.

As soluções bloqueadora e diluente de soros utilizados para os testes realizados com as placas sensibilizadas com antígeno bruto, foram determinados baseando-se em estudos anteriores realizados em nosso laboratório para outros sistemas ELISA.

3.7.3 - Obtenção do Conjugado enzimático

O soro de carneiro anti-IgG humana específico para cadeia pesada foi gentilmente cedido pela Bio-Merieux S.A.

O antisoro foi conjugado a peroxidase, segundo metodologia descrita por Wilson e Nakane, 1978.

Para tanto, peroxidase tipo VI (5mg/mL) foi oxidada com uma solução de NaIO_4 0,1M por 30 minutos a temperatura ambiente. Após diálise contra tampão acetato 0,001M, pH 4,4 por 24 horas, a 4°C, foi feita a alcalinização da peroxidase oxidada e do antissoro a ser conjugado com adição de 50µl de tampão carbonato/bicarbonato 0,5M, pH 9,5 em cada solução. Procedeu-se a conjugação pela adição lenta da solução protéica à peroxidase e incubação por 2 horas, a temperatura ambiente. Para estabilização do conjugado foram adicionados 75µl NaHB_4 0,1M. Após nova incubação por 2 horas, a temperatura ambiente e diálise contra PBS por 24 horas, a 4°C, o conjugado foi diluído (v/v) em glicerina bidestilada, aliquotado e conservado a - 20°C, até o momento do uso.

3.7.4 – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Placas Nunc fundo plano, sensibilizadas com concentração adequada de cada antígeno, foram incubadas com 100µl de soros diluídos a 1/40, 1/80, 1/160, em diluente de soro adequado. Após incubação por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, os soros foram retirados por inversão rápida das placas e estas lavadas por cinco vezes com PBS-T. Foram adicionados 100µl do conjugado enzimático anti-IgG humana, diluído a 1/5000 no mesmo diluente de soros . Após incubação por 30

minutos a 37°C em câmara úmida e novo ciclo de lavagens foram adicionados 100µl de solução cromógena (Tetrametilbenzidina- TMB/H₂O₂) e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida em local protegido da luz. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50µl de H₂SO₄ 2N e a leitura foi feita em 450nm em leitor de microplacas Titertek.

Em cada placa foram testados um soro controle positivo em duplicata e três soros controles negativos para determinação do limiar de reatividade de cada ensaio. A concentração ótima do conjugado foi determinada por titulação em bloco e o sistema cromógeno TMB/H₂O₂ adquirido pronto para uso (INTERGENE).

3.8 - DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE REATIVIDADE

A determinação do limiar de reatividade ("cut-off") da reação foi feita, aplicando-se o ELISA padronizado em 44 amostras de soro de pacientes tuberculosos pré-tratamento e 30 amostras de soro de indivíduos sadios clinicamente avaliados, diluídas a 1/40 em diluente de soro adequado.

Inicialmente foram analisadas, para escolha do limiar de reatividade ideal, as densidades ópticas médias dos soros de indivíduos clinicamente sadios acrescidas de dois desvios padrões (DP), para cada um dos antígenos. Para uma melhor definição deste valor limiar, foi feita uma segunda avaliação, através do uso de curvas ROC (do inglês "Receiver Operating Characteristic") usando o "software" Win Episcopo 2.0.

3.8.1- Curvas ROC

A curva ROC é uma maneira de expressarmos a relação entre a sensibilidade e a especificidade para um determinado teste. Convém ressaltar que a curva ROC é obtida traçando-se aos pares as taxas da sensibilidade (verdadeiros positivos) e as taxas de falsos positivos (1-especificidade) a cada ponto. Esta curva mostra o rigor do balanço entre a sensibilidade e a especificidade de um teste e pode ser utilizada na decisão do melhor ponto de corte. A acurácia global de um teste pode ser descrita como a área sob a curva ROC. Quando um modelo torna-se mais perfeito (ou seja, alcançando sensibilidade e especificidade próximas a 100%), a área sob a curva aproxima-se de 1,0; quando o desempenho do modelo torna-se mais randômico, a área sob a curva aproxima-se de 0,5. Um modelo tem um desempenho razoável, quando a área sob a curva ROC é de 0,7, bom desempenho, quando a área é superior a 0,8, e excelente, quando a área é superior a 0,9. O cálculo da área sob a curva ROC é feito através do método trapezoidal ou a estatística U de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas de duas amostras do teste Wilcoxon. Sobre todos os pontos ao longo da curva ROC, o ângulo da curva é a taxa de verdadeiros positivos e falsos positivos, também conhecidos como razão de probabilidades. (KOLLEF e SCHUSTER. 1994; RUTTIMANN, 1994).

3.8.2- Índice de Youden

Depois de definido o limiar de reatividade da reação, a eficiência diagnóstica de cada teste ELISA foi avaliada com base no coeficiente de Youden (índice J),

definido como a soma dos valores de sensibilidade(S) e especificidade(E) menos um (1), calculado através da seguinte fórmula:

Índice J = $(A/B) + (C/D) - 1$ onde:

A=número de pacientes com tuberculose que apresentam sorologia positiva

B= número total de pacientes com tuberculose incluídos no estudo

C= número de pacientes sadios colhidos ao acaso em bancos de sangue e que apresentaram sorologia negativa

D= número total de pacientes sãos incluídos no estudo.

Também foi calculado o índice J considerando-se como população C = indivíduos com outras pneumopatias, ou indivíduos sadios clinicamente avaliados.

O índice de Youden pode ser utilizado para avaliar a capacidade diagnóstica de um teste. Em teste ideal, o índice teria o valor 1, com $S=E=1$. Quanto maior o valor deste índice, menor o número de resultados falsos apresentados pelo teste que está sendo avaliado.

3.8.3 – Índice Kappa

Para verificar se existia concordância entre os diferentes ELISAs, foi utilizado o índice Kappa (K), definido como o quociente entre a proporção observada de concordância descontada o azar e máxima proporção de conformidade não devida ao azar. Em uma tabela 2x2 de dupla entrada teremos:

$A+D$ = número de resultados iguais

$(A+D)/N$ = proporção de resultados iguais

$B+C$ = número de resultados diferentes

Segundo o azar, a proporção esperada (EP) os resultados iguais devidos ao azar

são: $\frac{(A+B)(A+C)}{N} + \frac{(C+D)(B+D)}{N}$

N N N N

A máxima proporção de concordância não devida ao azar é $1-EP$.

A proporção de concordância descontada o azar é: $(A+D)/N - EP$.

Kappa se define como:

$$K = \frac{\frac{A+D}{N} - EP}{1-EP}$$

Os resultados obtidos são interpretados como: valores de K menores que 0,2 concordância pobre, entre 0,21-0,4, concordância leve, entre 0,41-0,6 concordância moderada, entre 0,61-0,8 boa concordância e entre 0,81-1,0 excelente concordância.

3.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A correlação entre os resultados de ELISA obtidos com os diferentes antígenos e diferentes tempos de coleta dos soros foi verificada através de análise de variância pelo método Kruskal-Wallis para dados não pareados, e Student-Newman-Keuls para análise de dados pareados.

Para verificar a relação entre presença de infiltrado ou caverna no exame radiológico ou resultado da pesquisa direta no escarro e resultado do ELISA obtido com os diferentes antígenos foi utilizado o método do Qui- quadrado.

Para todos os testes foi aceito um erro do tipo I de 5% (probabilidade ou $P < 0,05$ foi considerada como estatisticamente significativa). Os testes estatísticos foram feitos utilizando-se o "software" Sigma Stat (Jandel Scientific).

4-RESULTADOS:

4.1- AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO BRUTO.

Após obtenção dos três diferentes lotes antigênicos como descrito em materiais e métodos, nos itens 3.1 e 3.2, foram determinadas as dosagens e separação eletroforética das proteínas em cada lote:

4.1.1 - Dosagem do conteúdo protéico

O conteúdo protéico obtido em cada extração antigênica, nos diferentes lotes, segundo o método de Lowry, foi de 5.155 μ g/mL para o primeiro lote, 2.035 μ g/mL para o segundo lote e 3.140 μ g/mL para o terceiro lote. O volume final de todos os lotes foi de 1,5mL.

4.1.2 – Definição das concentrações de gel e extrato antigênico

Para realização da eletroforese foram estudadas diferentes concentrações de poliacrilamida e do extrato antigênico.

As diferentes corridas observadas por SDS-PAGE são apresentadas na figura 2. Conforme verificado através das fitas E, F, a concentração de 10 μ g/tira mostrou boa definição das bandas reconhecidas pelos anticorpos específicos, sendo então definida como concentração ideal para estudos subseqüentes. A presença de 2ME não alterou o padrão de corrida apresentado pelas proteínas reconhecidas pelo soro positivo, mostrando ser irrelevante o seu uso. Devido a características tóxicas conhecidas do 2ME, optamos por não utiliza-lo no tampão de amostra dos testes posteriormente realizados.

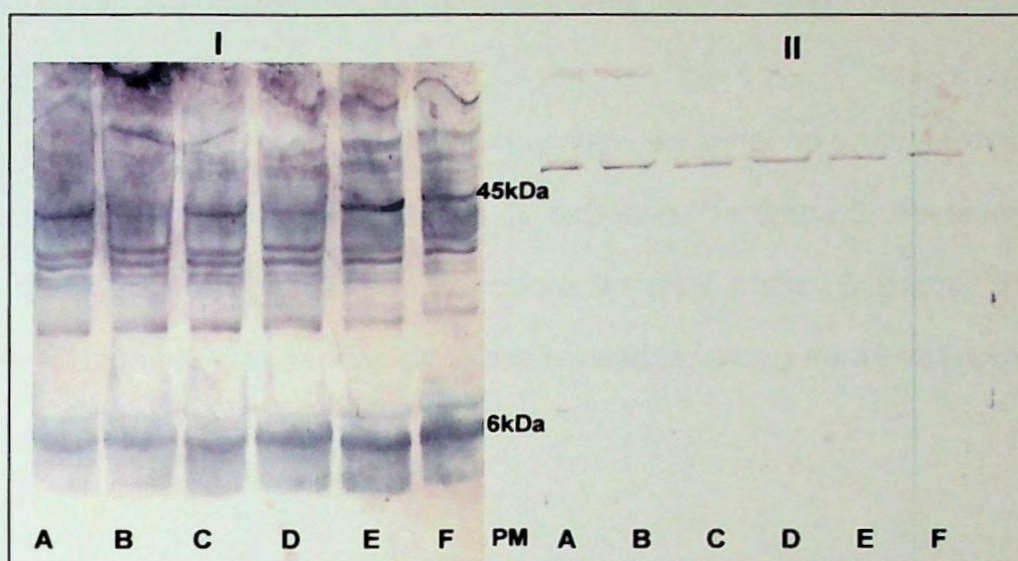


Figura 2: Western blotting realizado após separação eletroforética do antígeno bruto em gel gradiente (7%-20%) I-Western blotting realizado com soro reagente (1/50) II-: Western blotting realizado com soro não reagente (1/50) – Fitas A,C, E, antígeno com 2ME nas concentrações 20 μ g, 15 μ g, 10 μ g por cavidade. Fitas B,D,F antígeno sem 2ME nas concentrações 20 μ g, 15 μ g, 10 μ g cavidade.

Como o interesse maior do estudo era pelas bandas de baixo peso molecular, foi escolhido um padrão para proteínas com peso entre 45 a 2,5 kDa, utilizando-se para isto um gel com concentração de 18%, adequado para o objetivo proposto.

4.1.3 - Reprodutibilidade dos diferentes lotes antigênicos

A SDS-PAGE a 18% dos diferentes lotes do antígeno bruto permitiu verificar a reprodutibilidade obtida na produção do antígeno. Na figura 3, observamos o perfil de separação protéica através da coloração pela prata. O padrão homogêneo, observado através das bandas protéicas reveladas, assegura a boa reprodutibilidade dos lotes avaliados.

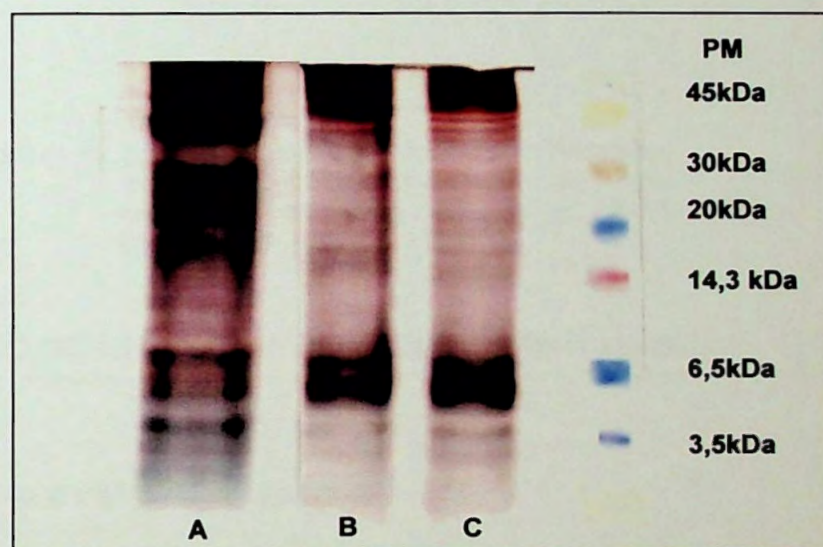


Figura 3: Reprodutibilidade de diferentes lotes de extrato antigênico em SDS-PAGE corado pelo método da prata. A=lote 1, B=lote 2, C=lote 3.

4.2 – Tempo de incubação de amostras de soro no western-blotting

O tempo necessário para a reação entre os anticorpos específicos presentes no soro de paciente com tuberculose, com as frações protéicas de antígeno bruto transferidas para a membrana de nitrocelulose, é mostrado na figura 4. Pode ser

observado que a incubação por 18 horas (fita c) foi a ideal, através da intensidade das bandas reveladas após reconhecimento das diferentes frações protéicas.

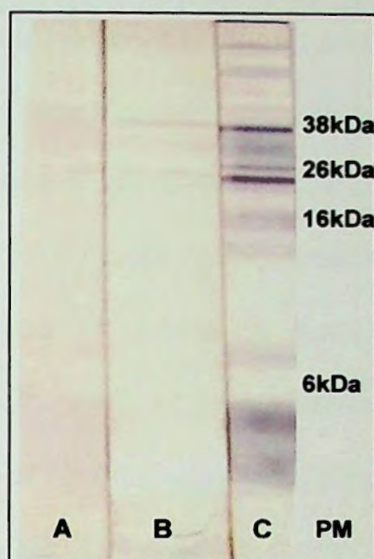


Figura 4: Western-blotting realizado em diferentes tempos de incubação com um soro reagente: A=2 horas, B=4 horas, C=18 horas.

4.3- PADRONIZAÇÃO DO ELISA COM DIFERENTES ANTÍGENOS.

4.3.1 - Antígeno bruto de *M. tuberculosis*.

A avaliação da melhor concentração de antígeno a ser utilizada seguiu protocolos para testes imunoenzimáticos descritos na literatura.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos na titulação do extrato antigênico. Foram utilizadas três amostras de soros reagentes (P1=alta, P2=média e P3=baixa reatividade), obtidas de pacientes com tuberculose ativa e três amostras de soros não reagentes obtidas de indivíduos saudáveis. As diluições dos soros utilizados foram 1/40, 1/80, 1/160.

Verificou-se que a concentração que permitia discriminar entre amostras reagentes e não reagentes e ausência de coloração de fundo ("background")

encontrava-se entre $5\mu\text{g/mL}$ (500ng/cavidade) e $0,5\mu\text{g/mL}$ (50ng/cavidade), Trabalhamos então na concentração intermediária de $1,50\mu\text{g/mL}$ (150ng/ cavidade) obtendo resultados satisfatórios. A figura 5 mostra a reatividade de um soro reagente e um soro não reagente nas diferentes concentrações antigênicas estudadas.

Com relação à diluição das amostras, ensaios preliminares, utilizando soros titulados na faixa de $1/40$ a $1/160$ (razão 2), indicaram a diluição de $1/40$ como a que melhor permitiu discernir entre amostras de soro reagentes e não reagentes, principalmente quando testado soro de baixa reatividade. A figura 6 mostra os resultados obtidos com os três soros reagentes (alta, média e baixa reatividade) e três soros não reagentes, testados na maior e menor concentração antigênica onde foram observados resultados satisfatórios.

Tabela 2 - Densidades Ópticas observadas no ELISA utilizando diferentes concentrações do extrato antigênico bruto de *M. tuberculosis*, em diferentes diluições de soros reagentes e não reagentes.

Concentração do extrato antigênico ($\mu\text{g/ml}$)	Diluições do soro	Amostras de soros reagentes (D.O.)			Amostras de soros não reagentes (D.O.)		
		P1	P2	P3	N1	N2	N3
5	1/40	1,658	1,121	0,607	0,272	0,436	0,358
	1/80	1,372	1,077	0,576	0,186	0,426	0,324
	1/160	1,050	0,940	0,453	0,134	0,350	0,201
0,5	1/40	0,875	0,709	0,454	0,089	0,298	0,219
	1/80	0,574	0,479	0,361	0,068	0,219	0,164
	1/160	0,356	0,378	0,293	0,047	0,164	0,087
0,05	1/40	0,184	0,107	0,176	0,034	0,254	0,062
	1/80	0,105	0,076	0,099	0,010	0,154	0,023
	1/160	0,014	0,045	0,057	0,001	0,105	0,006
0,01	1/40	0,133	0,100	0,130	0,018	0,074	0,024
	1/80	0,069	0,049	0,088	0,002	0,038	0,010
	1/160	0,049	0,007	0,049	0,006	0,025	0,006
0	1/40	0,025	0,009	0,008	0,036	0,004	0,007
	1/80	0,015	0,003	0,010	0,012	0,001	0,008
	1/160	0,020	0,017	0,002	0,080	0,026	0,004

Soros de pacientes com tuberculose ativa: P1=alta, P2=média P3= baixa reatividade N1, N2, N2 = Soros de indivíduos saudios. D.O. = densidade óptica observada em 450nm.

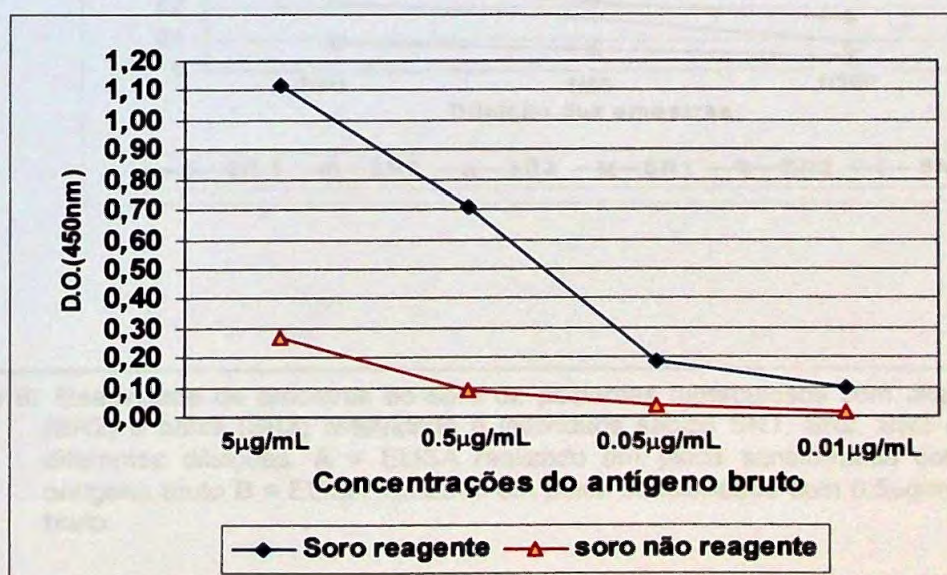


Figura 5: Determinação da concentração antigênica de antígeno bruto a ser utilizada na sensibilização da fase sólida. Densidades ópticas observadas em ELISA realizado com soro reagente e não reagente utilizando diferentes concentrações de antígeno bruto de *M. tuberculosis*.

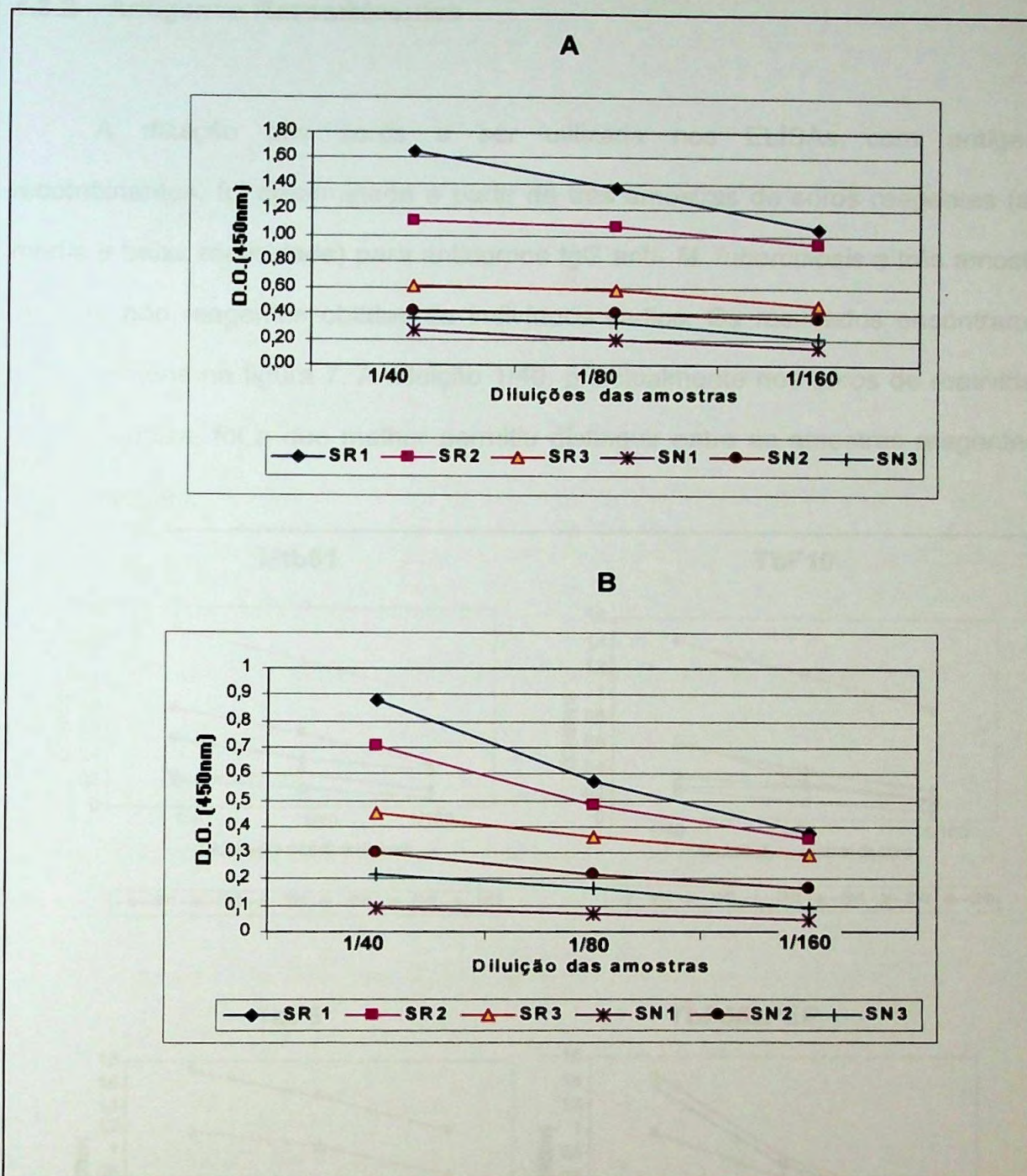


Figura 6: Reatividade de amostras de soro de pacientes tuberculosos com alta (SR1) média (SR2) e baixa (SR3) reatividade e indivíduos saudáveis SN1, SN2, SN3 ensaiados em diferentes diluições. **A** = ELISA realizado em placa sensibilizada com 5µg/mL de antígeno bruto **B** = ELISA realizado em placa sensibilizada com 0,5µg/mL de antígeno bruto.

4.3.2 – Antígenos Recombinantes

A diluição dos soros a ser utilizada nos ELISAs com antígenos recombinantes, foi determinada a partir de três amostras de soros reagentes (alta, média e baixa reatividade) para anticorpos IgG anti- *M. tuberculosis* e três amostras de soro não reagentes obtidas de indivíduos sadios. Os resultados encontram-se representados na figura 7. A diluição 1/40, principalmente nos soros de reatividade média e baixa, foi a que melhor permitiu distinguir entre as amostras reagentes e não reagentes.

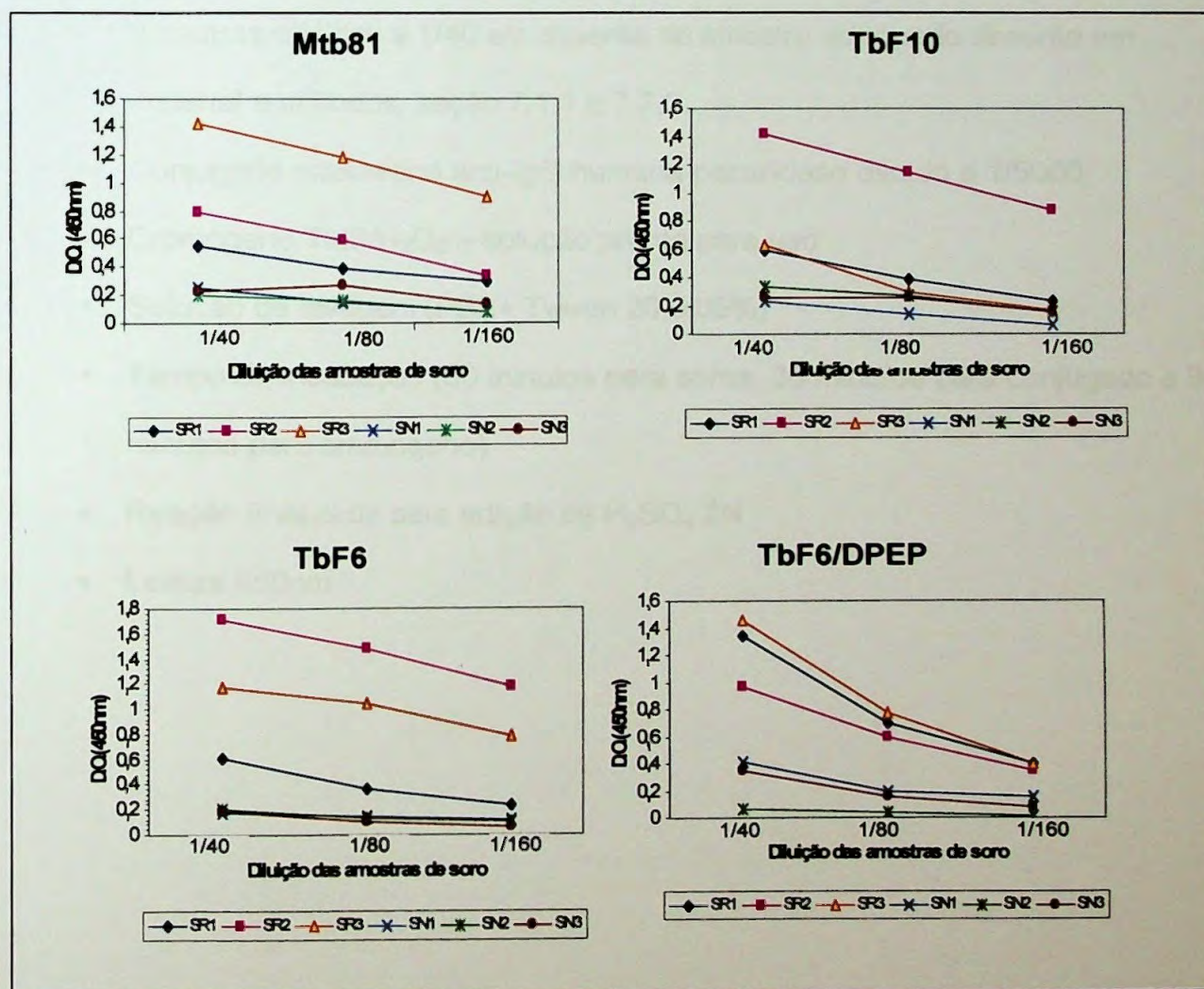


Figura 7: Reatividade de amostras de soro de pacientes tuberculosos com alta (SR1) média (SR2) e baixa (SR3) reatividade e indivíduos sadios SN1, SN2, SN3 ensaiados em diferentes diluições, obtidas no ELISA com diferentes antígenos recombinantes. Os soros foram testados nas diluições 1/40, 1/80, 1/160.

4.4- DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE REATIVIDADE.

O limiar de reatividade foi estabelecido para os diferentes ELISAs padronizados. Após padronização da fase sólida, diluição de trabalho para soros e conjugado, o teste imunoenzimático apresentou as seguintes características:

- Placas de poliestireno Nunc, "High binding", sensibilizadas com antígeno bruto (150ng/cavidade) TbF6, TbF10, Mtb81 (200ng/ cavidade), TbF6 (200ng/ cavidade) associado a DPEP (200ng/cavidade) em partes iguais.
- Amostras diluídas a 1/40 em diluente de amostra adequado descrito em material e métodos, seção 7.1.1 e 7.7.2.
- Conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase diluído a 1/5000
- Cromógeno TMB/H₂O₂ – solução pronta para uso
- Solução de lavagem (PBS+ Tween 20 0,05%)
- Tempo de incubação (30 minutos para soros, 30 minutos para conjugado e 30 minutos para cromógeno)
- Reação finalizada pela adição de H₂SO₄ 2N.
- Leitura 450nm

A figura 8 apresenta os resultados das D.O. de 30 amostras de soro pertencentes ao GRUPO IV (indivíduos sadios), em ensaios ELISA com os diferentes antígenos, seguindo o protocolo estabelecido (Apêndice C).

As médias das densidades ópticas encontradas para os antígenos Mtb81, bruto, TbF10, TbF6 e TbF6/DPEP foram respectivamente: 0,169; 0,186; 0,213; 0,165; 0,198. Para determinação do limiar de reatividade foram acrescentados um, e dois desvios padrões, obtendo-se respectivamente os valores para Mtb81 (0,283; 0,398), bruto (0,276; 0,367), TbF10 (0,339; 0,465), TbF6 (0,257; 0,348), TbF6/DPEP (0,329; 0,460).

O acréscimo de dois desvios padrões a média dos soros controles resultou em um menor número de reações falso-positivas, sendo estabelecido como parâmetro para o cálculo do limiar de reatividade dos testes.

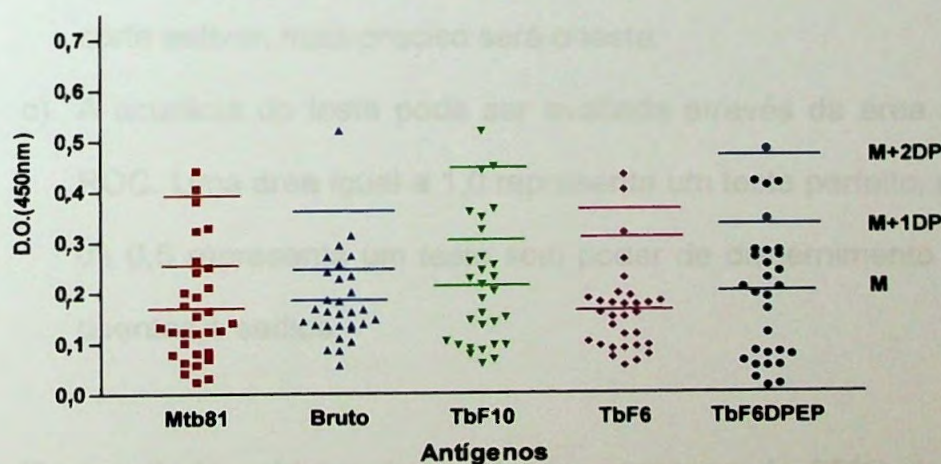


Figura 8: Determinação do limiar de reatividade. Distribuição das densidades ópticas observadas no soro dos indivíduos sadios (22 PPD positivo, oito PPD negativo) para cada antígeno estudado. A barra horizontal representa o ponto de corte da reação, calculado como a média (M) das densidades ópticas acrescidas de um desvio padrão (M+1DP) e dois desvios padrões (M+2DP)

4.4.1 - Análises de curvas ROC

A determinação do limiar de reatividade para os diferentes antígenos foi estudada através da análise de curvas ROC.

Os soros colhidos pré-tratamento, dos pacientes com tuberculose pulmonar acompanhados até o final do tratamento, e indivíduos saudáveis, independente do resultado do teste intradérmico (PPD), diluídos a 1/40, foram analisados através da elaboração de curvas ROC para cada antígeno estudado. A curva ROC pode fornecer diferentes informações:

- a) Um aumento na sensibilidade (se) será acompanhado de queda na especificidade do teste, verificada através do aumento de casos falso positivos (1-especificidade).
- b) Quanto mais acima e próximo da margem esquerda da curva o ponto de corte estiver, mais preciso será o teste.
- c) A acurácia do teste pode ser avaliada através da área abaixo da curva ROC. Uma área igual a 1,0 representa um teste perfeito, uma área abaixo de 0,5 representa um teste sem poder de discernimento entre indivíduos doentes e saudáveis.

Os resultados obtidos (intervalo de confiança de 95%) demonstrados nas figuras 9,10,11,12,13 foram todos próximos aos observados quando considerado para valor de corte a média das D.O. dos soros controles não reagentes acrescidos de dois desvios padrões.

Para antígeno bruto, o ponto de corte na D.O de 0,370 permitiu atingir a sensibilidade de 84% (73,2-94,0) e especificidade de 93,33% (84-100), com área abaixo da curva correspondente a 94%. (figura 9)

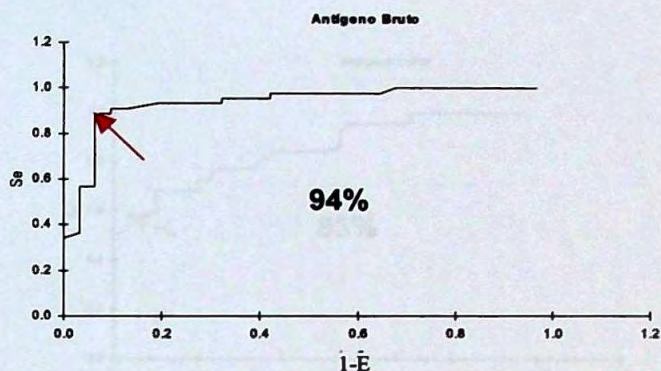


Figura 9: Curva ROC para antígeno bruto. O ponto indicado representa a densidade óptica de 0,370 onde se obteve máxima sensibilidade (Se) e menor número de resultados falso-positivos (1-E).

Para o antígeno TbF6 o ponto de corte ideal, para obtenção de máxima especificidade e sensibilidade foi a D.O. de 0,300, apresentando sensibilidade de 70,4% (56,9-83,93) e especificidade de 91% (79,26-100), com área abaixo da curva correspondente a 85,5%. (figura 10)

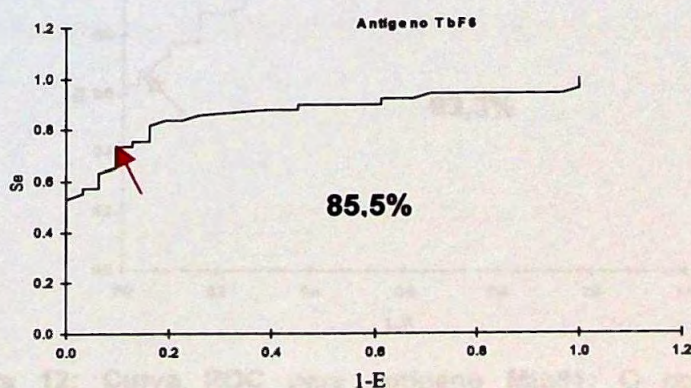


Figura 10: Curva ROC para antígeno TbF6: O ponto indicado representa a densidade óptica de 0,300 onde se obteve máxima sensibilidade (Se) e menor número de resultados falso-positivos (1-E)

Para antígeno TbF10, o ponto de corte ideal foi a D.O 0,450, onde o teste apresentou sensibilidade de 59,9% (44-73,6) e especificidade de 93,33% (84-100), com área abaixo da curva correspondente a 83%. (figura 11)

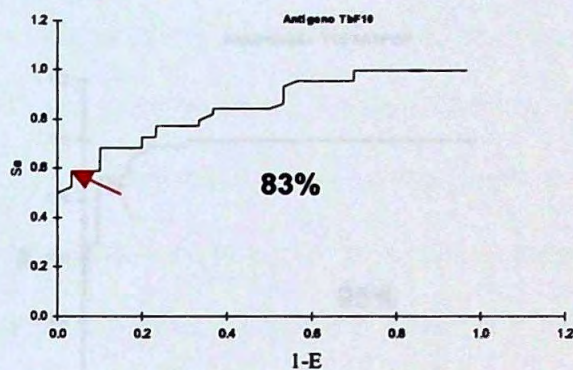


Figura 11: Curva ROC para antígeno TbF10: O ponto indicado representa a densidade óptica de 0,450 onde se obteve máxima sensibilidade (Se) e menor número de resultados falso-positivos (1-E).

Para antígeno Mtb81, o ponto de corte ideal foi a D.O 0,400, apresentando sensibilidade de 67,5% (44-73,6) e especificidade de 93,33% (84-100), com área abaixo da curva correspondente a 93,3%. (figura 12)

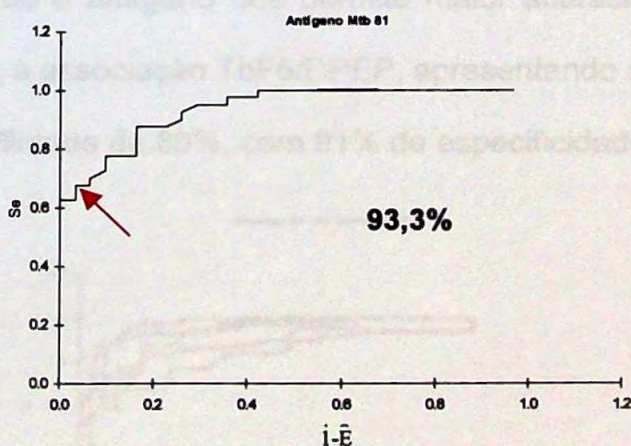


Figura 12: Curva ROC para antígeno Mtb81: O ponto indicado representa a densidade óptica de 0,400 onde se obteve máxima sensibilidade (Se) e menor número de resultados falso-positivos (1-E).

Com a associação de antígenos TbF6/DPEP, o ponto de corte ideal, que permitiu máxima especificidade e sensibilidade foi a D.O 0,400, com sensibilidade de 86,36% (76,22-96,5) e especificidade de 91% (79,2-100), e área abaixo da curva correspondente a 95%. (figura 13)

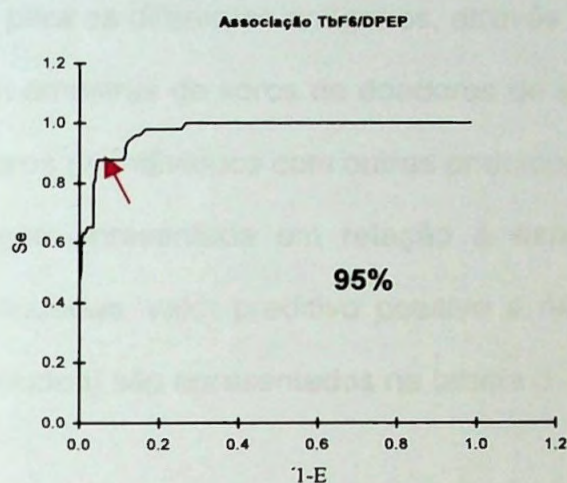


Figura 13: Curva ROC para associação de antígenos TbF6/DPEP: O ponto indicado representa a densidade óptica de 0,400 onde se obteve máxima sensibilidade (Se) e menor número de resultados falso-positivos (1-E).

Através da análise associada das curvas ROC, apresentadas na figura 14, verificamos que o antígeno que permite maior acurácia dos resultados obtidos no teste ELISA é a associação TbF6/DPEP, apresentando a maior área abaixo da curva (95%), sensibilidade de 86%, com 91% de especificidade.

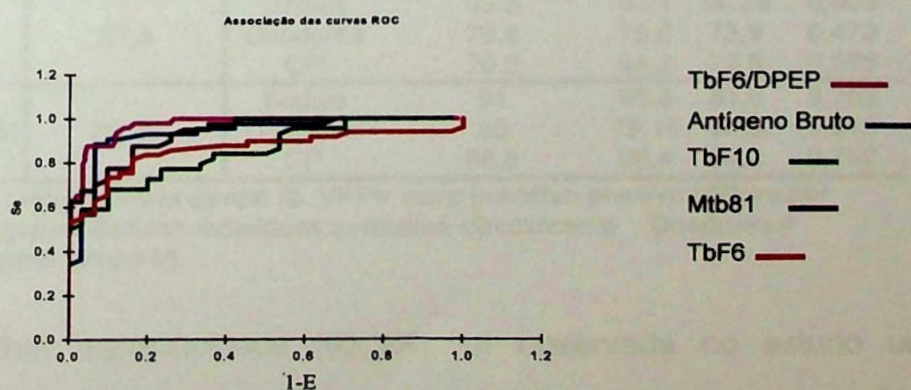


Figura.14: Representação associada das curvas ROC elaboradas para cada antígeno estudado.

4.5 - APLICAÇÃO DO ELISA EM DIFERENTES POPULAÇÕES

4.5.1- Resultados dos ELISAs nas diferentes populações

Após determinação do ponto de corte procurando máxima sensibilidade e especificidade para os diferentes antígenos, através das curvas ROC, o teste ELISA foi aplicado em amostras de soros de doadores de sangue - grupo V (n=200), e em amostras de soros de indivíduos com outras pneumopatias, grupo II (n=50).

A variação apresentada em relação à especificidade do teste frente às populações estudadas, valor preditivo positivo e negativo e eficiência diagnóstica (J=índice de Youden) são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros sorológicos determinados para os diferentes antígenos nas diferentes populações estudadas.

Antígeno	Sensibilidade %	População	Especificidade %	VPP %	VPN %	Índice J valor
Bruto	84,09	Sadios	93,33	94,8	80	0,774
		Doadores	50,5	27,2	93,5	0,345
		OP	64,0	67,2	84,2	0,500
TbF6	70,4	Sadios	90,0	91,17	67,5	0,604
		Doadores	91	66,6	92,38	0,616
		OP	70	67,3	72,9	0,404
TbF10	59,09	Sadios	93,3	92,85	60,87	0,524
		Doadores	84,0	44,8	90,3	0,430
		OP	88,0	81,2	70,9	0,470
Mtb81	67,5	Sadios	93,3	93,1	68,29	0,608
		Doadores	79,5	75,0	72,9	0,470
		OP	70,0	64,2	72,9	0,375
TbF6/DPEP	86,36	Sadios	91	96,8	81,8	0,763
		Doadores	95	79,16	96,9	0,813
		OP	88,8	90,4	84,2	0,752

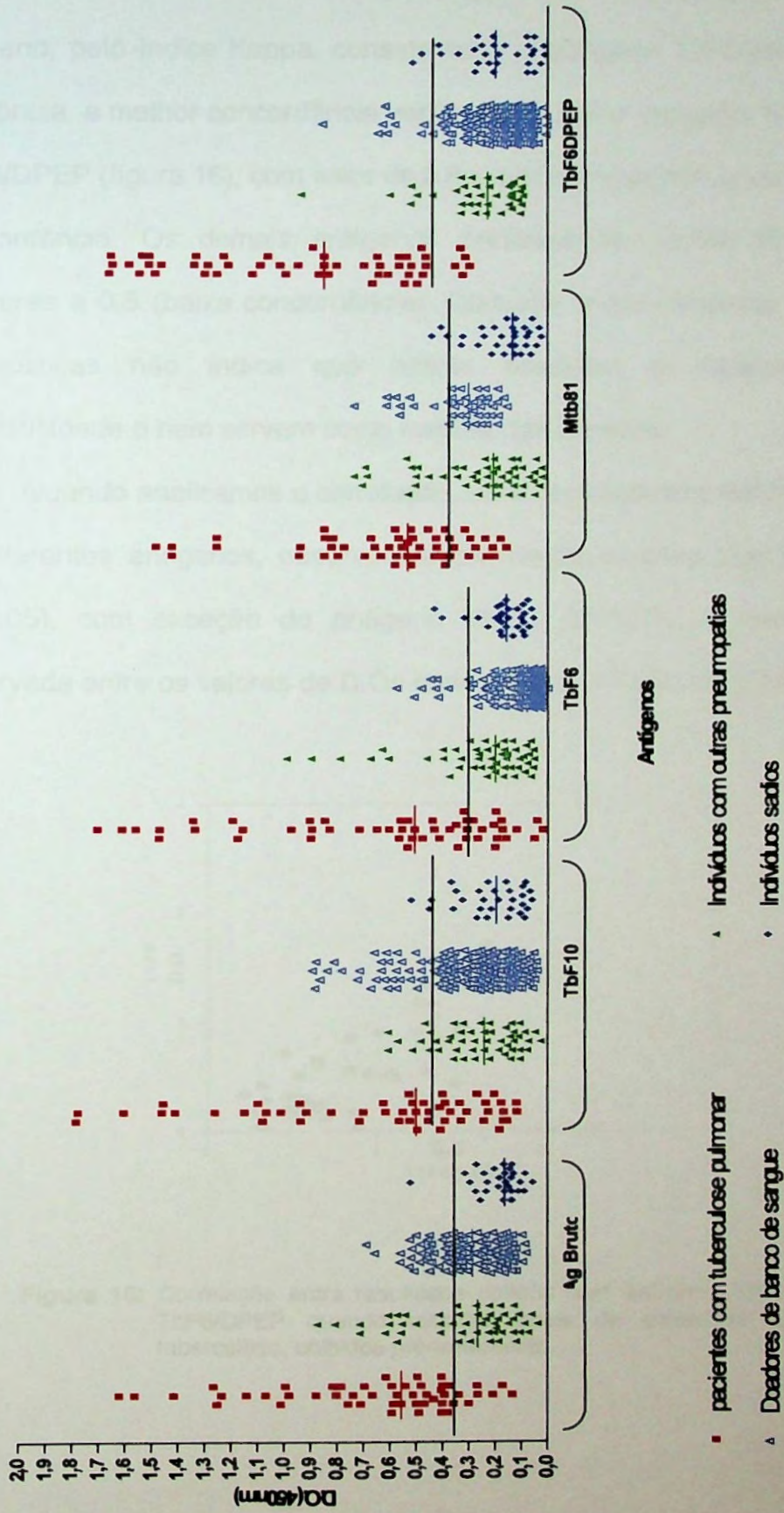
OP= outras pneumopatias (grupo II) VPP= valor preditivo positivo VPN=valor preditivo negativo Sadios= indivíduos avaliados clinicamente Doadores = população geral (grupo V)

A melhor especificidade (93,3%) foi observada no estudo utilizando o antígeno bruto e os recombinantes TbF10 e Mtb81 quando testados soros de

indivíduos saudáveis. Esses índices não se mantiveram para as outras populações estudadas. Para o antígeno bruto, a queda na especificidade foi mais evidente (50%), quando analisados os soros de doadores de sangue, ou indivíduos com outras pneumopatias (64%).

Os antígenos TbF6 e a associação TbF6/DPEP apresentaram especificidade satisfatória tanto no estudo realizado em soro de indivíduos saudáveis (90% e 91% respectivamente), como entre os doadores de sangue (91% e 95% respectivamente). Uma menor especificidade foi observada nos soros de indivíduos portadores de outras pneumopatias (70% e 88,8%).

Pelos resultados apresentados na tabela 3, observamos que o antígeno TbF6/DPEP foi mais eficiente, apresentou maior sensibilidade, menor variação entre os diferentes grupos em relação à especificidade, melhores valores preditivos positivo e negativo e melhor coeficiente de Youden, considerando as três populações estudadas. Por esta razão, o ELISA utilizando essa associação de antígenos foi escolhido como teste de referência para análises posteriores. A figura 15 mostra a reatividade dos soros colhidos das diferentes populações, frente aos diferentes antígenos estudados. Essa reatividade mostrou ser diferente entre os grupos estudados com significância estatística (Kruskal-Wallis $p = <0,0001$). A diferença ocorreu entre a média das D.O. encontrada para o grupo de indivíduos tuberculosos e os grupos de indivíduos saudáveis, com outras pneumopatias ou doadores de sangue (Dunn's $p < 0,05$), nos diferentes ELISAs realizados.



- Antígenos**
- pacientes com tuberculose pulmonar
 - ▲ indivíduos com outras pneumopatias
 - ◆ Doadores de banco de sangue

Figura 15: Reactividade dos soros das diferentes populações estudadas representadas pelas D.O. em testes ELISA realizados com os diferentes antígenos estudados. A linha horizontal preta representa o limiar de reatividade de para cada teste, estabelecido pela curva ROC: Ag bruto:0,370 TbF10:0,450; TbF6:0,300; Mtb81:0,400; TbF6/DPEP: 0,400.

Ao analisarmos os resultados reagentes e não reagentes obtidos com cada antígeno, pelo índice Kappa, considerando o antígeno TbF6/DPEP como teste de referência, a melhor concordância verificada foi entre antígeno TbF6 e a associação TbF6/DPEP (figura 16), com valor de 0,6 o que corresponde a um nível moderado de concordância. Os demais antígenos apresentaram índice Kappa com valores inferiores a 0,5 (baixa concordância). Contudo, a concordância entre duas provas diagnósticas não indica que ambas possuam a mesma sensibilidade e especificidade e nem servem como medida das mesmas.

Quando analisamos a correlação entre os resultados obtidos nos ELISAs com os diferentes antígenos, observamos correlação positiva significativa entre todos ($P < 0,05$), com exceção do antígeno Mtb81 ($p > 0,05$). A melhor correlação foi observada entre os valores de D.Os com antígenos TbF6 e TbF6/DPEP ($p < 0,001$).

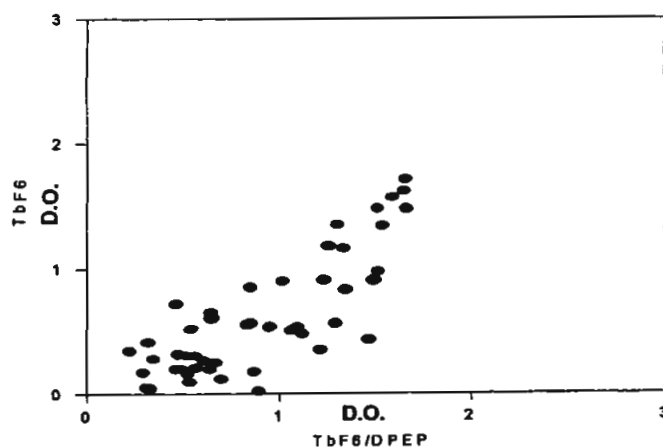


Figura 16: Correlação entre resultados obtidos com antígeno TbF6 e TbF6/DPEP quando testados soros de pacientes com tuberculose, colhidos pré-tratamento.

4.5.2 - Avaliação em diferentes formas de tuberculose, micobacterioses pulmonares e contactantes.

Os resultados da pesquisa de anticorpos IgG contra os diferentes antígenos de *M. tuberculosis* foram analisados entre as diferentes populações estudadas: pacientes tuberculosos pré-tratamento, considerando o resultado da baciloscopia; pacientes com tuberculose ganglionar; pacientes com pneumopatia por outra micobactéria que não *M. tuberculosis* e contactantes (figura 17 e 18).

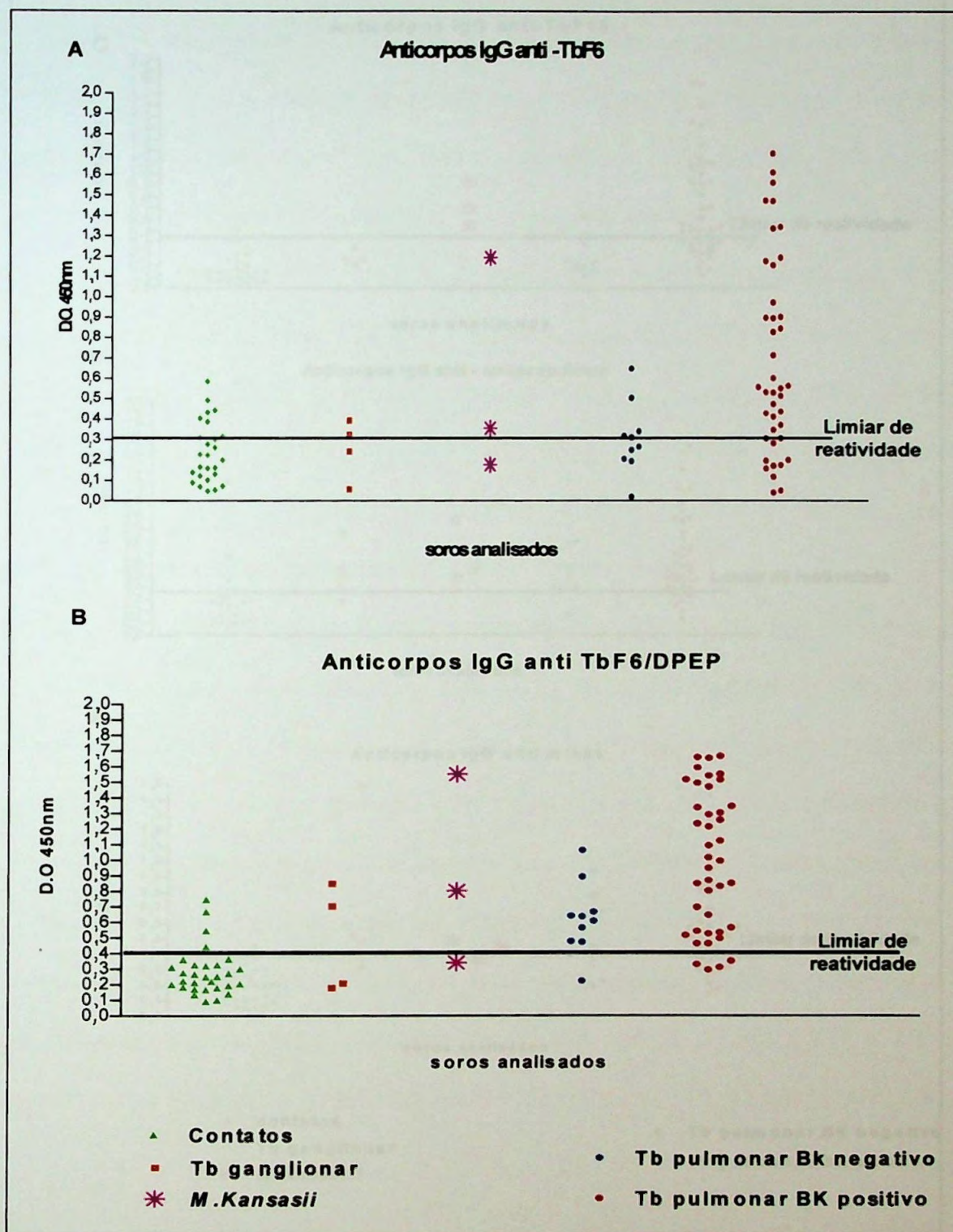


Figura 17: Resultado da pesquisa de anticorpos IgG específicos contra os antígenos TbF6 (A) e TbF6/DPEP (B), no soro (1/40) das diferentes populações estudadas: **Tb pulmonar:** 1ª amostra de pacientes com tuberculose pulmonar; **Tb ganglionar:** 1ª amostra de pacientes com tuberculose ganglionar; ***M. kansasii*:** 1ª amostra de pacientes com micobacteriose pulmonar por *M. kansasii*. **Contatos:** indivíduos com exposição ocupacional ou contactante de paciente com tuberculose ativa.

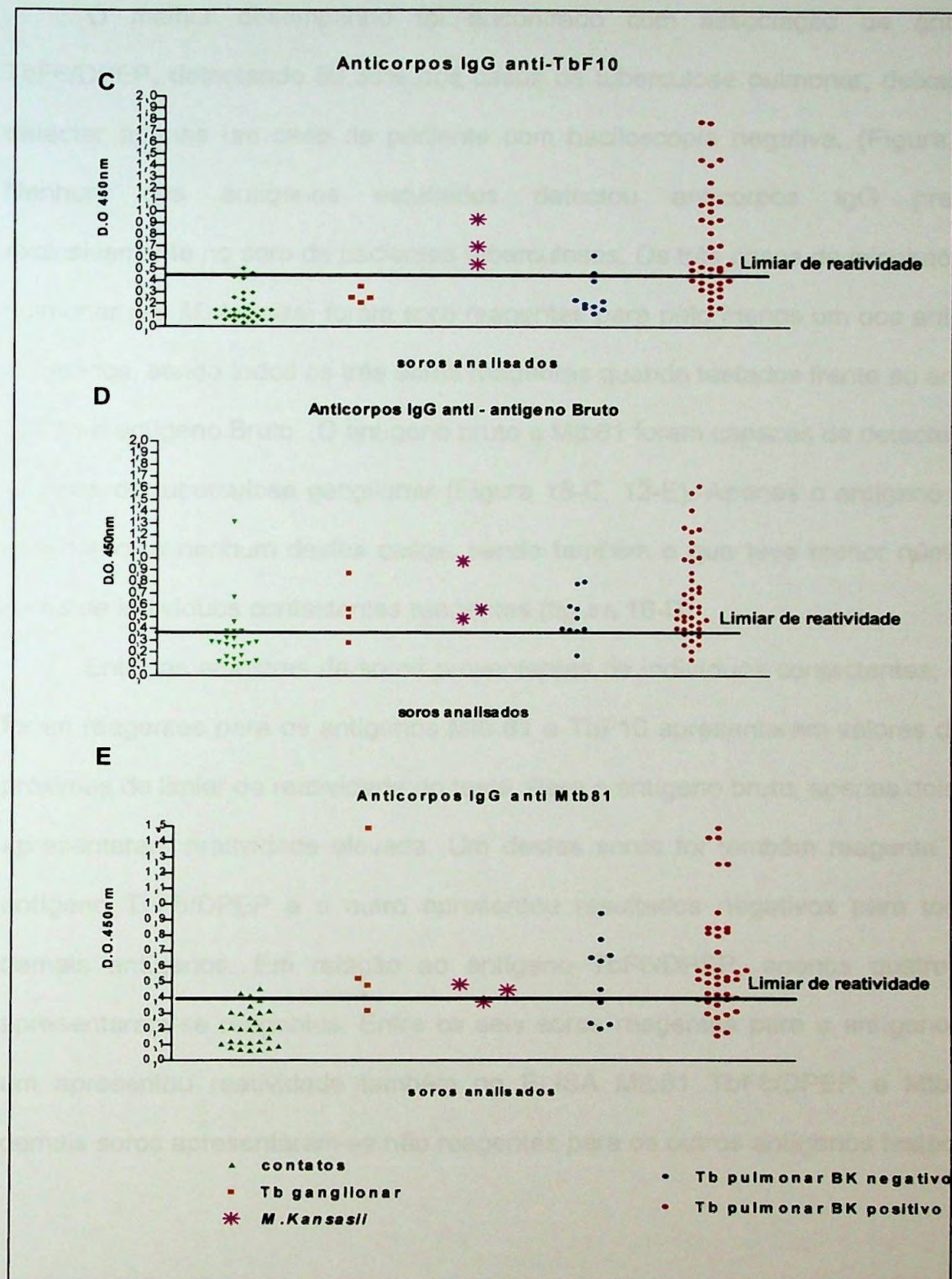


Figura 18: Resultado da pesquisa de anticorpos IgG específicos contra os antígenos (C) TbF10 (D) antígeno Bruto, (E) Mtb81 no soro das diferentes populações estudadas: **Tb pulmonar:** 1ª amostra de pacientes com tuberculose pulmonar; **Tb ganglionar:** 1ª amostra de pacientes com tuberculose ganglionar; ***M. kansasii*:** 1ª amostra de pacientes com micobacteriose pulmonar por *M. Kansasii*. **Contatos:** indivíduos com exposição ocupacional ou contactante de paciente com tuberculose ativa.

O melhor desempenho foi encontrado com associação de antígenos TbF6/DPEP, detectando 86,36% dos casos de tuberculose pulmonar, deixando de detectar apenas um caso de paciente com baciloscopia negativa. (Figura 17-B). Nenhum dos antígenos estudados detectou anticorpos IgG presentes exclusivamente no soro de pacientes tuberculosos. Os três casos de micobacteriose pulmonar por *M. kansasii* foram soro reagentes para pelo menos um dos antígenos estudados, sendo todos os três soros reagentes quando testados frente ao antígeno TbF10 e antígeno Bruto. O antígeno bruto e Mtb81 foram capazes de detectar 3 dos 4 casos de tuberculose ganglionar (Figura 18-C, 12-E). Apenas o antígeno TbF10 não detectou nenhum destes casos, sendo também o que teve menor número de soros de indivíduos contactantes reagentes (figura 18-D).

Entre as amostras de soros provenientes de indivíduos contactantes, as que foram reagentes para os antígenos Mtb 81 e TbF10 apresentaram valores de D.O. próximas do limiar de reatividade do teste. Para o antígeno bruto, apenas dois soros apresentaram reatividade elevada. Um destes soros foi também reagente para o antígeno TbF6/DPEP e o outro apresentou resultados negativos para todos os demais antígenos. Em relação ao antígeno TbF6/DPEP, apenas quatro soros apresentaram-se reagentes. Entre os seis soros reagentes para o antígeno TbF6, um apresentou reatividade também no ELISA Mtb81 TbF6/DPEP e Mtb81, os demais soros apresentaram-se não reagentes para os outros antígenos testados.

Comparando as médias das densidades ópticas observadas no soro dos indivíduos contactantes com a obtida em indivíduos sadios, a relação encontrada foi respectivamente: (0,333 / 0,186) para o antígeno bruto, (0,169/ 0,214) para TbF10, (0,209/0,170) para Mtb81, (0,223/ 0,166) para TbF6 e (0,296/0,198) para TbF6/DPEP (figura 19). Os desvios padrões foram respectivamente: (0,264/0,090) para antígeno Bruto, (0,137/0,125) para TbF10, (0,121/0,112) para Mtb81, (0,137/0,090) para TbF6 e (0,160/0,140) para TbF6/DPEP. Para o antígeno TbF10, os indivíduos sadios apresentaram média de D.O. maior que os indivíduos contactante. Para os demais antígenos os soros de contactantes apresentaram média de densidade óptica discretamente maior que os soros de indivíduos sadios, com diferença estatisticamente significativa apenas quando testados frente ao antígeno bruto e TbF6/DPEP ($P < 0,05$ – Mann-Whitney test). No decorrer deste trabalho, o estudo do perfil de reatividade destes soros, procurará definir a importância das reações reagentes apresentadas pelos diferentes soros para os antígenos TbF6 e TbF6/DPEP.

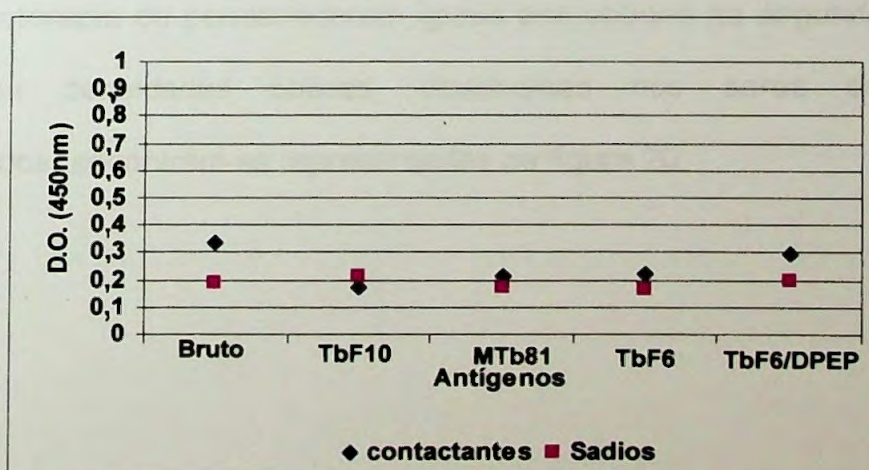


Figura 19: Média das densidades ópticas apresentadas pelos soros dos indivíduos contactantes e sadios no teste ELISA com diferentes antígenos.

4.5.3 - Acompanhamento de pacientes submetidos à quimioterapia

Os 44 pacientes acompanhados foram estudados quanto a reatividade de anticorpos IgG anti – *M. tuberculosis*. Foram comparados os resultados obtidos nos ELISAs com os diferentes antígenos, analisando as amostras de soros colhidas nos três diferentes tempos: colheita pré tratamento (amostra 1), após 2 meses (amostra 2) e após o término da terapia (amostra 3). Apenas a segunda amostra diferiu de forma significativa das outras duas amostras colhidas (1 e 3) para a maioria dos antígenos: TbF6/DPEP ($p=0,00015$), TbF10 ($p=0,0425$) Bruto($p=0,0104$), TbF6 ($p=0,0213$). (Análise de variância, método Student Newman-Keuls). Essa diferença foi devido a um aumento na absorvância ocorrido na segunda amostra colhida, com exceção do antígeno Mtb81, onde houve queda nos valores com o passar do tempo. Para o Mtb81, a queda na reatividade durante o tratamento mostrou diferença entre as três colheitas, com significância estatística (Mtb81($p=0,00000394$)– método Student-Newman-Kleuls). Para todos os outros antígenos os valores das D.Os obtidos com os soros da terceira amostra tenderam voltar ao valor basal observado no início da terapia ou permaneceram iguais aos obtidos na segunda amostra. As médias das densidades ópticas, observadas nos soros dos pacientes acompanhados, encontram-se representadas na figura 20.

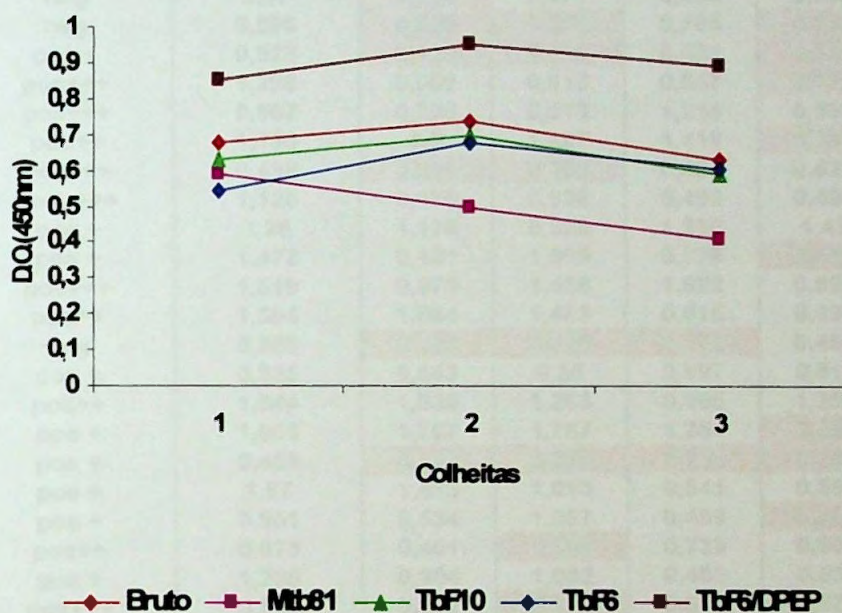


Figura 20: Evolução sorológica, dos pacientes tuberculosos, observada para os diferentes antígenos estudados. A média das densidades ópticas observadas nos soros dos 44 pacientes, nos diferentes momentos do acompanhamento sorológico, encontram-se representados para os diferentes antígenos. C1= colheita pré-tratamento, C2= colheita após 2 meses de quimioterápicos, C3 colheita após o término do tratamento.

A diferença na reatividade observada quando analisados individualmente os soros pré-tratamento dos 44 pacientes com tuberculose pulmonar acompanhados durante o tratamento mostra a heterogeneidade da resposta imune humoral (tabela 4).

Tabela 4 - Reatividade apresentada pelos soros colhidos pré-tratamento dos pacientes com tuberculose pulmonar acompanhados durante terapia medicamentosa.

Amostra	Baciloscopia	Antígenos				
		TbF6/DPEP	TbF6	TbF10	bruto	Mtb 81
		Limiar de reatividade (D.O)				
		0,4	0,3	0,45	0,37	0,4
1	pos +	0,294	0,052	0,130	0,369	0,410
2	neg	0,67	0,251	0,471	0,494	0,942
3	neg	0,896	0,020	0,236	0,785	0,238
4	pos +	0,529	0,159	0,116	0,433	0,301
5	pos+++	1,295	0,559	0,916	0,557	0,179
6	pos+++	0,567	0,308	0,513	1,234	0,581
7	pos++	1,496	0,9	1,607	1,416	0,391
8	pos+++	0,498	0,201	0,369	0,468	0,823
9	pos++++	1,125	0,476	0,938	0,499	0,499
10	pos +	1,26	1,178	0,528	1,266	1,43
11	pos +	1,472	0,431	1,099	0,879	0,315
12	pos+++	1,519	0,975	1,458	1,622	0,521
13	pos++	1,594	1,564	1,463	0,615	0,696
14	neg	0,568	0,206	0,225	0,172	0,456
15	pos +	0,835	0,553	0,55	0,697	0,513
16	pos++	1,544	1,339	1,263	0,995	1,259
17	pos +	1,663	1,707	1,787	1,254	0,210
18	pos +	0,465	0,197	0,269	0,339	0,300
19	pos +	1,67	1,473	1,013	0,541	0,568
20	pos +	0,951	0,534	1,067	0,459	0,400
21	pos++	0,873	0,401	0,308	0,739	0,603
22	pos +	1,235	0,904	1,082	0,403	0,534
23	pos+++	0,649	0,602	0,329	0,816	0,577
24	pos +	1,339	1,158	0,715	0,48	0,423
25	pos++++	1,217	0,349	0,616	0,209	0,374
26	neg	0,476	0,311	0,400	0,381	0,776
27	pos+++	1,518	1,475	1,413	0,758	0,798
28	neg	0,481	0,319	0,183	0,594	0,372
29	pos+++	1,095	0,532	0,407	1,141	0,58
30	pos+++	1,306	1,347	0,391	1,069	0,294
31	neg	0,639	0,195	0,119	0,804	0,231
32	pos+++	1,347	0,829	0,822	0,587	0,848
33	pos++	1,657	1,614	1,779	1,563	0,985
34	neg	0,644	0,65	0,624	0,4	0,637
35	pos++	1,02	0,897	1,15	0,51	0,947
36	pos+++	0,853	0,565	0,523	0,592	0,503
37	pos++	0,7	0,119	0,243	1,012	0,816
38	pos+++	0,854	0,847	0,495	0,266	0,555
39	neg	1,066	0,505	0,167	0,392	0,673
40	pos +	0,386	0,413	0,454	0,135	0,357
41	pos +	0,298	0,172	0,564	0,712	0,851
42	neg	0,400	0,208	0,154	0,404	0,658
43	pos++++	0,333	0,042	0,177	0,300	0,158
44	pos++++	0,354	0,283	0,335	0,666	0,534

Valores informados correspondem a densidade óptica (DO) dos soros reagentes e não reagentes para cada antígeno. Espaços coloridos marcam os soros não reagentes.

Entre esses pacientes (tabela 4), se fosse considerada a reatividade encontrada na segunda amostra de soro analisada, devido ao aumento da densidade óptica, passariam a ser considerados soros reativos os pacientes 41 e 44 para o antígeno TbF6/DPEP, os pacientes 28, 29, 30, para o antígeno TbF10, e o paciente 25 para o antígeno Mtb81. O paciente 43, que não apresentou soro reatividade para nenhum dos antígenos na primeira amostra estudada, na segunda amostra apresentou D.O. de 0.375 para o antígeno bruto, reatividade esta situada na zona cinza, próxima ao limiar de reatividade estabelecido de 0.370. Os demais aumentos de reatividade apresentados não modificaram a classificação do paciente quanto ao resultado obtido nos ELISAs, apenas alguns pacientes com reatividades acima, mas próximas ao limiar de reatividade, tiveram sua reatividade confirmadas pelo aumento da densidade óptica na amostra posterior. O único antígeno que conseguiu detectar queda de reatividade durante o tratamento foi o Mtb 81. Apenas 11/44 (25%) pacientes puderam ser considerados não reagentes após a análise da amostra colhida ao final do tratamento. A média da densidade óptica destes 11 pacientes na amostra pré-tratamento foi de 0.543 menor que a média encontrada quando analisado a D.O. das amostras pré-tratamento dos pacientes que permaneceram reagentes até o final do tratamento (0.700), com diferença estatística significativa ($p=0,00106$ – Teste Mann-whitney) (fig 20).

4.6 - ASSOCIAÇÃO DOS RESULTADOS SOROLÓGICOS COM DADOS RADIOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS

4.6.1 ELISA relacionado ao exame radiológico

Foi avaliada a possibilidade da presença de infiltrado pulmonar ou processo cavitário, observados ao exame radiológico, estarem relacionados aos resultados obtidos no ELISA. Contudo, essas associações não foram significantes para nenhum dos antígenos estudados ($p > 0,05$ teste do Qui-quadrado e t –student)

4.6.2- ELISA relacionado a baciloscopia.

Ao se analisar as D.Os obtidas com a primeira amostra em relação a resultados positivos ou negativos na pesquisa direta para micobactérias (BK), observou-se diferença significativa com os antígenos TbF6 ($p=0,0187$) ; TbF10 ($p=0,0018$) e TbF6/DPEP ($p= 0,0446$) (Mann-Whitney) Com os outros antígenos Bruto ($p=0,078$); Mtb81($p=0,914$); não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. (Figura 21).

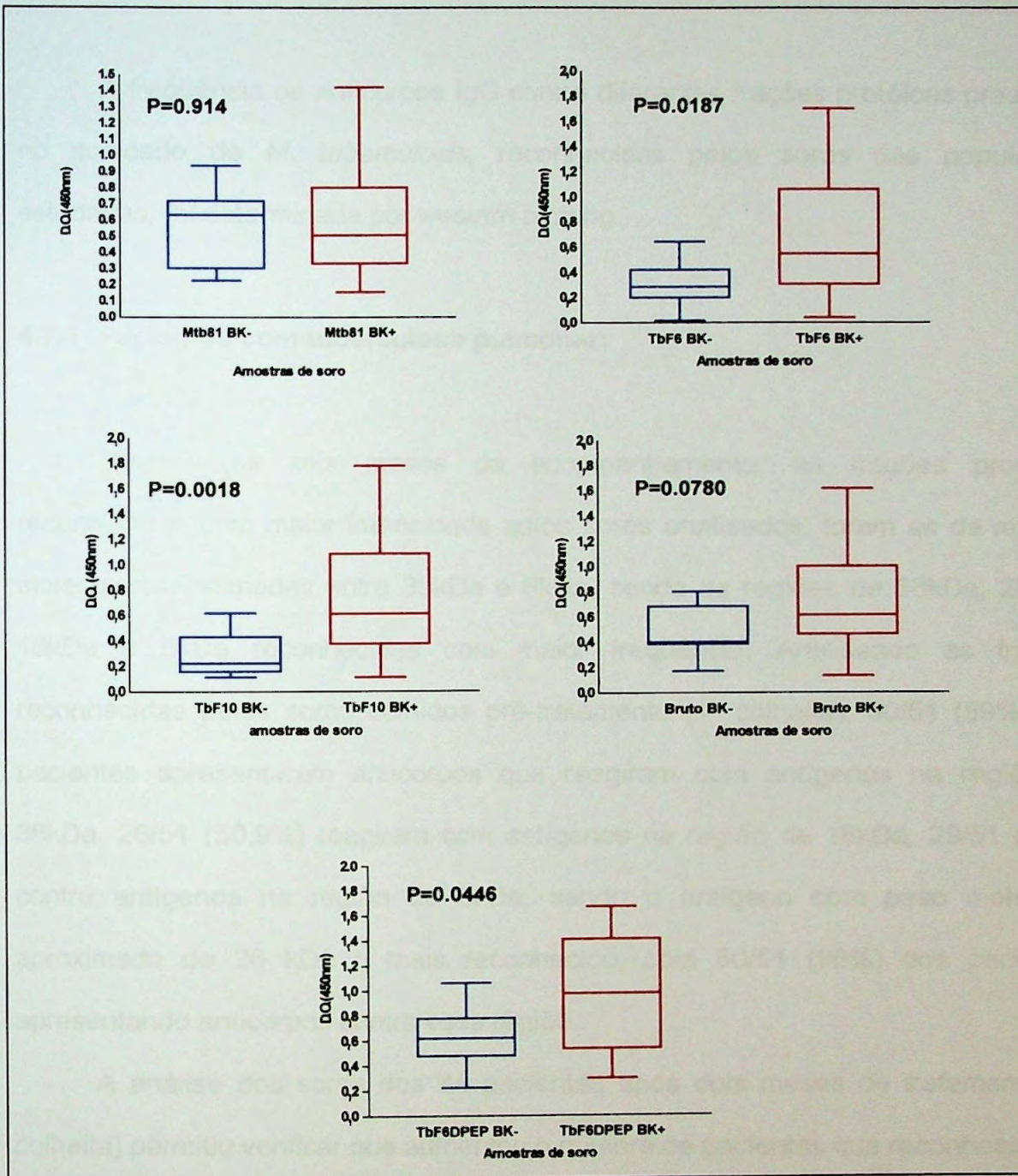


Figura 21: Medianas das densidades ópticas (D.O.) observadas no ELISA realizado com soros de pacientes tuberculosos frente aos diferentes antígenos, relacionadas com a pesquisa direta de micobactérias (BK).

4.7- WESTERN-BLOTTING IgG COM ANTÍGENO BRUTO DE *M. tuberculosis*

A frequência de anticorpos IgG contra diferentes frações protéicas presentes no sonicado de *M. tuberculosis*, reconhecidas pelos soros das populações estudadas, foi determinada por western blotting.

4.7.1- Pacientes com tuberculose pulmonar:

Durante os seis meses de acompanhamento, as frações protéicas reconhecidas com maior intensidade pelos soros analisados, foram as de massas moleculares estimadas entre 38kDa e 6kDa, sendo as regiões de 38kDa, 26kDa, 16kDa e 6kDa reconhecidas com maior frequência. Analisando as frações reconhecidas pelos soros colhidos pré-tratamento (1ª colheita), 30/51 (59%) dos pacientes apresentaram anticorpos que reagiram com antígenos na região de 38kDa, 26/51 (50,9%) reagiram com antígenos na região de 16kDa, 29/51 (57%) contra antígenos na região de 6kDa, sendo o antígeno com peso molecular aproximado de 26 kDa o mais reconhecido, com 50/51 (98%) dos pacientes apresentando anticorpos contra essa região.

A análise dos soros dos 44 pacientes após dois meses de tratamento (2ª colheita) permitiu verificar que aumentou o número de pacientes que reconheciam as frações antigênicas de 6kDa ($\Delta 16\%$), 38kDa ($\Delta 4,1\%$) e 16kDa ($\Delta 15,7\%$), permanecendo este padrão de reconhecimento constante até o final do tratamento (3ª colheita). (Figura 22)

Apenas o soro de um (1) entre os 51 pacientes não apresentou reação com nenhuma das frações protéicas com massa molecular correspondente ao intervalo de análise realizado. Após a análise de três amostras para pesquisa de BK

resultarem negativa, seu diagnóstico foi estabelecido através do cultivo da micobactéria, que resultou positivo para *M. tuberculosis*. No momento em que foi colhida a primeira amostra de soro, o paciente já não apresentava sintomas, sendo incluído no estudo por ter entrado em contato com indivíduo sabidamente tuberculoso e apresentar exame radiológico sugestivo de tuberculose pulmonar primária.

Reatividade isolada ocorreu apenas para a fração de 26kDa em 5/51 (9,8%) dos soros de pacientes pré-tratamento analisados. Quatro deles tinham o resultado da pesquisa para BK negativa. O único com pesquisa para BK positiva apresentou apenas o ELISA/TbF6 reagente (0,413) e ELISA TbF6/DPEP não reagente, com valor da D.O. 0,386, próximo ao limiar de reatividade. Este paciente era portador de doença auto-imune, fazendo uso de medicamento imunossupressor (tabela 4). Após dois meses de tratamento, os soros de dois destes pacientes reagiram com frações protéicas na região de 6kDa e 16kDa, ambos tinham resultados de ELISA reagente.

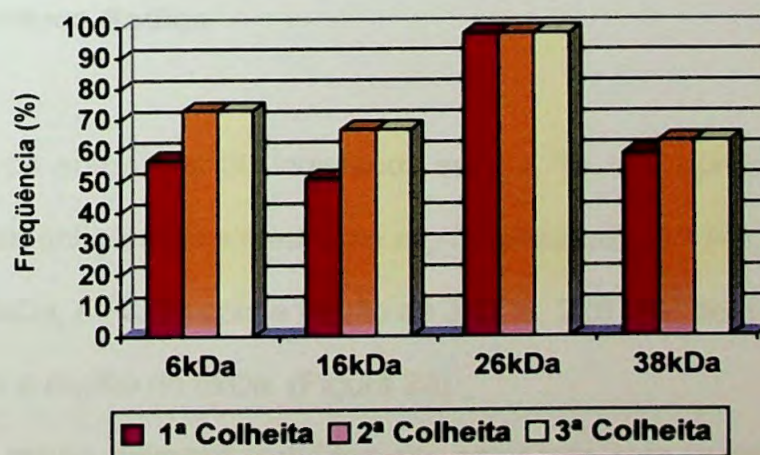


Figura 22: Frequência de reconhecimento das frações antigênicas com diferentes massas moleculares (kDa) por anticorpos IgG do soro de pacientes tuberculosos colhidos em diferentes momentos: 1ª colheita = soro colhido pré-tratamento, 2ª colheita= soro colhido após 2 meses de tratamento; 3ª colheita= soro colhido após finalizado o tratamento.

4.7.2 - Indivíduos com outras pneumopatias que não tuberculose

Entre os 50 soros colhidos de pacientes apresentando outras pneumopatias, 25 não apresentaram reatividade contra frações antigênicas presentes na região entre 38kDa e 6kDa. O maior reconhecimento ocorreu para o antígeno presente na região de 26kDa (36%), seguido pelo de 38kDa (14%), 16kDa (4%) e 6kDa (2%). (Figura 23)

4.7.3- Indivíduos contactantes

Entre os 25 indivíduos contactantes, 11 (44%) não apresentaram anticorpos IgG contra nenhuma das frações antigênicas situadas entre a região de 38kDa e 6kDa. Os soros de quatro pacientes (16%) apresentaram reatividade contra antígenos na região de 38kDa, 10 (40%) contra a região de 26kDa, 4 (16%) contra a região de 16kDa e 4 (16%) contra a região de 6kDa. (Figura 23)

4.7.4 – Indivíduos Sadios

Entre os soros dos 30 indivíduos sadios, 10 não apresentaram reatividade contra frações antigênicas situadas na região estudada, 13 (43,3%) reagiram com a região de 26kDa, 4 (13%) com a região de 38kDa, 2 (6,6%) com a região de 16kDa e 1 (3,3%) com a região de 6kDa. (Figura 23)

Neste grupo estavam incluídos oito pacientes com teste intradérmico (PPD) negativo. Nenhuma das amostras de soro destes indivíduos apresentou reatividade para as regiões de 38kDa e 6kDa.

4.7.5 – Doadores de banco de sangue

Dos 200 soros provenientes de bancos de sangue, representativos da população geral, 115 (57,5%) não reagiram com frações antigênicas situadas na região estudada. Soros de 90 (45%) indivíduos reagiram com a região de 26kDa, 30 (15%) com a região de 16kDa, 40 (20%) com a região de 6kDa e 28 (14%) com a região de 38kDa. (Figura 23).

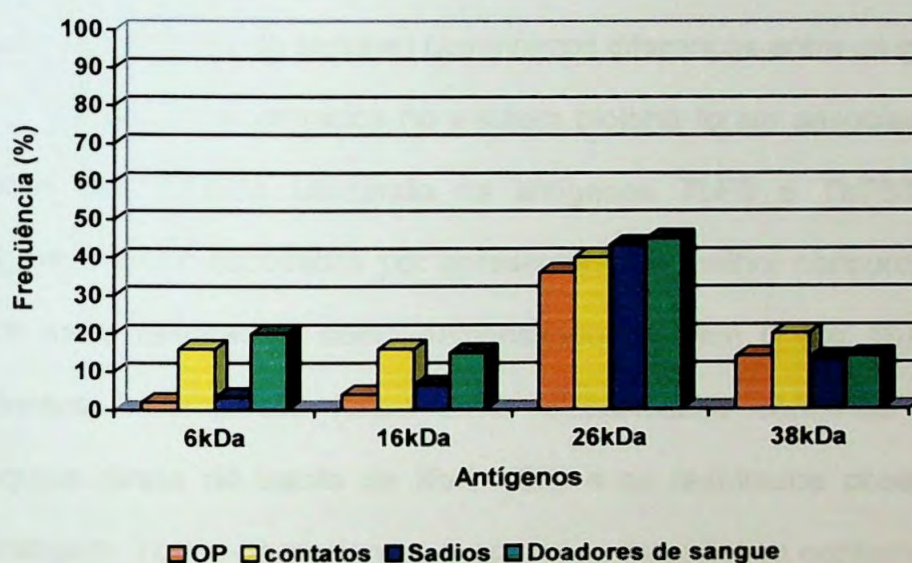


Figura 23: Frequência de reconhecimento das frações antigênicas com diferentes massas moleculares (kDa) por anticorpos IgG do soro de **OP**= indivíduos com outras pneumopatias que não tuberculose; **Contatos** = Indivíduos em contato com paciente tuberculoso ou exposição ocupacional ao *M. tuberculosis*; **Sadios** = Indivíduos PPD+ ou PPD - sadios, avaliados clinicamente; **doadores de sangue** = indivíduos doadores de sangue, representantes da população geral.

A fração protéica reconhecida com maior frequência por todos os grupos estudados foi a de 26kDa, podendo ser considerada não específica do *M. tuberculosis*. Todos os grupos não portadores de tuberculose, compostos por indivíduos com outras pneumopatias, indivíduos sadios, contactantes e população geral, diferiram com significância estatística ($p < 0,05$ - Método de Dunnett's) na frequência de reconhecimento dos antígenos em relação ao grupo de pacientes

tuberculosos. Os grupos de indivíduos não apresentando tuberculose, quando comparados entre si, não apresentaram diferença na frequência de reconhecimento estatisticamente significativa ($p > 0,05$ – Método Student-Newman-Keuls) .

4.7.6 Determinação de perfis de reatividade

Quando analisamos os perfis de reatividade de anticorpos IgG dos grupos de indivíduos sem tuberculose pulmonar (contactantes, outras pneumopatias e doadores de banco de sangue) observamos diferenças entre os grupos.

Os perfis encontrados no western blotting foram associados aos resultados obtidos nos ELISAs utilizando os antígenos TbF6 e TbF6/DPEP. Estes dois antígenos foram escolhidos por apresentarem a melhor concordância e correlação entre seus resultados, como demonstrado no item 6 (fig 16) desta seção. Os pacientes tuberculosos foram ainda classificados conforme os resultados da pesquisa direta do bacilo de Koch (BK) e os resultados observados em exame radiológico. Todos os pacientes tiveram seu diagnóstico confirmado por resultados de cultura para *M. tuberculosis* positiva.

Dentre os 51 pacientes com tuberculose pulmonar, 41 (80,4%) apresentaram pesquisa direta para BK positiva. Em 33 (80,5%) pacientes, o exame radiológico apresentou infiltração pulmonar, e em 19 (46,3%), presença de processo cavitário. Entre os 10 pacientes com BK negativo, oito (80%) apresentaram infiltrado pulmonar e três (30%) apresentaram processo cavitário.

4.7.6.1 –pacientes com tuberculose pulmonar

Os soros colhidos pré-tratamento de 45 (88%) pacientes com tuberculose pulmonar reconheceram no mínimo duas frações antigênicas entre 38kDa e 6kDa. A associação entre o perfil de reatividade de anticorpos IgG, resultados bacteriológicos e ELISAs TbF6 , TbF6/DPEP, encontra-se representado na tabela 5, figura 25.

A reatividade apresentada para a região de 26kDa associada a uma das frações protéicas de 38, 16, ou 6 kDa, foi verificada em 11/45 (24%) dos pacientes (tabela 5).

Associação 26-6kDa: os soros de cinco pacientes reagiram com as frações de 26 e 6 kDa . Em quatro destes, a pesquisa direta de BK era positiva. Após dois meses de tratamento, entre os pacientes com pesquisa de BK positiva dois tornaram-se soro reagentes para a fração protéica de 16kDa e um para a região de 38kDa.

Associação 26-38kDa: os soros de três pacientes reagiram com frações protéicas de 26 e 38 kDa. Todos tinham pesquisa direta para BK positiva.

Associação 26-16kDa: os três pacientes restantes foram soro reagentes para as regiões de 26 e 16kDa. Apenas um deles apresentou pesquisa de BK negativa. O paciente soro reagente nos dois ELISAs após dois meses de tratamento, tornou-se soro reagente para a fração protéica de 38kDa.

Quatro padrões foram mais freqüentes entre os soros analisados pelo western blotting, estando presentes em 34/45 (75,5%) pacientes que apresentaram reatividade associada.

Estes padrões correspondem ao reconhecimento simultâneo das regiões: (38-26-16kDa); (38-26-6kDa) (38-26-16-6 kDa); (26kDa 16kDa e 6kDa) exemplificados na figura 24 como perfis 1,2, 3, 4 respectivamente.

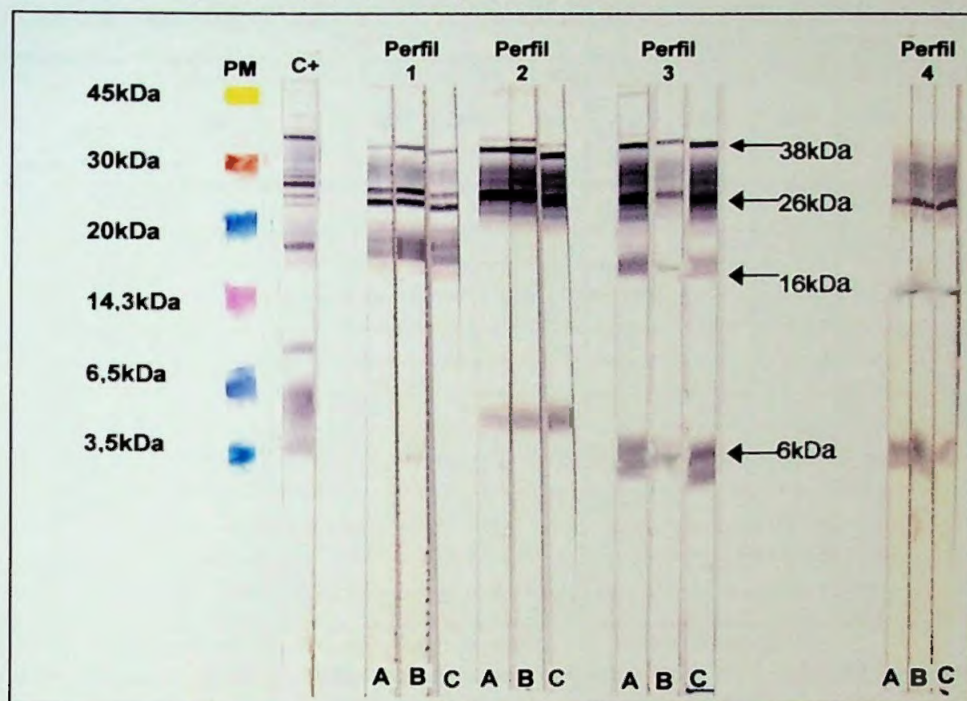


Figura 24: Perfis de reatividade apresentados no western blotting por soro de pacientes com tuberculose ativa. **A**=soro colhido pré-tratamento, **B**=soro colhido após 2 meses de terapia, **C**=soro colhido ao final do tratamento. **Perfil 1**= reatividade com as bandas de 38-26 -16kDa, **Perfil 2**= reatividade com as bandas de 38-26 -6 kDa, **Perfil 3**= reatividade com as bandas de 38-26-16 6kDa, encontrados no grupo de pacientes com doença ativa. **Perfil 4**= reatividade com as bandas de 26-16-6 kDa. **PM**= Padrão de peso molecular. **C+**= controle positivo (soro de paciente com tuberculose pulmonar ativa). Por serem corridas em geis diferentes não foi possível alinhar todas as fitas com padrão de PM apresentado.

A pesquisa de BK foi positiva em 31/34 (91,2%) pacientes apresentando um dos quatro padrões representados na figura 24. Entre os pacientes com pesquisa de BK negativa, dois apresentaram o perfil 2 e um o perfil 3 (tabela 5).

O ELISA TbF6 detectou 27/34 (79,4%) pacientes. Foram não reagentes para este antígeno os soros de seis pacientes com pesquisa de BK positiva de um paciente com pesquisa de BK negativa.

O ELISA TbF6/DPEP detectou 31/34 (91,2%) pacientes. Os três soros não reagentes eram de pacientes com pesquisa de BK positiva.

Tabela 5 - Resultados bacteriológicos e sorológicos nos ELISAs com antígenos TbF6 e TbF6/DPEP e perfil de reatividade de anticorpos IgG em soro colhido pré-tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar confirmada

Pacientes com cultura para <i>M. tuberculosis</i> positiva (n=51)										
WB Perfil (kDa)	TbF6 Ag					TbF6 / DPEP Ag				
	ELISA + BK +	ELISA + BK -	ELISA - BK -	ELISA - BK +	Total N=	ELISA + BK +	ELISA + BK -	ELISA - BK -	ELISA - BK +	Total N=
38-16-6	5	1		1	7	6	1			7
38-16	7			1	8	8				8
38-6	6	1	1	3	11	7	2		2	11
16-6	7			1	8	7			1	8
26-6	3		1	1	5	4	1			5
26-38	1			2	3	2			1	3
26-16	1	1		1	3	2		1		3
6										
16										
26	1	2	2		5		4		1	5
38										
nenhum			1		1		1			1
Total(n=)	31	5	5	10	51	36	9	1	5	51

BK= baciloscopia direta + = resultado positivo - = resultado negativo

WB= Western blotting kDa= Kilodaltons. Espaços coloridos indicam ausência de indivíduo apresentando reatividade para o perfil determinado.

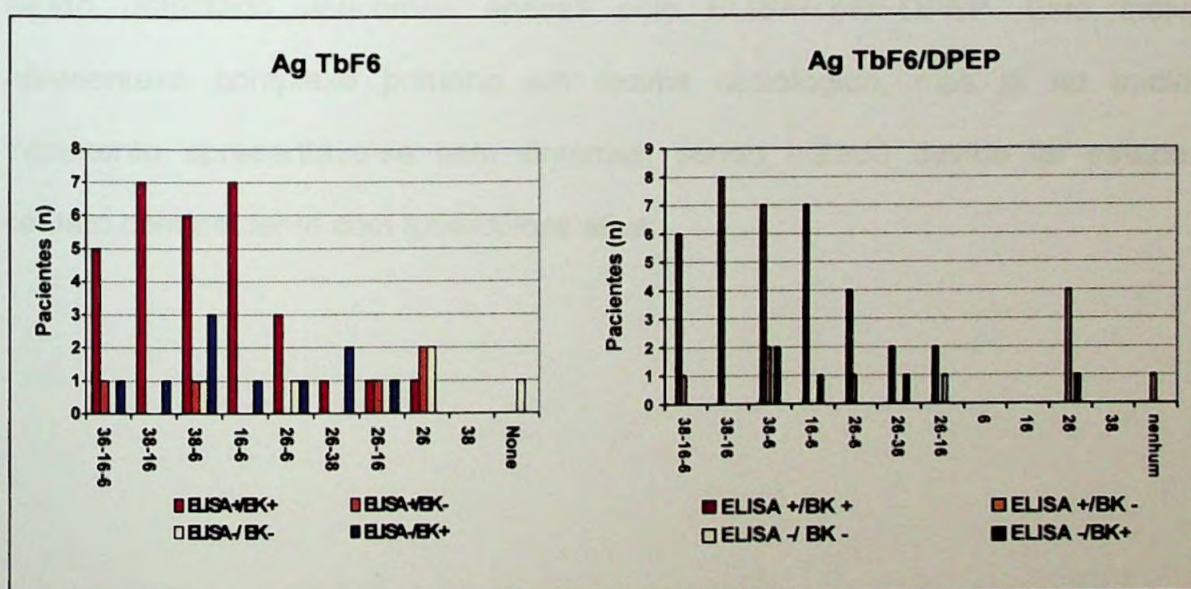


Figura 25: Perfil de reatividade no western blotting, encontrado em pacientes com tuberculose pulmonar divididos pelos resultados observados no ELISA e baciloscopia direta.

4.7.6.1.1- Perfil sorológico associado ao exame radiológico

A presença de caverna ao exame radiológico apenas se relacionou de forma estatisticamente significativa com a presença de reatividade para a fração protéica de 38kDa ($p=0,0407 \chi^2$), não estando relacionado com o número de bandas reconhecidas. Entre os pacientes que apresentavam infiltrado pulmonar associado com processo cavitário, 70% reagiram com a banda de 38kDa no western blotting ($p=0,0269$, teste z), não ocorrendo esta relação com os pacientes que apresentavam apenas infiltrado pulmonar.

Entre os cinco pacientes que apresentaram reatividade isolada para a fração de 26kDa, dois apresentavam lesão com aspecto de caverna e, os outros três, infiltrado pulmonar, não demonstrando relação do tipo de lesão, com o resultado sorológico.

O soro de um único paciente não apresentou reatividade no western blotting, sendo detectado anticorpos apenas pelo ELISA/TbF6-DPEP. Este indivíduo apresentava complexo primário em exame radiológico, mas já no início do tratamento apresentava-se sem sintomas, sendo tratado devido ter estado em contato com paciente com tuberculose ativa.

4.7.6.2 - Indivíduos sadios e com outras pneumopatias que não tuberculose

Entre os 30 soros analisados colhidos de indivíduos sadios e os 50 soros de pacientes com outras pneumopatias, não foram verificadas reatividade associada para quatro dos perfis de reatividade descritos para o western blotting: (26-38-16-6 kDa); (26-38-16kDa); (26-38-6kDa) (26-16-6kDa). Cinco indivíduos reconheceram a fração antigênica de 26kDa, associada á de 38kDa, 16kDa ou 6kDa. Todos eram negativos para o ELISA TbF6 e ELISA TbF6/DPEP com reação intradérmica (PPD) positiva.

Dos quatro pacientes com outras pneumopatias que apresentaram reatividade associada no western blotting apresentados na figura 26, nas regiões de 38 e 26kDa (fita 4), 26-16kDa (fitas 8 e 10), 26 e 6kDa (fita 12) , apenas um (fita 10), foi reagente nos dois ELISAs realizados (tabela 6).

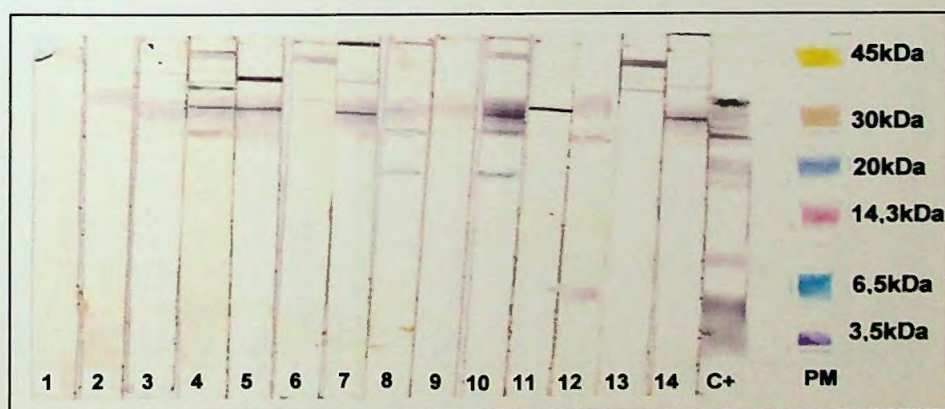


Figura. 26: Perfis de reatividade encontrados nos Western blotting realizados com soro de pacientes apresentando outras pneumopatias. C+ = controle positivo (soro de paciente com tuberculose ativa). PM = Padrão de peso molecular em kilodaltons (kDa).

Não apresentaram reatividade para as regiões analisadas no western blotting 14 (46,6%) dos indivíduos sadios e 25 (50%) dos pacientes com outras pneumopatias.

Tabela 6 - Perfil de reatividade no western blotting (WB) e ELISA IgG anti TbF6 e TbF6/DPEP em indivíduos sadios e com outras pneumopatias.

WB Perfil (kDa)	Sadios (n=30)				Outras pneumopatias (n=50)			
	TbF6		TbF6/DPEP		TbF6		TbF6/DPEP	
	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
38-16-6								
38-16								
38-6								
16-6								
26-6		1		1		1		1
26-16		2		2	1	1	1	1
26-38		2		2		1		1
6								
16		1		1				
26	2	6	2	6	3	12	2	13
38		2		2	2	4	1	5
Nenhum	1	13	1	13	9	16	2	23
Total (n=)	3	27	3	27	15	35	6	44

+ = resultado positivo - = resultado negativo **WB**= Western blotting **kDa**= Kilodaltons Espaços coloridos indicam ausência de indivíduo apresentando reatividade para o perfil determinado.

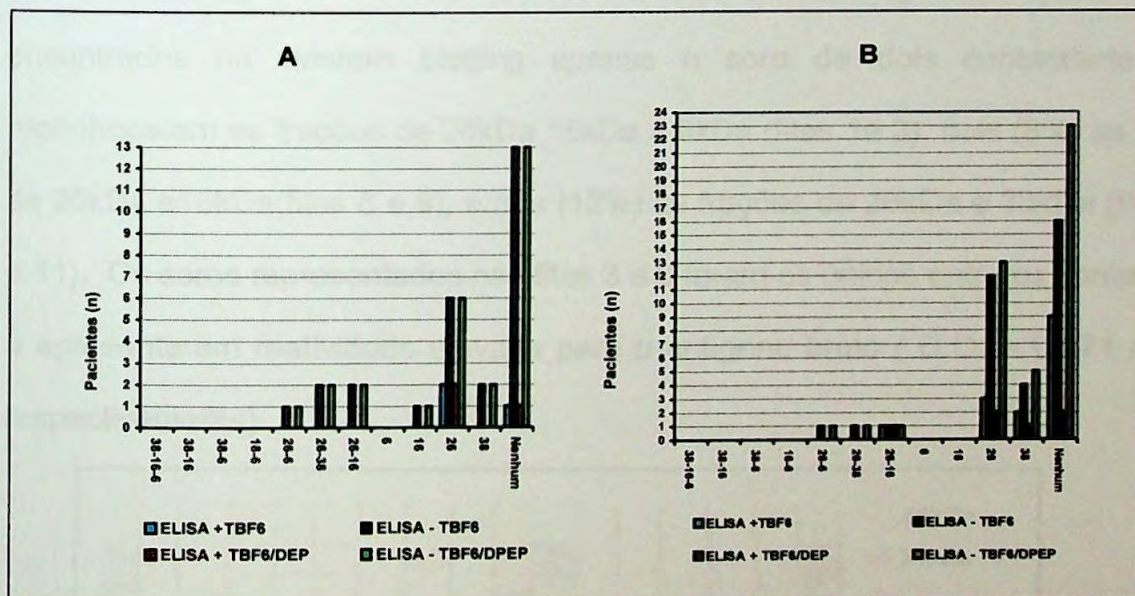


Figura 27 Perfil de reatividade de anticorpos IgG verificado no Western blotting, em soro de indivíduos sadios (A) e com outras pneumopatias (B) divididos pelos resultados observados nos ELISAs com antígeno TbF6 ou TbF6/DPEP.

4.7.6.3 - Indivíduos contactantes e população geral doadora de sangue.

Dos 25 soros de contactantes, nenhum apresentou reatividade associada para três dos perfis de reatividade descritos para o western blotting: (26-38-16-6 kDa); (26-38-16kDa); (26-38-6kDa).

O reconhecimento de apenas uma das frações antigênicas foi verificado no soro de seis (24%) indivíduos contactantes e em 12 (48%) não foi verificada reatividade com nenhuma das regiões antigênicas estudadas. Nenhum dos soros sem reatividade no western blotting apresentou reatividade no ELISA para os antígenos estudados, além do TbF6 ou TbF6/DPEP. A maioria dos soros (88%) teve resultado não reagente para o teste ELISA TbF6/DPEP.

As reatividades associadas estão representadas na figura 28. Entre os perfis encontrados no western blotting apenas o soro de dois contactantes (8%) reconheceram as frações de 26kDa 16kDa e 6kDa (fitas 1e 3), dois (8%) as frações de 26kDa e 16kDa (fitas 8 e 9), e três (12%) as frações de 26kDa e 38kDa (fitas 5, 6 e 11). Os soros representados nas fitas 3 e 8 foram os únicos entre os contactantes a apresentarem reatividade elevada para o antígeno bruto (D.O. = 0,671 e 1,316 respectivamente).

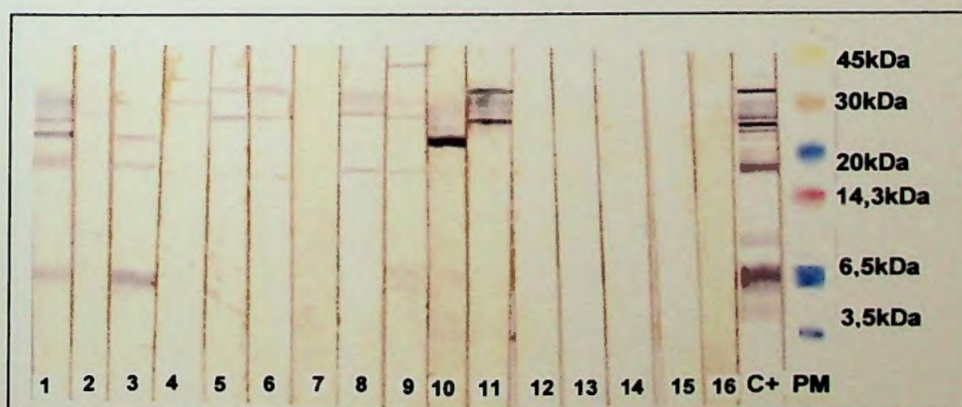


Figura 28 Perfis de reatividade encontrados no Western blotting realizado com soro de indivíduos contactantes de pacientes com tuberculose ativa. C+ = controle positivo PM = Padrão de peso molecular em Kilodaltons (kDa).

Entre os soros de doadores de sangue, quatro reconheceram de forma associada às frações de 26-38-16-6kDa, e um as frações de 26-38 e 6kDa, perfis estes presentes exclusivamente no grupo de pacientes tuberculosos. Estes cinco (2,5%) indivíduos eram não reagentes para os dois ELISAs realizados. O perfil de reatividade comum entre contactantes e pacientes tuberculosos (26-16-6kDa) foi encontrado em seis (3%) destes soros representantes da população geral, todos com resultado não reagente nos ELISAs realizados. Reatividades associadas exclusivamente a fração inespecífica de 26kDa foram verificadas em 74 (37%) dos soros estudados. Em 115 (57,5%) dos soros não foi observada reatividade no western blotting.

Na tabela 7 e na figura 29, encontram-se representados os perfis de reatividade encontrados no western-blotting, associados aos resultados obtidos nos ELISAs TbF6 e TbF6/DPEP.

Tabela 7 - Perfil de reatividade no Western blotting (WB) e ELISA IgG anti TbF6 e TbF6/DPEP em soros de contactantes e população de doadores de sangue.

Reatividade WB Perfil (kDa)	Contatos (n=25)				População geral (n=200)			
	TbF6F		TbF6F/DPEP		TbF6F		TbF6/DPEP	
	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -	ELISA +	ELISA -
38-16-6						4		4
38-16								
38-6						1		1
16-6	1	1		2		6		6
26-6					2	29	3	28
26-16	1	1	1	1	1	19		20
26-38	1	2		3	2	21	1	22
6		1		1				
16								
26	1	3	1	3				
38		1		1				
Sem reatividade	2	10	2	10	13	102	6	109
Total (n=)	6	19	4	21	18	182	10	190

+ = resultado positivo - = resultado negativo **WB** = Western blotting **kDa**= Kilodaltons. Espaços coloridos indicam ausência de indivíduo apresentando reatividade para o perfil determinado.

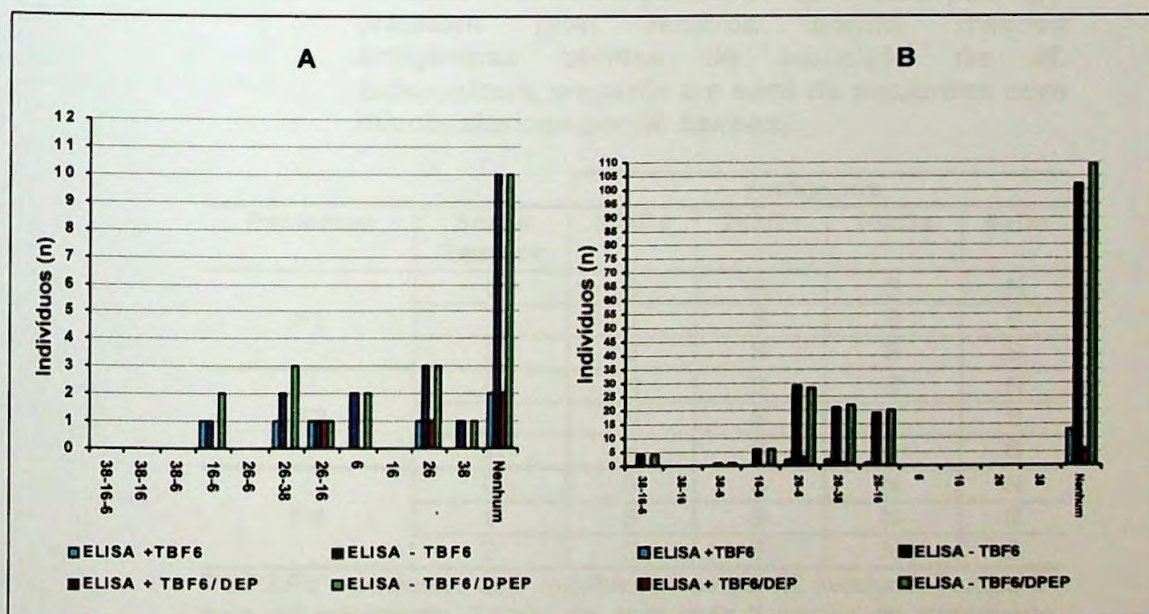


Figura 29: Perfil de reatividade para anticorpos IgG verificado no Western blotting (eixo x), em soro de indivíduos contactantes de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (A) e doadores de sangue, representativo da população geral (B) divididos pelos resultados observado nos ELISAs com antígeno TbF6 ou TbF6/DPEP.

4.7.6.4 - Pacientes com micobacteriose pulmonar por *M. kansasii*

Todos os três pacientes com infecção pulmonar por *M. kansasii* apresentavam exame radiológico com infiltração pulmonar e ausência de caverna. Os soros dos três casos reconheceram o antígeno situado na região de 26kDa. Apenas um não apresentou reatividade para o antígeno na região de 38kDa e outro para a região de 16kDa, sendo este o único dos três pacientes com pesquisa direta para BK negativa. Após dois meses de tratamento, todos os soros reagiram com a região de 6kDa. (Tabela 8).

O padrão de reconhecimento apresentado por estes pacientes mostrou semelhança com o encontrado nos pacientes com tuberculose pulmonar.

Tabela 8 - Padrão de reconhecimento de anticorpos IgG (Western blot) reativos contra frações antigênicas obtidas de sonicação de *M. tuberculosis*, presente em soro de pacientes com micobacteriose por *M. kansasii*

Pacientes	Soros Tempos	Antígenos			
		38kDa	26kDa	16kDa	6kDa
P1	0	S	S	S	N
	1	S	S	S	S
	2	S	S	S	S
P2	0	N	S	S	N
	1	N	S	S	S
	2	N	S	S	S
P3	0	S	S	N	N
	1	S	S	N	S
	2	S	S	N	S

P1,P2,P3 = pacientes com micobacteriose por *M. kansasii*, Tempo 0= soro pré-tratamento, Tempo 1= soro após 2 meses de tratamento, Tempo 2= soro após finalizado o tratamento. N= não reagente, S= reagente.

4.7.6.5- Pacientes com tuberculose ganglionar:

Entre quatro pacientes com tuberculose ganglionar, dois reconheceram apenas o antígeno na região de 26kDa. Entre os outros dois pacientes, um reconheceu apenas a região de 38kDa e o outro a região de 26kDa e 16kDa. Nenhum dos pacientes apresentou reatividade contra antígeno da região de 6kDa (Tabela 9)

O número de regiões reconhecidas pelos pacientes com tuberculose ganglionar foi menor que a reconhecida pelos pacientes com tuberculose pulmonar.

Tabela 9: Padrão de reconhecimento de anticorpos IgG (Western blotting) reativos contra frações antigênicas obtidas de sonicação de *M.tuberculosis*, presente em soro de pacientes com tuberculose ganglionar.

Tuberculose Ganglionar	Soros colheitas	Antígenos			
		38kDa	26kDa	16kDa	6kDa
P1	0	N	S	N	N
	1	N	S	N	N
	2	N	S	N	N
P2	0	S	N	N	N
	1	S	N	N	N
	2	S	N	N	N
P3	0	N	S	S	N
	1	N	S	S	N
	2	N	S	S	N
P4	0	N	S	N	N
	1	N	S	N	N
	2	N	S	N	N

P1,P2,P3,P4 = pacientes com tuberculose ganglionar, Tempo 0= soro pré-tratamento, Tempo 1= soro após 2 meses de tratamento, Tempo 2= soro após finalizado o tratamento. N= não reagente, S= reagente.

5- DISCUSSÃO

A compreensão da resposta imunológica desenvolvida durante a infecção e doença tuberculosa tem sido alvo de estudos de inúmeros pesquisadores. Sabe-se que durante a infecção ocorre forte resposta humoral, o que torna interessante a pesquisa de anticorpos para diagnóstico de doença ativa, pois esta independe da detecção da micobactéria, facilitando o diagnóstico dos casos paucibacilares e extrapulmonares.

A sensibilidade dos testes sorológicos para diagnóstico de tuberculose está longe do ideal. Nem todos os antígenos utilizados conseguem detectar resposta espécie específica, distinguindo infecção causada pelo complexo *M. tuberculosis* da maioria das infecções causadas por micobactérias não tuberculosas. Este é um ponto importante, uma vez que a associação do HIV com tuberculose tem aumentado o número de infecções causadas por essas outras micobactérias, e a identificação da espécie é fator importante em relação ao tratamento instituído.

Apesar de algum progresso, os requisitos necessários para o desenvolvimento de um teste ideal continuam sendo extremamente difíceis de preencher, uma vez que esse teste deveria: 1) diferenciar infecção causada pelo *M. tuberculosis* de outras micobactérias; 2) distinguir a resposta de anticorpos devido à vacinação por BCG, ou infecção natural, de doença ativa; 3) ser capaz de monitorar o tratamento e 4) ser barato e fácil de realizar.

A descoberta da seqüência genômica completa do *M. tuberculosis* (COLE et al, 1998) levou a um considerável progresso na descoberta de novos antígenos. O conhecimento sobre alguns dos determinantes antigênicos tem auxiliado a desvendar o papel dessas proteínas na resposta imunológica e permitido sua aplicação em testes imunodiagnósticos.

Porém, um dos fatores que tem dificultado o progresso dos testes sorológicos, é o número limitado de antígenos de *M. tuberculosis* disponíveis na forma purificada, bem como a dificuldade de sua obtenção em grande quantidade. Proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos produzidos em laboratório precisam ser avaliados, pois nem sempre refletem a resposta imune contra antígenos nativos. Provavelmente, porque diversos anticorpos específicos produzidos durante a infecção tuberculosa sejam dirigidos contra epítopos conformacionais.

Neste trabalho foram padronizados e avaliados para uso em teste ELISA os antígenos recombinantes TbF6[®], TbF10[®], Mtb81, e a associação TbF6/DPEP[®], bem como antígeno bruto, constituído de proteínas solúveis, obtidas após sonicação de cultura de cepa clínica de *M. tuberculosis*.

O método de obtenção de antígeno por sonicação da massa bacilar foi escolhido para obtenção do extrato antigênico bruto, por ser extremamente citado na literatura (WADEE et al, 1987, LAAL et al 1997, FRANCO et al, 2001). A obtenção de antígenos a partir de filtrado de meios de cultura do bacilo também é muito utilizada, contudo, filtrados de cultura de *M.tuberculosis* e bacilos submetidos à sonicação, apresentam a maioria das proteínas representadas dentro e no envelope da bactéria, incluindo o citoplasma (WIKER et al, 1988). Raras proteínas não são encontradas nas preparações sonicadas, mais notadamente o antígeno 85 (30-31kDa) antes designado complexo 85 (WIKER et al, 1986). A diferença principal entre proteínas secretadas ou citoplasmáticas é que proteínas secretadas são liberadas por bacilos vivos e proteínas citoplasmáticas por bacilos mortos. Porém, indivíduos que albergam o bacilo da tuberculose de forma latente, desenvolvem imunidade através de proteínas secretadas durante as prováveis divisões celulares

que ocorrem nesse período, controlando a infecção. Já durante a doença ativa, ocorre proliferação e morte das bactérias, liberando proteínas citoplasmáticas que até esse momento não tinham sido apresentadas ao sistema imune, parecendo ter essas proteínas, importante papel na imunidade protetora, evitando a transição entre doença latente e ativa (WIKER, 2001). Como preparações obtidas através de sonicados contém proteínas citoplasmáticas, esse método mostra-se adequado para o estudo sorológico a que este trabalho se propõe.

O fato de ter sido utilizada cepa obtida a partir de cultivo de amostra clínica e não a cepa padrão H37Rv não foi considerado relevante, pela identificação precisa da cepa por nós utilizada no presente trabalho. Estudos por western blotting, utilizando soro de indivíduos com tuberculose ativa e indivíduos saudáveis mostraram que apenas ocorrem diferenças quantitativas na reatividade apresentada para as proteínas secretadas pela cepa de referência H37Rv e cepas clínicas, sem serem observadas diferenças qualitativas (ROJAS-ESPINOSA et al, 1999).

A manutenção da cultura de *M. tuberculosis* por 10 semanas, para posterior extração antigênica, foi realizada baseando-se em dados anteriormente publicados. Estes estudos mostram que a partir de 40 dias não ocorre aumento do número de frações protéicas, tanto em antígenos obtidos através de filtrados de cultura como sonicados, sendo os antígenos encontrados no meio de cultivo uma fração dos antígenos encontrados após sonicação dos bacilos de *M. tuberculosis* (ESPITIA et al, 1991, VERBON et al 1990). O meio líquido de Sauton, utilizado neste trabalho para o cultivo da micobactéria, tem no glicerol a fonte de carbono, aumentando a necessidade de oxigênio para o crescimento da bactéria.(WAYNE & DIAZ, 1967). A limitação no suprimento de oxigênio induz a expressão de proteínas que são produzidas em condições de "stress", como ESAT-6 entre outras (TABIRA, 1996).

Essas condições, presentes no cultivo realizado, provavelmente permitiram que este tipo de proteína estivesse presente no nosso extrato antigênico.

Tivemos o cuidado de realizar todos os experimentos utilizando um único lote de extração de antígeno bruto. Isto se faz necessário para que seja obtida uma boa reprodutibilidade dos resultados. Bassey et al, 1996, comentam a possibilidade de o tempo e a força usada para sonicação alterar a composição do extrato solúvel obtido, mesmo utilizando-se sempre o cultivo original.

No presente trabalho, os três lotes antigênicos mostraram rendimentos protéicos diferentes. A massa bacilar úmida, utilizada para o processo de sonicação, foi colocada diretamente no frasco para esse processo, sem pesagem prévia. A medida da quantidade foi realizada através da marcação de graduação presente no frasco. Tal fator pode ter determinado variação na quantidade de bacilos presentes, resultando concentrações protéicas diferentes para cada lote. Essa variação não alterou a qualidade do antígeno. A reprodutibilidade do extrato antigênico foi confirmada pela análise realizada através de SDS-PAGE, onde observamos a presença das mesmas frações antigênicas nos diferentes lotes, como pôde ser visto na figura 3. As condições de corrida do SDS-PAGE e concentração antigênica empregada foram previamente determinadas, objetivando o estudo das proteínas de baixo peso molecular, observadas na figura 2.

Para a realização do western blotting, procedimentos como diluição do soro, escolha de soluções diluentes e bloqueadoras, foram seguidos conforme determinado por estudos anteriores para outro sistema, bem padronizado em nosso laboratório (TOZETTO - MENDONZA, 1997). Diferentes tempos de reação da amostra de soro com frações protéicas transferidas para membrana de nitrocelulose foram avaliados com o objetivo de otimizar a realização do teste. Contudo, os

melhores resultados foram observados quando deixamos as amostras reagirem por 18 horas, não sendo possível abreviar esse tempo de reação, demonstrados na figura 4.

Após a obtenção de extrato antigênico bruto com qualidade adequada para realização de testes sorológicos, procedemos a padronização do ELISA com os antígenos disponíveis para este estudo.

As etapas de sensibilização das microplacas, bem como soluções ideais de bloqueio dos sítios remanescentes, evitando reações inespecíficas, foram realizados segundo protocolos estipulados por estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório. Para os antígenos recombinantes foram seguidos os protocolos da CORIXA Co. Os excelentes resultados obtidos dispensaram a necessidade de nova padronização.

Para o extrato antigênico bruto, escolhemos a concentração de 1,50µg/mL para sensibilização das microplacas (150ng/poço) por termos obtidos resultados satisfatórios na discriminação de soro reagente e não reagente e esta concentração ser próxima à utilizada para os antígenos recombinantes (200ng/poço).

Para reação inicial com todos os antígenos as amostras a serem testadas foram diluídas a 1/40. Essa padronização objetivou atingir a melhor sensibilidade possível do teste ELISA, permitindo que amostras de soro de pacientes tuberculosos, com baixa reatividade, conseguissem ser detectadas como observado nas figuras 6 e 7.

Em relação as diferentes etapas do ELISA, foram estudados diferentes tempos necessários para a reação das amostras de soro, detecção da reação antígeno anticorpo pelo conjugado enzimático e revelação da reação pelo cromógeno (dados não apresentados). Observamos que aumentos nos tempos de

incubação não alteravam a qualidade dos resultados obtidos. Optamos então por padronizar a reação utilizando 30 minutos de incubação para todas as etapas. Isto permitiu otimizar o teste em relação ao tempo total de reação (1:30h), além de diminuir a probabilidade de reações de fundo devidos a ligações inespecíficas, sem prejuízo na detecção dos casos verdadeiramente reagentes.

Estabelecido o protocolo para realização do teste, determinamos o ponto de corte da reação, estudando o soro de indivíduos sadios avaliados clinicamente. Não utilizamos nesta fase do estudo soros de indivíduos doadores de sangue, por não termos informações adicionais, que nos permitisse eliminar amostra de soro de pessoas que eventualmente tivessem entrado em contato recente com indivíduo portador de tuberculose ativa, ou mesmo tivessem desenvolvido e curado a infecção recentemente.

A determinação do limiar de reatividade ("cut-off"), é um dos pontos cruciais na padronização dos testes ELISA. Alterações no seu valor influenciam diretamente a sensibilidade e especificidade do teste.

Em uma análise inicial, como pode ser observado na figura 8, ao determinarmos o corte da reação acrescentando dois desvios padrões à média das densidades ópticas obtidas com soro de indivíduos sadios, obtivemos um soro reagente para o antígeno bruto (D.O. 0,522), TbF10 (D.O. 0,520) e TbF6/DPEP (D.O. 0,482), e dois soros reagentes para o antígeno Mtb81 (D.O. 0,407-0,443) e TbF6 (D.O. 0,402- 0,432), sendo estes considerados falsos reagentes positivos. Apenas os soros falsos reagentes para o antígeno Bruto ("cut-off" 0,367) e TbF10 ("cut-off" 0,465), apresentaram densidades ópticas com valores maiores que 20% em relação ao valor de corte estabelecido. As outras reatividades encontradas situaram-se na chamada "zona cinza", onde as D.O. são maiores, mas muito

próximas ao limiar de reatividade estabelecido. Os soros desses indivíduos não podem ser considerados reagentes, necessitando outras análises ou realização de testes confirmatórios para um resultado seguro.

A determinação do limiar de reatividade através da elaboração de curvas ROC, pesquisando o ponto de máxima especificidade e sensibilidade do teste, confirmou ser o acréscimo de dois desvios padrões suficientes para discernir corretamente amostras reagentes das não reagentes. Os valores de D.O. resultantes como ponto de cortes ideais da reação, pelos dois métodos, foram muito próximos: Mtb81(0,398-0,400); Bruto (0,367-0,370); TbF10 (0,465-0,450); TbF6 (0,348-0,300); TbF6/DPEP (0,460-0,400). A elaboração de curvas ROC teve como vantagem, permitir determinar o teste de maior acurácia através da análise da área resultante abaixo da curva, tornando o seu uso vantajoso.

Para confirmarmos o bom desempenho dos testes ELISA, quando aplicados a uma população geral, foram avaliados soros de indivíduos doadores de sangue e portadores de outras pneumopatias, comparando os resultados com a reatividade apresentada pelos indivíduos sadios (fig 15). Como no Brasil a maioria dos indivíduos são vacinados com a cepa atenuada de BCG, os testes sorológicos precisam ser bem avaliados, para que anticorpos presentes devido à vacinação não sejam detectados. Apesar dessa possibilidade, estudos realizados por Balestrino et al, 1984, mostraram que a vacinação realizada na infância não leva a resultados positivos no ELISA na vida adulta, dependendo do antígeno testado. Em relação à reação intradérmica também se verificou que apenas 8% das pessoas vacinadas com BCG ao nascimento mantiveram reação intradérmica (PPD) positiva 15 anos depois (MENZIES e VISSANDJEE, 1992). Por essas razões podemos acreditar que a queda da especificidade para o antígeno bruto demonstrada na tabela 3 tenha

ocorrido principalmente devido a presença de anticorpos formados em resposta ao contato com micobactérias não patogênicas, que compartilhem epítomos com *M. tuberculosis*, mais que pela vacinação realizada com a cepa BCG. Estudos realizados por Sada et al.(1990) em população 90% vacinada com BCG, usando como antígeno lipoarabinoman, que contém diversos epítomos não específicos, relata ocorrência de reações falso positivas principalmente devido a histoplasmose do que a vacinação. O mesmo foi descrito por Zou et al (1994), estudando o antígeno A60, o qual encontrou apenas 1% de reações falso positivas entre indivíduos vacinados e PPD positivos.

Em relação aos antígenos recombinantes, obtivemos os melhores resultados em relação à especificidade e sensibilidade com os antígenos TbF6 e TbF6/DPEP. A queda de especificidade quando testados soros de indivíduos portadores de outras pneumopatias, observada em nosso estudo, tem sido relatada por outros pesquisadores (AL-HAJJAJ et al, 1999; MAEKURA et al, 2001; JULIAN et al, 2002). O estudo dessa população, na avaliação de novos antígenos com potencial para diagnóstico sorológico da tuberculose, é extremamente importante, uma vez que esses pacientes podem ser confundidos com pacientes tuberculosos. Provavelmente o fato de alguns estudos apenas incluírem como controle indivíduos sadios, ou um baixo número de pacientes com outras pneumopatias, faz com que diferentes valores de especificidade sejam descritos para um mesmo antígeno.

A presença de hipergamaglobulinemia inespecífica associada a algumas pneumopatias não tuberculosas (BOTHAMLEY e RUDD, 1994), pode ser uma das razões para o encontro de um maior número de reações falso-positivas nesta população.

Os melhores resultados encontrados de índice J, para os antígenos TbF6 e TbF6/DPEP, quando usados para cálculos os valores de especificidade obtidos estudando a população de doadores de banco de sangue (0,616- 0,813 respectivamente), fizeram com que considerássemos estes, os testes com maior eficiência diagnóstica. A boa correlação entre os dois testes, quando estudados os soros de pacientes tuberculosos pré-tratamento (fig 16), corrobora seu uso, apesar de notória superioridade do antígeno TbF6/DPEP, com 86,36% de sensibilidade.

A variação na sensibilidade quando comparados os resultados dos diferentes antígenos é explicada pela heterogeneidade da resposta imune encontrada na tuberculose (LYASHCHENKO, et al, 1998), a qual provavelmente resulta de fatores como: característica do sistema imune do indivíduo, fase da doença e formação de imunocomplexos circulantes.

A falha na resposta imune pode estar associada com a presença de determinados antígenos de histocompatibilidade (HLA) do complexo de histocompatibilidade principal (CPH). Pesquisas recentes tem demonstrado a presença de células CD8+ que reconhecem antígenos de *M. tuberculosis* apresentados por moléculas HLA-E, em indivíduos que apresentam infecção latente (HEINZEL et al, 2002). Principalmente em portadores de HLA DR2, são detectados níveis mais altos de anticorpos reativos ao antígeno 38kDa de *M. tuberculosis* (BOTHAMLEY et al, 1989). Trabalho recente de Mustafa (2000) mostra que alguns antígenos micobacterianos podem ter sua apresentação restrita a células portadoras de HLA-DRB3 (HLA-DR52) e HLA-DRB1(HLA-DR-10). Apesar de não termos disponíveis os dados referentes a tipagem HLA dos pacientes, essa possibilidade pode explicar a não reatividade encontrada no soro do paciente número 43 (tabela

4), o qual apresentou cultivo e pesquisa direta para micobactérias positiva, com grande número de bacilos presentes na amostra examinada.

Quando avaliamos os resultados encontrados nos ELISAs e pesquisa direta de BK na amostra examinada, verificamos que variações estatisticamente significantes ocorreram apenas com os antígenos TbF10 e TbF6. As amostras de soro de pacientes, com resultado negativo para a pesquisa de BK, apresentaram para esses antígenos, densidades ópticas significativamente menores que os pacientes com pesquisa positiva (fig 21). Por essa razão, esses antígenos foram os que demonstraram pior desempenho entre os pacientes com pesquisa de BK negativa, detectando o menor número de pacientes soro reagentes nesse grupo (fig 17A e 18C), em relação aos outros antígenos estudados.

Poucos estudos comparam a sensibilidade dos testes na detecção de pacientes tuberculosos com BK positivo e BK negativo separadamente. Como pode ser visto no quadro 1 mostrado na introdução deste trabalho, a sensibilidade encontrada no grupo de pacientes com pesquisa direta do bacilo no escarro negativa, é freqüentemente similar ou inferior a encontrada quando estudados pacientes com pesquisa de BK positiva. Apesar do número de pacientes com pesquisa de BK negativa neste trabalho ser pequeno, o ELISA TbF6/DPEP mostrou ser superior em seu desempenho, detectando 9/10 casos estudados (fig 17-B). A quantidade de bacilo presente na amostra examinada, não mostrou relação com a intensidade da resposta detectada pelos testes ELISAs realizados.

A possibilidade do estágio da doença estar relacionado com o tipo de antígeno liberado pela micobactéria, levando ao reconhecimento de antígenos diferentes, também tem sido descrita (JACKETT et al, 1988, SAMANICH et al, 2001) como fator responsável pela variabilidade da resposta imune. Pacientes com

tuberculose pulmonar geralmente apresentam lesões em diferentes estágios de liquefação, podendo ser reflexo da quantidade de bacilo na lesão, replicação bacilar, e variações metabólicas encontradas em diferentes tipos de cavidades (Mac VANDIVIERE et al, 1956). Em nosso estudo, as características radiológicas apresentadas pelo paciente não apresentaram relação com os resultados de ELISA obtidos, provavelmente devido à maioria dos antígenos recombinantes utilizados, associarem diferentes epítomos, conseguindo abranger as variações antigênicas existentes entre processo cavitário e infiltrado pulmonar.

Além das falhas na resposta imune, outro fator que pode levar a um falso resultado negativo é a formação de imunocomplexos circulantes, que não permitiriam a detecção dos anticorpos pelo método de ELISA utilizado (BHATTACHARYA et al, 1986; HARRINGTON et al, 2000). Contudo, após dois meses de terapia, diversos pacientes apresentaram aumento na reatividade sorológica, verificada através da densidade óptica (fig 20), alteração observada também por outros pesquisadores (BOTHAMLEY et al, 1990, MAEKURA et al, 1993, IMAZ & ZERBINI,2000). Vários mecanismos podem explicar esse fenômeno. Pode ocorrer um estímulo intenso da resposta humoral por antígenos liberados pelas bactérias mortas, (KAPLAN e CHASE, 1980) e/ou uma queda na quantidade de antígenos circulantes, fazendo com que os anticorpos específicos não se apresentem mais presos a imunocomplexos. Já a manutenção ou queda na densidade óptica observada em algumas amostras pode ser devida também a formação de imunocomplexos, ou inibição específica de determinados grupos de linfócitos (GRANGE,1984;)

O único antígeno que conseguiu detectar queda de reatividade durante o tratamento foi o Mtb 81. Contudo, a sensibilidade desse antígeno não foi satisfatória

(67,5%), apesar de ser superior a citada na literatura (57%), quando estudados soros de indivíduos tuberculosos africanos, HIV negativos (HENDRICKSON et al, 2000). Apenas 11 pacientes que já apresentavam menor reatividade na amostra pré-tratamento para o antígeno Mtb81, apresentaram-se não reagentes ao final do tratamento, não sendo adequado seu uso para o acompanhamento do tratamento quimioterápico instituído. Neste estudo, acompanhamos os pacientes apenas até o final do tratamento quimioterápico (seis a nove meses). Para sabermos como evoluiriam os anticorpos IgG após esse tempo, teríamos que ter acompanhado esses pacientes por pelo menos três anos, tempo descrito para que os níveis de anticorpos atinjam os níveis encontrados em indivíduos não tuberculosos (IMAZ e ZERBINI, 2000).

Após todas as análises, o ELISA TbF6/DPEP mostrou o melhor desempenho possivelmente por ser o recombinante com maior associação de peptídeos entre os antígenos testados, minimizando o problema causado pela resposta heterogênea.

Em relação às amostras de soro de indivíduos contactantes, a reatividade média mais elevada foi para o antígeno bruto, (D.O. = 0,333), comparado aos demais antígenos (fig 19). Apesar dessa reatividade ser maior que apresentada pelos indivíduos sadios (0,186) com diferença estatisticamente significativa e muito inferior à encontrada quando comparada a média das D.O. obtidas no grupo de pacientes tuberculosos pré-tratamento (D.O. 0,665), os resultados positivos observados no ELISA podem sugerir uma análise mais cuidadosa desses indivíduos, que apesar de não apresentarem sintomas clínicos, podem estar desenvolvendo uma tuberculose latente. O perfil de reatividade observado no western blotting, que poderá auxiliar nessa decisão, será discutido no decorrer deste trabalho.

Apesar de não termos como objetivo o estudo de pacientes com tuberculose extrapulmonar, tivemos a oportunidade de estudar quatro casos de tuberculose ganglionar. O número de amostras não foi significativo para avaliar a capacidade dos antígenos em diagnosticar tuberculose extrapulmonar. Contudo, de todos os antígenos estudados, apenas o TbF10 não detectou nenhum dos casos. Todos os outros antígenos detectaram pelo menos dois casos (50%). A tuberculose extrapulmonar em alguns países é responsável por aproximadamente um terço dos pacientes com tuberculose (WEIR e THORNTON, 1985; DOLBERG, 1991). No Brasil, esta forma da doença é responsável por aproximadamente 16% dos casos de tuberculose notificados no estado de São Paulo (CVE, 2002), refletindo a incidência no país que é de aproximadamente 14% (SBPT, 1998). Por esta razão, diversos estudos tem sido realizados, principalmente com o antígeno de 38kDa, relatando sensibilidade entre 48% (WILKINS, e IVANYI, 1990) e 62,5% (KADIVAL et al, 1994). O reagente comercial "Pathozyme TB complex plus" testado para detecção de anticorpos IgG em tuberculose óssea, apresentou sensibilidade de 56% (DEMKOW et al, 2002). Essa baixa sensibilidade também foi descrita por Simonney et al (2000) para resposta IgG a antígenos glicolipídicos do *M. tuberculosis*.

Com relação ao estudo de reação sorológica cruzada devido à infecção por outras micobactérias que não *M. tuberculosis* (MNT), a prevalência desta infecção de 5,85 em cada 1000 pacientes com baciloscopia positiva descrita para o Brasil, (BARRETO e CAMPOS, 2000) torna a obtenção de casuística significativa extremamente difícil, quando estudados pacientes imunocompetentes.

Os três soros colhidos de pacientes com infecção pulmonar por *M. kansasii* apresentaram anticorpos IgG reagentes quando testados com os antígenos estudados. Essa reatividade, apesar de indicar uma provável reação cruzada dos

anticorpos anti *M. tuberculosis* com epítomos comuns ao *M. kansasii*, não é de todo prejudicial. Entre as micobactérias, excluindo a *M. tuberculosis*, que podem causar doença pulmonar de forma mais freqüente, encontram-se as micobactérias do complexo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. malmoense*. (CAMPOS, 2000). No Brasil, entre as MNT, a *M. kansasii* foi a segunda mais isolada (14,2%) (BARRETO & CAMPOS, 2000). Como essa micobactéria é suscetível às drogas anti-tuberculose, a instituição de tratamento quimioterápico precoce, baseado num exame sorológico, mesmo antes da identificação através de métodos microbiológicos, só traria benefícios ao paciente.

Para verificarmos que frações protéicas de *M. tuberculosis* estariam sendo reconhecidos pelos anticorpos IgG presentes nos soros analisados, estudamos a resposta humoral a antígenos de baixo peso molecular, procurando determinar freqüências e perfis de reatividades diferenciais entre os pacientes tuberculosos e os demais grupos estudados.

A freqüência no reconhecimento das frações antigênicas de 38kDa, 26kDa, 16kDa e 6kDa entre os soros dos pacientes com tuberculose pulmonar encontrada neste trabalho (fig 22) foi comparada com outros estudos, levando-se em conta que a formação de anticorpos, principalmente para o antígeno de 38kDa, varia conforme as características de cada grupo estudado (DANIEL & DEBANNE, 1987) como fase da doença, extensão da lesão pulmonar, indivíduos paucibacilares.

O antígeno de 38kDa é considerado extremamente específico e sua expressão encontra-se aumentada na presença de processos cavitários, onde ocorre aumento da replicação extracelular da bactéria. Por esta razão, a presença de anticorpos contra esse antígeno é associada à presença de cavidade ao exame radiológico, em aproximadamente 60% destes pacientes (BOTHAMLEY et al, 1992).

Isto pode ser confirmado em nosso trabalho onde 70% dos pacientes apresentando processo cavitário foram soro reagentes para a fração antigênica de 38kDa, relação não encontrada para as outras frações antigênicas ou entre pacientes que apresentavam apenas infiltrados pulmonares.

Samanich et al (2001), procurando mostrar diferenças encontradas entre a resposta humoral de indivíduos tuberculosos que apresentavam ou não processo cavitário, relacionou a presença de cavidade ao exame radiológico com reatividade para um maior número de frações antigênicas, sendo a de 38kDa a mais freqüentemente reconhecida. Em nosso estudo, o número de frações antigênicas reconhecidas não mostrou relação com as variações apresentadas pelo exame radiológico de forma estatística significativa. A freqüência no reconhecimento dessa fração por 59% dos soros de pacientes com tuberculose pulmonar pré-tratamento por nós estudados, foi próxima à descrita por Laal et al (1997), que encontrou 57% de reatividade para antígeno fracionado de *M. tuberculosis* contendo a fração de 38kDa em grupo de pacientes semelhantes. Freqüências menores como 30,7% (LYASHCHENKO et al, 2000) e 48% (DILLON et al, 2000) são citadas quando usados antígenos recombinantes. Provavelmente proteínas nativas de *M. tuberculosis* possuem epítomos para células B que induzem a produção de anticorpos durante a infecção natural que estão ausentes na forma recombinante. Estudos onde foram testados antígenos recombinantes das proteínas de 12, 16kDa, também observaram esse problema (VERBON et al, 1992b, VERBON, 1994, POTTUMARTHY et al, 2000).

Entre os grupos de indivíduos que não apresentavam tuberculose pulmonar, a presença de anticorpos para a fração protéica de 38kDa, foi discretamente maior nos soros de indivíduos contactantes (16%), que em doadores de banco de sangue

(14%) e indivíduos sadios PPD positivos (13%) (fig 23), porém sem valor estatístico significativo ($p > 0,05$). Bothamley e Rudd (1994) detectaram a presença de anticorpos contra o epitopo TB72 do antígeno de 38kDa em 28% dos indivíduos em contato com paciente tuberculoso e em 5% da população geral de Londres, enquanto que pacientes tuberculosos após dois anos e meio de tratamento, não mais apresentavam esse anticorpo. Como a proteína de 38kDa é secretada por bacilo metabolicamente ativo, indivíduos que portam o bacilo vivo podem estimular continuamente o sistema imune, mantendo o nível de anticorpos detectáveis. Ao contrário do indivíduo que consegue eliminar o bacilo

Existem dados que sugerem que o *M. tuberculosis* durante o estado latente, pode encontrar-se metabolicamente ativo. Essa hipótese está baseada na experiência obtida com tratamento quimioprolático de indivíduos assintomáticos, classificados como portadores de tuberculose latente. Os resultados mostraram que a instituição de seis meses de tratamento reduziu a incidência de reativação da tuberculose em 65% . Uma vez que os antibióticos requerem algum nível de metabolismo da bactéria para sua atuação, um microorganismo metabolicamente inativo não teria sido sensível a quimioprofilaxia (PARRISCH et al, 1998).

A fração protéica com peso molecular aproximado de 16kDa foi reconhecida por 50,9% dos soros pré-tratamento dos pacientes tuberculosos, similar ao encontrado em outros estudos realizados por Jackett et al (1988), Verbon et al (1994) e Laal et al (1997), onde a frequência de reconhecimento para esse grupo foi de 63%, 50% e 62% respectivamente. Apesar de não apresentar diferenças com significância estatística, provavelmente devido ao número de pacientes estudados no presente trabalho, o reconhecimento desse antígeno pelos indivíduos contactantes (16%) e doadores de sangue (15%) foi maior que o encontrado no

grupo de indivíduos sadios (6,6%). Um dado interessante observado por Imaz e Zerbini (2000) que acompanharam indivíduos tratados para tuberculose pulmonar por três anos, foi que a reatividade para a região de 14/16 kDa deixava de existir após 2 anos de tratamento, e não era detectada no grupo de indivíduos que haviam sido tratados para tuberculose pulmonar há mais de cinco anos. Isto nos leva a pensar que a reatividade para a fração de 16kDa pode indicar contato mais recente com *M. tuberculosis*, fato mais provável de ter ocorrido entre os indivíduos doadores de sangue, do qual não tínhamos qualquer informação, do que entre os indivíduos sadios, que foram cuidadosamente selecionados.

Em relação à resposta humoral para a fração protéica com peso aproximado de 6kDa, poucos dados existem na literatura. Apenas dois trabalhos de Lyashchenko et al (1998 e 2000), estudam a detecção de anticorpos IgG para antígenos recombinantes da proteína ESAT-6 (ESAT-6r), onde apesar de intensamente reativos, apenas 13-20% dos pacientes apresentam anticorpos contra essa proteína. Como já foi citado, antígenos recombinantes muitas vezes apresentam reatividade menor que antígenos nativos, devido alteração da sua conformação.

Grande parte dos estudos para essa região esteve inicialmente focada na resposta de células T para a proteína ESAT-6, uma vez que através da indução na produção de interferon- γ (IFN- γ), verificou-se que a maioria dos pacientes com tuberculose ativa, e não indivíduos sadios (providos de zonas com baixa endemia para tuberculose) reconheciam essa proteína (ULRICHS et al, 1998; AREND et al, 2000). Fator importante é a não existência do gene que codifica a ESAT-6 em cepa vacinal BCG. Contudo, estudos posteriores mostraram que essa resposta de células

T ao estímulo com ESAT-6r persistia em pacientes tratados e recuperados de uma tuberculose pulmonar (WU-HSIEH, et al, 2001).

Não sendo possível seu uso para determinar doença ativa, a possibilidade de detectar indivíduos infectados com a forma subclínica da doença foi levantada por Vekemans et al (2001), estudando população 90% vacinada com BCG, situada em área de alta incidência de tuberculose (África). Nessa população foram detectados 43% dos pacientes tuberculosos, 71% dos contactantes e 30% dos indivíduos sadios da comunidade respondedores a ESAT-6r, sugerindo a possibilidade de tuberculose latente nos dois últimos grupos. Em vista disto Doherty et al (2002) acompanharam indivíduos contactantes de pacientes tuberculosos bacilíferos, demonstrando que muito dos contactantes que respondiam ao antígeno ESAT-6r através da produção de IFN- γ acabavam desenvolvendo tuberculose ao longo de dois anos, sugerindo este ser um bom marcador para determinação de infecção subclínica.

Sendo o Brasil um país com uma população que apresenta uma diversidade étnica muito grande, onde a maioria dos indivíduos é vacinada com BCG, e com uma prevalência alta para tuberculose, um teste capaz de determinar os indivíduos latentemente infectados seria interessante, uma vez que esses indivíduos poderiam vir a ser fontes de nova infecção. Cardoso et al (2002) estudando a resposta a ESAT-6r na população brasileira, demonstraram que 60% dos indivíduos com outras pneumopatias que não tuberculose, apresentavam células T responsivas a essa proteína, porém em níveis mais baixos que os pacientes com tuberculose pulmonar. Não foram testados indivíduos contactantes, mas resposta elevada foi detectada em indivíduos com teste intradérmico com PPD > 10mm de induração. Isto sugere a necessidade de um método quantitativo para a dosagem de IFN- γ , dificultando o uso do teste em áreas endêmicas para tuberculose.

Não podemos afirmar que reatividade encontrada em nosso trabalho para a fração de 6kDa foi devida exclusivamente à reatividade com a proteína ESAT-6, uma vez que esta pertence a uma família de proteínas de baixo peso molecular (entre 6kDa e 12kDa) que poderiam estar presentes nesta mesma fração, e serem reativas, uma vez que todas, com diferente intensidade, são capazes de induzir resposta imune contra *M. tuberculosis* em humanos. Entre estas, a ESAT-6 e a CPF-10 são as mais reativas e o gene para ambas as proteínas não são encontrados na cepa vacinal BCG (SKJOT et al, 2000). Entre os soros pré-tratamento dos pacientes com tuberculose pulmonar, 57% reconheceram a fração de 6kDa. Essa frequência, apesar de tratar-se de resposta humoral, foi semelhante à encontrada por Cardoso et al (2002), que mostraram 60% de indivíduos brasileiros com tuberculose pulmonar apresentando resposta celular para ESAT-6r, através da produção de altos níveis de IFN- γ . Embora 20% dos indivíduos doadores de sangue e 16% dos indivíduos contactantes por nós testados, também tenham apresentado reatividade para esta fração protéica, apenas 3,3% dos indivíduos sadios reagiram com as proteínas situadas nesta região, todos eles com teste intradérmico PPD positivo. A diferença significativa na frequência de reatividade, encontrada entre o grupo de tuberculose pulmonar e os outros grupos estudados, nos estimulou a procurar um perfil de reatividade, associando os diferentes antígenos, que permitisse diferenciar indivíduos sadios de indivíduos infectados com *M. tuberculosis*.

Entre os padrões de reatividade encontrados quando analisadas as amostras de soro pré-tratamento dos 51 pacientes com tuberculose pulmonar, quatro perfis (figura 24) foram apresentados por 34/51 (66,6%) dos pacientes, que não foram encontrados entre os indivíduos sadios e com outras pneumopatias, onde a possibilidade de tuberculose pulmonar tinha sido excluída através de exames

clínicos e laboratoriais. A maioria desses pacientes também foi soro reagente nos testes ELISA TbF6 e TbF6/DPEP. Se considerarmos esses padrões de reatividade como indicativo de tuberculose ativa, três pacientes que não tinham sido detectados no teste ELISA TbF6/DPEP poderiam ter sido detectados pelo western blotting (tabela 5). Isto é possível uma vez que o ELISA e western blotting permitem reconhecimento de diferentes epítomos de um mesmo antígeno (VERBON et al, 1990).

Entre esses pacientes, encontra-se o indivíduo não reagente para nenhum dos antígenos testados no ELISA, mas com pesquisa direta e cultura para *M. tuberculosis* positiva, apresentando o perfil de reatividade (26-16-6) e outro indivíduo com perfil (26-38-6), que na segunda amostra analisada, devido a aumento na reatividade, passou a ser considerado soro reagente para o antígeno TbF6/DPEP.

Os padrões de reatividade (26-38-16-6), (26-38-16) e (26-38-6) estiveram presentes em 26 (51%) dos pacientes com tuberculose pulmonar (tabela 5) e em 5 (2,5%) dos doadores de sangue (tabela 7), não sendo detectado em indivíduos sadios ou com outras pneumopatias (tabela 6). Apenas 2/26 (7,7%) dos pacientes, apesar de terem a pesquisa de BK positiva, eram não reagentes para o ELISA TbF6/DPEP (tabela 5). Entre os doadores de sangue apresentando um destes padrões de reatividade, todos foram não reagentes no mesmo ELISA. A mesma consideração feita acima pode ser feita para esses casos, uma vez que não tínhamos informações clínicas desses pacientes, existe a possibilidade desses indivíduos serem portadores de tuberculose sem sintomas clínicos, e devido ao menor estímulo antigênico, não apresentarem anticorpos suficientes para detecção pelo método de ELISA, mas serem detectados pelo o western blotting.

Estudo semelhante foi realizado por Franco et al (2001), verificando a reatividade encontrada com proteínas obtidas a partir de sonicado de *M. tuberculosis*, com pesos moleculares entre 71 e 19kDa. Os resultados deste estudo mostram que os soros de 52,4% dos pacientes tuberculosos BK positivos e 17,6% dos BK negativos reconheciam as frações 19kDa, 26-38kDa, 71kDa e 65kDa, enquanto que 47,6%, não reconheciam nenhuma destas frações. Reconhecimento parcial (41,2%) ou total (17,6%) foi encontrado em pacientes tuberculosos BK negativos. Nos indivíduos contactantes apenas respostas parciais foram encontradas, principalmente para as regiões de 26-38kDa.

Em nosso estudo, chama a atenção à presença de reatividade associada para as frações de 16 e 6kDa em indivíduos contactantes e doadores de sangue. Além de este perfil ocorrer entre os pacientes tuberculosos, também está presente em 2/25 contactantes e em 6/200 doadores de sangue. Essas duas frações protéicas caracterizam-se por terem sua expressão aumentada no estágio de latência da bactéria, então, este perfil poderia estar indicando tuberculose latente em 8% dos contactantes e 3% da população geral, o que seria esperado, visto ser o Brasil um país endêmico para tuberculose. Além disto, a taxa de conversão tuberculínica (marcador de infecção recente) de 8% encontrada entre os profissionais da saúde (KRITSKI et al, 2000), apesar da pouca especificidade do método, reforça a possibilidade deste perfil estar associado à infecção latente.

Durante o estágio de latência, a bactéria pode sofrer adaptações principalmente à baixa tensão de oxigênio do meio (WAYNE, 1994), produzindo grandes quantidades de proteínas como a de 16kDa (YUAN et al, 1998) e ESAT-6 (HAILE et al, 2002). Como a manutenção da bactéria dentro do granuloma pode induzir a condições similares, essas proteínas podem ser um alvo antigênico

importante durante o estado de latência do microorganismo (AGREWALA & WILKINSON, 1998) com epítomos relevantes no desenvolvimento de imunidade celular efetiva para infecções micobacterianas (CACCAMO et al, 2002). Isto parece refletir também na imunidade humoral. IMAZ et al (2001) observaram através do teste ELISA, aumento na produção de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos contra o antígeno recombinante 16kDa, em soros de crianças em contato com *M. tuberculosis*, sugerindo resposta a infecção com clínica não aparente. Esta observação já tinha sido referida em trabalhos anteriores (HOEPPNER et al, 1987; JACKETT et al, 1988), onde indivíduos trabalhando em contato com pacientes tuberculosos demonstraram títulos altos de anticorpos para epítomo desse mesmo antígeno.

Os outros dois perfis envolvendo reatividade das frações 6kDa e 16kDa, (26-6) e (26-16) comuns a todos os grupos estudados, pode indicar memória imunológica a um contato antigo com *M. tuberculosis*, uma vez que 4/11 pacientes tuberculosos que apresentavam esses perfis na amostra pré-tratamento, na análise da segunda amostra passaram a ser reativos também a fração protéica de 38kDa ou 16, que são citadas como específicas do complexo *M. tuberculosis*. No estudo de Imaz et al (2000) 66% dos pacientes que após serem considerados curados, tornaram a desenvolver tuberculose ativa, voltaram a ser reativos para a fração protéica de 16kDa. O encontro de anticorpos anti-38kDa na segunda amostra analisada, pode indicar o aumento de anticorpos contra antígenos oriundos do metabolismo bacteriano, que no início da patologia não se encontravam em níveis detectáveis, como os anticorpos formados para as frações de 6 e 16kDa, já expressada durante a fase latente da infecção.

Os perfis (16-6), (26-6) (26-16) (26-38) foram comum entre contactantes e população geral. Entre os doadores de sangue 77/200 doadores de sangue apresentaram um destes padrões de reatividade. Se considerarmos que estes 77 indivíduos entraram em contato com *M. tuberculosis*, apresentando 5% de possibilidade de vir a desenvolver a doença ativa, teríamos quatro indivíduos em situação de risco. Este é exatamente o número de indivíduos que apresentaram o perfil completo de reatividade (38-16-6), quando analisados por western blotting, apesar de ter resultado ELISA TbF6/DPEP não reagente. (tabela 7).

Estudos anteriores sugerem que a resposta humoral possa ser preditiva para desenvolvimento de tuberculose ativa. Bhanthnagar et al (1977) mostraram que pacientes com resposta celular inadequada a antígenos de *M. tuberculosis* apresentam resposta humoral aumentada para o mesmo antígeno e David et al (1992), verificaram que 43% dos pacientes com resposta humoral intensa após a infecção desenvolveram tuberculose ativa. Associadas, essas evidências podem sugerir que resposta humoral aumentada para determinados antígenos pode ser indicar risco de futuro desenvolvimento de doença.

Em relação aos pacientes com tuberculose pulmonar que eram reativos apenas para a fração de 26kDa (tabela 5), 2/5 pacientes passaram a reconhecer a fração de 6kDa e/ou 16kDa na segunda amostra de soro analisada. Os outros três pacientes tiveram pesquisa de BK negativa, estando um deles recebendo tratamento para doença auto-imune, o que pode ter prejudicado a detecção da resposta humoral.

Além da importância em detectar casos de tuberculose latente, os testes diagnósticos enfrentam problemas com as reações cruzadas resultantes de infecções com outras micobactérias. Recentemente Grey et al (2002), chamaram a

atenção para o fato das proteínas ESAT-6 e CPF-10, clamadas como “específicas de *M. tuberculosis*” não serem na realidade encontradas exclusivamente nessa espécie de micobactéria, estando o gene para essas proteínas presentes também em outras micobactérias patogênicas (*M. africanum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, e *M. szulgai*) (BERTHET et al, 1998) e provavelmente em outras micobactérias ambientais, ainda não estudadas, o que poderia comprometer o uso dessas proteínas para auxílio diagnóstico, principalmente em países endêmicos. Porém, como respondido por Geluk et al (2002), muitos estudos realizados não detectaram resposta celular para estes antígenos em indivíduos controle (LALVANI et al, 2001) Da mesma forma, existe grande especificidade nas respostas encontradas para estes antígenos na pesquisa de *M. bovis* em bovinos, embora o gado entre em contato com inúmeras micobactérias não patogênicas (VORDERMEIER et al, 2002). Entre as micobactérias que portam o gene para esses antígenos, apenas infecções causadas por *M. marinum* e *M. kansasii*, poderiam induzir resposta a ESAT-6 e CPF-10, de forma a confundir o diagnóstico de infecção por *M. tuberculosis*. Contudo, apenas a infecção por *M. kansasii* seria problema no momento de um diagnóstico diferencial, por apresentar clínica semelhante. Sendo assim, o problema de usar tais antígenos em países endêmicos não seria prejudicado pela presença de micobactérias ambientais, mas sim pela presença de tuberculose latente na população estudada, devido à resposta encontrada em indivíduos recuperados ou contactantes, já citados neste trabalho.

Outros problemas no estudo de micobactérias ambientais são a dificuldade de ser cultivável pelos métodos microbiológicos disponíveis, serem consideradas não patogênicas ou ainda não existirem maneiras de quantificar o grau de exposição dos

indivíduos a estas micobactérias (AREND et al, 2002), impedindo assim o estudo da especificidade dos testes em relação ao contato com essas micobactérias.

Ao estudarmos o perfil de reatividade dos pacientes com infecção por *M. kansasii*, também encontramos semelhança com o perfil de reatividade encontrado nos pacientes com tuberculose pulmonar, principalmente quando analisada a segunda amostra de soro colhida ao segundo mês de tratamento. Essa reação cruzada, como citado no momento em que discutimos os resultados dos testes ELISA, apesar de não permitir diferenciar o agente causador da infecção, permite a instituição de tratamento precoce, beneficiando o paciente.

Em relação aos pacientes com tuberculose ganglionar, não foi possível determinar a presença de reatividade que caracterizasse a infecção por *M. tuberculosis*, provavelmente por menor estímulo da resposta humoral presente nesses pacientes.

6 – CONCLUSÕES

- 1- A associação de antígenos recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* (TbF6/DPEP), por apresentar sensibilidade de 86,3% e especificidade de 95%, mostrou-se útil na detecção de pacientes com tuberculose ativa mesmo em indivíduos paucibacilares com baciloscopia negativa.
- 2- A detecção de anticorpos específicos durante os seis meses de tratamento não foi capaz de mostrar a evolução para a cura, uma vez que não foi observada queda na reatividade aos antígenos estudados.
- 3- Em pacientes que soroconverteram no ELISA após o início do tratamento, a análise do perfil de reatividade no western blotting mostrou que a associação desses testes pode aumentar a sensibilidade da detecção de casos de tuberculose ativa.
- 4- Características radiológicas como presença de processo cavitário, mostraram ter relação apenas com a presença de reatividade ao antígeno de 38kDa no western blotting, não havendo relação significativa com resultados encontrados nos testes ELISAs.
- 5- A presença dos perfis de reatividade **1:** (38-26-16kDa); **2:**(38-26-6kDa), **3:** (38-26-16kDa) e **4:**(26-16-6kDa) em indivíduos assintomáticos poderia indicar um mau prognóstico da doença na tuberculose latente, uma vez que essas reatividades associadas não foram encontradas em soro de indivíduos saudáveis.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 6023. Informação e documentação – Referências- Elaboração Rio de Janeiro, ago.2000.

AGREWALA, J.N.; WILKINSON, R.J. Differential regulation of Th1 and Th2 cells by p91-110 and p21-40 peptides of the 16kDa α crystallin antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol*, v114, p. 392-397, 1998.

AGY, M.B.; WALLIS, C.K.; FLORDE, J.J.; CARLSON, L.C.; COYLE, M.B. Evaluation of four mycobacterial blood culture media: Bactec13A, Isolator/Bactec 12B, Isolator/Middlebrook Agar and a Biphasic Medium. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.12, p. 303-308, 1989.

AL- HAJJAJ, M.S.; GAD-EL-RAB, M.O.; AL-ORAINY I.O.; AL-KASSIMI F.A. Improved sensitivity for detection of tuberculosis cases by a modified Anda-TB ELISA test. *Tuberc and Lung Dis*, v.79 n.3, p. 181-185, 1999.

ANDERSEN, P. The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology*, v.191, p. 537-547, 1994.

ANDERSEN, P. and HERON, I. Simultaneous electro elution of whole SDS-Poliacrylamide gels for the direct cellular analysis of complex protein mixtures. *J.Immunol Methods*, v.161, p.29-39, 1993.

ANTUNES, A.; NINA, J.; DAVID, S. Serological screening for tuberculosis in the community: an evaluation of the Mycodot procedure in African population with high HIV-2 prevalence (Republic of Guinea Bissau). *Res Microbiol*, v.153, p. 301-305, 2002.

AREND, S.M.; OTTENHOFF, T.H.M.; ANDERSEN, P.; DISSEL, J.T.V. Uncommon presentations of tuberculosis: the potential value of a novel diagnostic assay based on *the Mycobacterium tuberculosis*- specific antigens ESAT-6 and CPF-10. *Int J. Tuberc Lung Dis*, v. 5, n.7, p.680-686, 2001.

AREND, S.M.; ANDERSEN, P.; VAN MEIJAARDEN, K.E.; SKJOT, R.L.; SUBRINTO, W.; VAN DISSEL, J.T.; OTTENHOFF, T.H.M. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6kDa protein and culture filtrate protein 10. *J. Infect. Dis*, v.181, p. 1850-1854, 2000.

AREND, S.M.; VAN MEIJGAARDEN, K.E.; BOER, K.; CERDÁ DE PALOU, E.; VAN SOOLINGEN, D.; OTTENHOFF T.H.M.; VAN DISSEL, J.T. Tuberculin Skin Testing and In Vitro T Cell Responses to ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 after Infection with *Mycobacterium marinum* or *M. Kansasi*. *J. Infect. Dis*, v.186, p. 1797-1807, 2002.

ARLOING, S. Agglutination de bacille de la tuberculose vraie. *Comp.Rend. Acad. Scie.*, v.126, p.1398-1400, 1898.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 10520** Informação e documentação – Apresentação de citações em documentos – Rio de Janeiro: ABNT ago.2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 14724**. Informação e documentação – Trabalhos Acadêmicos – Apresentação. Rio de Janeiro, ago.2000.

BALESTRINO, E.A.; DANIEL, T.M.; DE LATINI, M.D.S.; LATINI, O.A.M.A.Y.; SCOCOZZA, J.B. Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull WHO*, v.62, p.755-61, 1984.

BARNES, P.F.; MEHRA V.; RIVOIRE B.; FONG, S.J.; BRENNAN, P.J.; VOEGTLINE, M.S.; MINDEN, P.; HOUGHTEN, F.A.; BLOOM, B.R. and MODLIN, R.L. Immunoreactivity of a 10kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol*, v.148, p.1835-1840, 1992.

BARRETO, A.M.W.; CAMPOS, C.E.D. Micobactérias “não tuberculosas” no Brasil – *B. pneum. San.*, v.8, n.1, p. 23-30, 2000.

BASSEY, E.O.E.; CATTY,D.; KUMARARATNE, D.S.; RAYKENDALIA,C. Candidates antigens for improved serodiagnosis of tuberculosis , *Tuber Lung Dis* v.77, p.136-145, 1996.

BATES, J.H.; STEAD, W.W. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin. North Am.* V.77, p. 1205-1217, 1993.

BECK, S.T.; LEITE, O. M. ; ARRUDA, R. S.; FERREIRA, A.W. Western Blot analysis of the humoral response against low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in patients and contacts. (submetido).

BEHR, M.A.; WARREN, A.S.; SALAMON, H.; HOPEWELL, P.C.; PONCE DE LEON, A.; DALEY, C.L.; SMALL, P.M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*, 353(9151): 444-449, 1999.

BERLIE, H.C.; PETIT, J.C.; DAVID, H.L. Use of the SL-IV and PGL-tb1 glycolipid antigens in ELISA for the diagnosis of tuberculosis in AIDS patients. *Int.J. Med. Microbiol*, v. 275, p.351-357,1991.

BERTHET, F.X.; RASMUSSEN, P.B.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P. and GICQUEL, B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel Low –molecular mass culture filtrate protein (CPF-10). *Microbiol*, v. 144, p.3195-3203, 1998.

BHATTACHARYA, A.; RANADIVE, S.N.; KALE, M.; BHATTACHARYA, S. Antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of immune complexes in clinical tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, v.134, p. 205-209, 1986.

BHANTNAGAR, R.; MALAVIYA, A.N.; NARAYANAN,S.; RAJGOPALAN,P.; KUMAR,R.; BHARADWAJ,O.P. Spectrum of immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* ,v.115, p.207-212, 1977.

BIGNALL, J.R. – Tuberculosis in England and Wales in the Next 20 years *Post grad Med J*, v.47, p. 759-762, 1971.

BOTHAMLEY, G.H.; BECK, J.S.; SCHREUDER, G.M.T.; D'AMARO, J.; VRIES, R.R.P.; KARDJITO, T.; IVANYI, J. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis* specific antibody levels with HLA . *J. Infect. Dis*, v.159, p.549-555, 1989.

BOTHAMLEY G.; RUDD R.; FESTENSTEIN F.; IVANYI, J. Antibody levels to *Mycobacterium tuberculosis* during treatment of smear-positive tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis* , v.141, p. 805, 1990.

BOTHAMLEY G.; RUDD R.; FESTENSTEIN F.; IVANYI, J. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis, *Thorax*, v.47, p.270-275, 1992.

BOTHAMLEY G.H.; RUDD R.M. Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J*, v.7, n.2, p.240-246, 1994.

BOTHAMLEY, G.H. Serological diagnoses of tuberculosis . *Eur Respir J*, v.8, , p. 676-688 , 1995. Supplementum 20

BRADLEY, S.P.; REED, S.L.; CATANZARO, A. Clinical efficacy of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am J. Respir Crit Care Med*, v.153, p. 1606-1610, 1996.

BROCK, I.; MUNK, M.E.; KOK-JENSEN, A.; ANDERSEN, P. Performance of whole blood IFN- γ test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CPF-10. *Int J. Tuberc Lung Dis*, v.5, n.5, p.462-467, 2001.

CACCAMO, N.; MILANO S.; DI SANO, C.; CIGNA D.; IVANYI J.; KRENSKY A.M.; DIELI F.; SALERNO A. Identification of Epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* 16kDa Protein Recognized by Human Leukocyte Antigen – A*0201 CD8+ T Lymphocytes. *J. Infect. Dis.*, 186: 991-998, 2002.

CAMPOS, H.S. Manejo da doença micobacteriana não-tuberculosa. *B. Pneum. San.* V.8, n. 2, 2000.

CANTANZARO, A.; DAVISON, B.L.; FUJIWARA, P.I.; GOLDBERGER, M.J.; GORDIN, F.; SALFINGER, M.; SBARBARO, J.; SCHUGER, N.W.; SIERRA, M.F.; WOODS, G.L. Proceedings of the American Thoracic Society workshop, "Rapid diagnostic testes for tuberculosis: What is the appropriate use?". *Am J Respir Crit Care Med.*, v.155, p.1804-1814, 1997.

CARDOSO, F.L.L.; ANTAS, P.R.Z.; MILAGRES, A.S.; GELUK, A.; FRANKEN, K.L.M.C.; OLIVEIRA, E.B.; TEIXEIRA, H.C.; NOGUEIRA, A.S.; SARNO, E.N.; KLATSER, P.; OTTENHOFF, T.H.M.; SAMPAIO, E.P. T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis* – specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients. *Infect. Immun.*, v. 70, n.12, p. 6707-6714, 2002.

CHAN, E.D.; REVES, R.; BELISLE, J.T.; BRENNAN, P.J.; HAHN, W.E. Diagnosis of tuberculosis by a visually detectable immunoassay for lipoarabinomannan. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.161, n.5, p. 1713-1739, 2000.

CHANG, Z.; CHOUDHARY, A.; LATHIGRA, R. and QUICHO, F.A. The immunodominant 38kDa lipoprotein antigen of *M. tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J.Biol.Chem.*, v. 269, p.1956-1958, 1994.

CHAPMAN, A.L.; MUNKANTA, M.; WILKINSON, K.A.; PATHAN, A.A.; EWER, K.; AYLES, H.; REECE, W.H.; et al – Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*- specific T cells – *AIDS* v.16, n.17, p.2285-2293, 2002.

CLOSS, O.; HARBOE, M.; AXELSEN, N.H.; BUNCH-CHRISTENSEN, K.; MAGNUSSEN, M. The antigens of *Mycobacterium Bovis* BCG, studied by crossed immunoelectrophoreses: a reference system. *Scand J. Immunol.*, v.12, p.249-263, 1980.

COCITO, C.; VANLINDEN F. Preparation and properties of antigen 60 from *M. bovis* BCG. *Clin Exp Immunol*, v. 66, p.262-272, 1986.

COETSIER, C.; BAELDEN, M.C.; COENE, M.; COCITO, C. Immunological analysis of the components of the antigen complex A60 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.1, n.2, p. 139-144, 1994.

COLE, R.A.; LU, H.M.; SHI, Y.Z.; WANG, J.; DE-HUA, T.; ZHOU, A.T. Clinical evaluation of rapid immunochromatographic assay based on the 38kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* on patients with pulmonary tuberculosis in China. *Tuber Lung Dis.*, v. 77, n.4, p.363-368, 1996.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C.E. 3rd; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence *Nature* v.393, p. 537-544, 1998.

COLER, R. N.; SKEIKY, Y.A.; VEDVICK, T.S.; BEMENT, T.; OVENDALE, P.J.; CAMPOS NETO, A.; ALDERSON, M.R. and REED, S.G. Molecular cloning and immunologic reactivity of a novel low molecular mass antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, v.161, p.2356-2364, 1998.

CUNNINGHAM, A. e SPREADBURY, C. Mycobacterial stationary phase induce by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J. Bacteriol* v.180, p.801-808, 1998.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac” – SP, 2002 – Disponível em www.cve.saude.sp.gov.br/htm/tb/tb_cn02.htm. Acesso em dez 2003.

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

DANIEL, T.M.; ELLNER, J.J. Immunology of tuberculosis. In: Reichman LB, Hershfield ES, eds. **Tuberculosis: a comprehensive international approach**. New York: Marcel Dekker: pp 75-101, 1993.

DANIEL, T.M.; ELLNER, J.J.; TODD, L.S.; MCCOY, D.W.; PAYNE V.D.N., ANDERSON P. The Immunobiology and species distribution of M. Tuberculosis antigen 5. *Infect. Immun.* V.24, p.77-82, 1979.

DANIEL, T.M. and FERGUSNO, L.E. Purification and characterization of two proteins from culture filtrates of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. *Infect. Immun.*, v.1, p.164-168, 1970.

DANNENBER, A.M.J.R. and ROOK, G. in: _____ **Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control** (Blom, B.R. ed) pp459-483, ASM Press, 1994.

DAVID, H.L.; PAPA, F.; CRUAUD, P, BERLIE, H.C.; MAROJA, M.F.J; SALEM, J.I.; COSTA, M.F. Relationships between titer of antibodies immunoreacting against glycolipid antigens from *M. lepra* and *M. tuberculosis*, the Mitsuda and Mantoux reactions, and bacteriologic loads: implications in the pathogenesis, epidemiology and serodiagnosis of leprosy and tuberculosis. *Int J. Lepr Other Mycobact Dis* v.60, p.208-224, 1992.

DE BRUYN J.K.; HUYGEN, R.; BOSMANS, M.; FAUVILLE, R.; LIPPENS, JP; VAN VOOREN, P.; FALMAGNE, M.; WECKX, H.G.; WIKER, M.; HORBO, E. and TURNEER. Purification, characterization and identification of a 32 kDa protein antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microb. Pathog.* V.2, p.351-336, 1987.

DEMKOW, U.; ZIELONKA, T.M.; NOWAK-MISIAK, M.; FILEWSKA, M.; BIALAS, B.; STRZALKOWSKI, J.; RAPALA, K.; ZWOLSKA, Z.; SKOPINSKA-ROZEWSKA, E. Humoral immune response against 38-kDa and 16kDa mycobacterial antigens in bone and joint tuberculosis. *Int J. Tuberc Lung Dis*, v.6, n.11, p.1023-1028, 2002.

DILLON, D.C.; ALDERSON, M.R.; DAY, C.H.; BEMENT, T.; CAMPOS-NETO, A.; SKEIKY, Y. A. W.; VEDVICK, T.; BADARÓ, R.; REED, S.G.; HOUGHTON, R. Molecular and Immunological Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, and Immunodiagnostic Antigen Missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Clin Microbiol* v. 38, n.9, p. 3285-3290, 2000.

DOHERTY, T.M.; DEMISSIE, A.; OLOBO, J.; WOLDAY, D.; BRITTON, S.; EGUALE, T.; RAVN, P.; ANDERSEN, P. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis* – specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J. Clin. Microbiol.* V.40, n.2, p.704-706, 2002.

DOLBERG, O.F.; SCLAEFFER, F.; GREENE, V.W.; ALKAN, M.L. Extrapulmonary tuberculosis in an immigrant society: clinical and demographic aspects of 92 cases. *Rev. Infect. Dis*, v.13, p. 177-179, 1991.

DUNLAP, N.E.; BASS, J.; FUJIWARA, P.; HOPEWELL, P.; HORSHBURG, C.R.; SIMONE P.M. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.161, p. 1376-1395, 2000.

EISENSTEIN, B.I. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N. Engl J Méd.*, v.322, p.178-182, 1990.

ENGVALL, E. and PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, III: quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol* v.109, p.129-135, 1972.

ESPITIA, C., CERVERA, I.; MANCILLA, R. The antigenic structure of *Mycobacterium tuberculosis* examined by immunoblot and ELISA. Influence of the age of the culture and the obtaining method on the composition of the antigenic extract. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, v.22, p. 101-107, 1991.

ESPITIA, C.; ELINOS, M.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; MANCILLA, R. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38kDa protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect Immun.*, v.60, p. 2998-3001, 1992.

FOOD and DRUG ADMINISTRATION -Center for Devices and Radiological Health. QuantiFERON® -TB 2002. Disponível em : <http://www.fda.gov/cdrh/pdf/P010033b.pdf>. Acesso em: 12 maio 2003

FRANCO, J.; CAMARENA, J.J.; NOGUEIRA, J.M.; BLANQUER, R.; RUIZ, M.J.; MARIN, J. Serological response (Western blot) to fractions of *Mycobacterium tuberculosis* sonicate antigen in tuberculosis patients and contacts. *Int J Tuberc Lung Dis.*, v.5, n.10, p. 958-962, 2001.

FUKUI, Y.; HIRAI, T.; UCHIDA, T. and YONEDA, M. Extracelular proteins of tubercle bacilli. IV. Alpha and beta antigens as major extra cellular protein products and as cellular components of a strain (H37rv) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biken J.*, v. 8, p.189-199, 1985.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA- Guia de Vigilância Epidemiológica, 1999/2000. - Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/qve/pdf/qve0534.pdf>> Acesso em: 19 ago. 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA Boletim eletrônico Epidemiológico da Saúde– número 1-1998.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA Boletim eletrônico Epidemiológico – número 2- 2002. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/pub00.htm#>>. Acesso em: 19 ago 2003.

GREY VAN PITTIUS N.C.; WARREN, R.M.; VAN HELDEN, P.D. ESAT –6 and CPF-10: What is the Diagnosis? *Infect. Immun.*, v.70, n.11, p. 6509-6511, 2002.

GELUK, A.; OTTENHOFF, T.H.M.; AREND, S.M.; ANDERSEN, P. Authors' reply to ESAT – 6 and CPF-10: What is the Diagnosis? *Infect. Immun.*, v. 70, n.11, p. 6509-6511, 2002.

GOTO, M.; OKA, S.O.; OKUZUMI, K.; KIMURA, S.; SHIMADA, K. Evaluation of acridinium éster labelled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *J. Clin Microbiol.*, v. 29, p.2473-2476, 1992.

GRANGE, J.M. The humoral immune response in tuberculosis: its nature, biological role and diagnostic usefulness. *Adv Tuberc.Res.*, v.21, p.1-78, 1984.

GUPTA, S.; KUMARI, S.; BANWALIKAR, J.N.; GUPTA, S.K. Diagnostic utility of the estimation of mycobacterial antigen A60 specific immunoglobulins IgM, IgA, IgG in the sera of cases of adult human tuberculosis. *Tuberc and Lung Dis*, v.76, p. 418-424, 1995.

HAILE, Y.; BJUNE, G.; WIKER, H.G. Expression of the mce-A, esat-6 and hspX genes in *Mycobacterium tuberculosis* and their responses to aerobic conditions and to restricted oxygen supply. *Microbiol.*, v.148, n.12, p.3881-3886, 2002.

HARBOE, M. Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studied by crossed immunoelectrophoresis. *Am Rev Respir Dis*, v.124, p.80-87, 1981.

HARBOE, M.; OETTINGER, T.; WIKER, H.G.; ROSENKRANDS, I. and ANDERSEN, P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *M. tuberculosis* and virulent *M. bovis* and for its absence in *M. bovis* BCG. *Infect Immunol*, v.64, p.16-22, 1996.

HARRINGTON, J.J. 3rd; HO, J.L.; LAPA e SILVA, J.R.; CONDE, M.B.; KRITSKI, A.L.; FONSECA, L.S.; SAAD, M.H. *Mycobacterium tuberculosis* lipid antigens: use of multi-antigen based enzyme immunoassay for free and complex dissociated antibodies. *Int J Tuberc Lung Dis*, v.4, n.2, p. 161-167, 2000.

HEINZEL, A.S.; GROTZKE, J.E.; LINES, R.A.; LEWINSOHN, D.A.; MCNABB, A.L.; STREBLOW, D.N.; BRAUD, V.M.; GRIESER, H.J.; BELISLE, J.T.; LEWINSOHN, D.M. HLA-E dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8+ T cells. *J. Exp Med*, v.196, n. 11, p. 1473-1481, 2002.

HELLYER, T.J.; FLETSCHER, T.W.; BATES, J.H.; STEAD, W.W.; TEMPLETON, G.L.; CAVE, M.D.; EISENACH, K.D. Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. *J. Infect Dis*; v.173, p.934-941, 1996.

HENDRICKSON, R.C.; DOUGLASS, J.F.; REYNOLDS, L.D.; MCNEILL, P.D.; CARTER, D.; REED, S.G.; HOUGHTON, R.L. Mass Spectrometric Identification of Mtb81, a Novel Serological Marker for Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*, v.38, n.6, p. 2354-2361, 2000.

HIRSCH, C.S.; ELLNER, J.J.; RUSEL, D.G.; RICH, E.A. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha mediated growth inhibition of *M. tuberculosis* by human alveolar macrophage. *J. Immunol*, v.152, p.743-753, 1994.

HIJJAR, M.A.; PROCOPIO, M.J.; OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA, G.M. – A tuberculose no Brasil e no mundo. *Boletim de Pneumologia Sanitária* v.9, n.2, p.9-16, 2001. Disponível em: <www.tunasa.gov.br/pub/bps/pdfs/vol9_n2/bps92096.pdf> acesso em 07/dez/2003.

HOBBY, G.L.; HOLMAN, A.P.; ISEMAN, M.D.; JONES, J.M. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob. Agents chemother*, v. 4, p.94-104, 1973.

HOEPPNER, V.H.; JACKETT, P.S.; BECK S.J.; KARDJITO T.; GRANGE, M.J.; IVANYI, J. Appraisal of the monoclonal antibody-based competition test for the serology of tuberculosis in Indonesia. *Serodiagn. Immunother*, v.1, p. 69-77, 1987.

HOPEWELL, P.C. Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology clinical features, management, and control of tuberculosis. *Com Infect Dis*, v. 15, p.540-547, 1992.

HOUGHTON, R.L.; LODES, M.J.; DILLON, D.C.; REYNOLDS, L.D.; DAY, C.H.; McNEILL, P.D.; HENDRICKSON, R.C.; SKEIKY, Y.A.; SAMPAIO, D.P.; BADAROJ, R.; LYASHCHENKO, K.P.; REED, S.G. The use of Multiepitope polyproteins in the serodiagnosis of active Tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 9, n.4, p. 883-891, 2002.

HUEBNER, R.E.; SCHEIN, M.F.; BASS, J.B. The tuberculin skin test. *Clin. Infect. Dis.*, v.17, p. 968-975, 1993.

IMAZ, M.S.; ZERBINI, E. Antibody response to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* during and after treatment of tuberculosis patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.4, n.6, p. 562-569, 2000.

IMAZ, M.S.; COMINI, M.A.; ZERBINI, E.; SEQUEIRA, M.D.; SPOLETTI, M.J.; ETCHART, A.A.; PAGANO, H.J.; BONIFASICH, E.; DIAZ, N.; CLAUS, J.D.; SINGH, M. Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM and IgA antibodies to the recombinant 16-kilodalton antigen of mycobacterium tuberculosis in childhood tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v. 5, n.11, p.1036-1043, 2001.

JACKETT, P.S.; BOTHAMLEY, G.H.; BATRA, H.V.; MISTRY, A.; YOUNG, D.B.; IVANYI, J.- Specificity of antibodies to immunodominant antigens in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, p.2313-2318, 1988.

JULIAN, E.; MATAS, L.; PEREZ, A.; ALCAIDE, J.; LANÉELLE, M.A.; LUQUIN, M. Serodiagnosis of Tuberculosis: comparison of Immunoglobulin A (IgA) Response to Sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3- Diacyltrehalose, 2,3,6- Triacyltrehalose, and Cord Factor antigens . *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.10, p.3782-3788, 2002.

KADIVAL, G.V.; KAMESWARAN, M.; DOSHI, R.; TODIWALA, S. S.; SAMUEL, A. M. Detection of antibodies to defined *M. tuberculosis* antigen (38kDa) in cerebrospinal fluids of patients with tuberculous meningitis. *Zentralblatt Bakteriologie*, v.281, p. 95-101, 1994.

KAPLAN, M.H.; CHASE, M.W. Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. Development of antibodies before and after antimicrobial therapy. *J. Infect. Dis* v.142, p. 825-834, 1980.

KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular bacterial. *Ann. Ver. Immunol.*, v.11, p. 129-163, 1993.

KAUL K. Molecular Detection of *Mycobacterium tuberculosis*: Impact on Patient Care. *Clin. Chem.*, v.47, n.8, p. 1553-1558, 2001.

KINDLER, V.; SAPPINO, A.P.; GRAU, G.E.; PEQUET, P.F.; VASSALLI, P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*, v.56, p.731-740, 1989.

KOCH R. Die Aetiologie der Tuberculose. *Berl Klin Wochenschr*, v.19, p. 221-230, 1882.

KOLLEF, M.H.; SCHUSTER, D.P. Predicting intensive care unit outcome with scoring systems. Underlying concepts and principles. *Crit. Care Clin.*, v.10, p. 1-18, 1994.

KRITSKI, A.L.; RUFFINO-NETO, A. Health sector reform in Brazil: impact on tuberculosis control. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* .v. 4, p. 622-626, 2000.

KRITSKI, A.L.; ROSSETTI, M.L.; BONFIM, G.; CASTELO, A.; MELLO, F.C.Q. Reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico da tuberculose – *J. pneum.*, v.23, n.1, 1997.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.; MUZY DE SOUZA, G. **Tuberculose do ambulatório à enfermaria** 2ª Ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2000.

LAAL, S.; SAMANICH, K. M.; SONNENBERG, M.G.; ZOLLA-PAZNER, S.; PHADTARE, J.M.; BESISLE, J. Human Humoral Responses to Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: Immunodominance of High-Molecular-Mass Antigens. *Clin. Diagn Lab. Immunol*, v.4, n.1, p. 49-56, 1997.

LALVANI, A.; PATHAN A.A.; DURKAN, H.; WILKINSON, K.A.; WHELAN, A.; DEEKS, J.J.; REECE, W.H.; LATIF, M.; PASVOL, G.; HILL, A.V. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet*, v.357, p.2017-2021, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.226, p. 680-685, 1970.

LEE, E.; HOLZMAN, R.S. Evolution and current use of the tuberculin Test. *Clin. Infect. Dis.*, v.34, p.365-370, 2002.

LEITE, O.M. In: FERREIRA A. W., ÁVILA S L. M. **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-Imunes**. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A– capítulo 20:- 221-229. – 2001.

LODES, M.J.; DILLON, D.C.; MOHAMATH, R.; DAY, C.H.; BENSON, D.R.; REYNOLDS, L.D.; MCNEILL, P.; SAMPAIO, D.P.; SKEIKY, Y.A., BADARO, R.; PERSING, D.H.; REED, S.G.; HOUGHTON, R.L. Serological expression Cloning and Immunological Evaluation of MTB 48, a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Antigen. *J. Clin. Microbiology*, v. 39, n.7, p. 2485-2493, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, D.; FARR, C.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biochem.*, v.193, p. 265-275, 1981.

LYASHCHENKO, K.; SINGH, M.; COLANGELI, R.; GENNARO, M.L. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious disease. **J. Immun. Meth.** , v.242, p. 91-100, 2000.

LYASHCHENKO, K.; COLANGELI, R.; HOUDE, M.; JAHDALI, H.Á.; MENZIES, D.; GENNARO, M.L. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. **Infect. Immun.**, v.66, p. 3936-3940, 1998.

Mac VANDIVIERE, H.; LORING, W.E.; MELVIN, I.; WILLIS, S. The treated pulmonary lesion and its tubercle bacillus. II The death and resurrection. **Am. J. Med. Sci.**, July: p. 31-37, 1956.

MAEKURA, R.; NAKAGAWA, M.; NAKAMURA, Y.; HIRAGA, T.; YAMAMURA, Y.; ITO, M.; UEDA, E.; YANO, S.; HE, H.; OKA, S. Clinical evaluation of rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis by ELISA with cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) as antigen purified from *Mycobacterium tuberculosis*. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.148 n.4, p.997-1001, 1993.

MAEKURA, R.; OKUDA, Y.; NAKAGAWA, M.; HIRAGA, T.; YOKOTA, S.; ITO, M.; KOHNO, H. Clinical Evaluation of anti-tuberculous glycolipid Immunoglobulin G antibody assay for rapid serodiagnosis of Pulmonary tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** , v.39, n.10, p.3603-3608, 2001.

MAHER, D. e RAVIGLIONE, M.C. The global epidemic of tuberculosis: a World Health Organization perspective. In: Schollossber, F. **Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections**. W.B. Saunders company USA, p 4856, 1999.

MANCA, C.; LYASHCHENKO, K.; WIKER, H.G.; USAI, D.; COLANGELI, R.; GENNARO, M.C. Molecular Cloning, Purification and serological Characterization of MPT63, a Novel Antigen Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**,v.65, n.1, p. 16-23, 1997.

MANZANO, J.R.; MANTEROLA, J.M; AUSINA, V.; SAURET, J. Nomenclatura y clasificación de las micobacterias. **Arch Bcopneumol.** , v. 34, p.154-157, 1998.

MEHRA, V.; BLOOM, B.R.; BAJARDI, A.C.; GRISSO, C.L.; SIELING, P.A.; ALLAND, D.; CONVIT, J.; FAN, X.D.; HUNTER, S.W. and BRENNAN, P.J. A major T Cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10kDa heat-shock cognate protein. **Exp. Méd.**, v. 175, p.274-284, 1992.

MENZIES D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. **Am. J. Respir. Crit. Care med.**, v.159, p. 15-21,1999.

MENZIES R.; VISSANDJEE, B. Effect of bacilli Calmette-Guerin vaccination on tuberculin reactivity. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.145, p.621-625, 1992.

MERRIL, C.R., GOLDMAN G.; VAN KAUREN, M.L. Gel protein stains: silver stain. **Methods Enzymol.** ,v.104, p. 441-447, 1984.

MISAKI A.; AZUMA, I.; YAMAMURA, Y. Structural and immunochemical studies on D-arabino-D-mannans of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterium species . **J. Biochem.** V.82, p. 1759-1770, 1977.

MONTENEGRO, S.H.; GILMAN, R.H.; SHEEN, P.; CAMA, R.; CAVIEDES, L.; HOPPER, T.; CHAMBERS, R.; OBERHELMAN, R.A. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian children by use of a heminested ISA6110 polymerase chain reaction assay. **Clin. Infect. Dis.**, v.36, n.1, p.16-23, 2003.

MUNK, M.E.; EMOTO, M. Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. **Eur. Respir. J.**, v.8 , n20s, p.668s-675s, 1995.

MUSSER, J.M.; AMIN, A.; RAMASWAMY, S. Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. **Genetics** , v.155, p. 7-16, 2000.

MUSTAFA, A.S. HLA restricted immune response to mycobacterial antigens: relevance to vaccine design. **Hum. Immunol.**,v. 61, n.2, p. 166-171, 2000.

NANCY, E.; DUNLAP, N.E.; BASS, J.; FUJIWARA, P.; HOPEWELL, P.; HORBURGH, C.R.; SALFINGER, M.; SIMONE, P.M. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children . **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.161, p.1376-1395, 2000.

NASSAU, E.; PARSONS, E.R.; JOHNSON, G.D. The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate and enzyme-linked immunosorbent assay. **Tubercle**, v.57, p.67-70, 1976.

ORME, I.M. The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis .**Trends Microbiol.**, v.6, n.3, p. 94-97, 1998.

ORME, I.M. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one) **Int. J. Tuberc. Lung Dis.** , v.5, n.7, p. 589-593, 2001.

PARRISH, N.M.; DICK, J.D.; and. BISHAI, W.R. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol.**, v.6, n.3, p. 107-112, 1998.

PERKINS, M.D.; CONDE, M.B.; MARTINS, M.; KRITSKI, A.L. Serologic diagnosis of tuberculosis using a simple commercial multiantigen assay. **Chest**, v.123, n.1, p.107-112, 2003.

PFYFFER, G.G.; KISSLING, P.; JAHN, E.M.I.; WELSCHER, H.M.; SALFINGER, M.; WEBER, R. Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p. 834-837, 1996.

POTTUMARTHY, S., WELLS, V.C., MORRIS, A.J. A comparison of Seven Tests for Serological Diagnosis of Tuberculosis . *J. Clin. Microbiol.*, v.38, n.6, p. 2227-2231, 2000.

RAVAGLIONE, M.C.; SNIDER, D.; KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*, v.273, p.220-226, 1995.

ROJAS-ESPINOSA, O.; RANGEL-MORENO, J.; AMADOR-JIMENEZ, A.; PARRA-MALDONADO, R.; ALCE-PAREDES, P.; TORRES-LOPES, J. Secretion Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: A Comparison Between a Reference Strain and Seven Wild isolates. *Arch. Med. Res.*, v.30, p.171-178, 1999.

ROOK, G.A.W.; ROGELIO HERNANDEZ-PANDO The Pathogenesis of Tuberculosis. *Ann.Ver. Microbiol*, v.50, p.259-284, 1996.

ROVATTI, E.; CORRADI, M.P.; AMICOSANTE, M.; TARTONE, P.L.; PANINI, W.; ANCORA, A.; CENCI, A.M.; ZUCCHI, L.; MONNO, L.; ANGARANO, G.; SATINI, C. Evaluation of Western Blot serum test for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Eur. Respir. J.*, v. 9, p.288-292, 1996.

RUFINO-NETTO, A.. Programa de Controle da Tuberculose no Brasil: Situação atual e Novas perspectivas . *Informe Epidemiológico do SUS*, v.10, n.3, p. 129-138,2001.

RUTTIMANN E.U. Statistical approaches to development and validation of predictive instruments. *Crit. Care Clin.*, v.10, p.19-35, 1994.

SADA, E.; BRENNAN, P.J.; HERRAR, T.; TORRES, M. Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 28, n.12, p.2587-2590, 1990.

SAAD, M.H.F.; KRITSKI, A.L.; WERNECK-BARROSO, E.; CAVALCANTE, S.; FERREIRA, M.A.S.; FONSECA, L.S. Use of the 2-3- Diacyl-trehalose and the Purified Protein Derivative in the Serodiagnosis of Tuberculosis in AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.91, n.1, p. 97-100, 1996.

SAMANICH, K.; BELISLE, J.T.; LAAL, S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect. Immun.*, v. 69, n.7, p. 4600-4609, 2001.

SBPT- Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia , 1998 – Disponível em <http://www.sbpt.org.br/leigos/csnovostb_98.htm> Acesso em dez 2003.

SCHULUGER, N.W.; LOMMEU, D.; HARKIN, T.J.; ROM, W.N. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest*, v.105, p.1116-1121, 1994.

SIEBERT, F.B.; GLEN, J.T. Tuberculin purified protein derivative: preparation and analyses of a large quantity for standard. *Am Rev. Tuberc.*, v. 44, p. 9-24, 1941.

SIMONNEY, N.; BOURRILLON, A.; LANGRANGE, P.H. Analysis of circulating immune complexes (CICs) in childhood tuberculosis: levels of specific antibodies to glycolipid antigens and relationship with serum antibodies. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.4, p. 152-160, 2000.

SIMONNEY, N.; MOLINA, J.M.; MOLIMARD, M.; OKSENHENDLER, E.; LANGREANGE, P.H. Circulating immune complexes in human tuberculosis sera: demonstration of specific antibodies against *M.tuberculosis* glycolipid (DAT,PGLTb1, LOS) antigen in isolated circulating immune complexes. *Eur J. Clin. Invest.*, v.27, p.128-34,1997.

SKJØT, R.L.V.; AGGER, E.M.; ANDERSEN, P. Antigen Discovery and tuberculosis vaccine development in the post-genomic era. *Scand. J. Infect Dis.*, v.33, p.643-647, 2001.

SKJØT, R.L.V.; OETTINGER, T.; ROSENKRANDS, I.; RAVN, P.; BROCK, I.; JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. Comparative evaluation of low-molecular mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-Cell antigens. *Infect. Immun.*, v.68, n.1, p. 214-220, 2000.

SOMI, G.R.; BRIEN, R.J.; MFINANGA, G.S.; IPUGE, Y.A. Evaluation of the MycoDot test in patients with suspected tuberculosis in a field setting in Tanzania. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.3, n.3, p. 231-238, 1999.

SORENSEN, A.L.; NAGAI, S.; HOUEN, G.; ANDERSEN, P.; ANDERSEN, A.B. Purification and Characterization of a Low-Molecular-Mass T-Cell Antigen Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.*, v 63, n. 5, p.1710-1717, 1995.

TABIRA, Y.; OHARA, N.; OHARA, N.; KITAURA, H.; MATSUMOTO, S.; NAITO, M.; YAMADA, T. The 16kDa alpha-crystallin-like protein of *Mycobacterium bovis* BCG is produced under conditions of oxygen deficiency and is associated with ribosomes. *Res Microbiol.*, v.149, p. 255-264, 1998.

TOWBIN, H., T. STAHELIN, J. GORDON. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Sci USA*.v.76: p.4350-4354, 1979.

TOZETTO- MENDONZA, T. - **Estudo do Perfil sorológico de populações expostas a diferentes situações epidemiológicas de Malária no Brasil 1997**, 114f. (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – SP- 1997.

ULRICH, T.; MUNK, M.E.; MOLLENKOPF, H.; BEHR-PERST, S.; COLANGELI, R.; GENARO, M.L.; KAUFMANN, H.E. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur. J. Immunol.*, v.28, p. 3949-3958, 1998.

VEKEMANS, J.; LIENHARDT, C.; SILLAH, J.S.; WHEELER, J.G.; LAHAI, G.P.; DOHERTY, M.T.; CORRAH, T.; ANDERSEN, P.; MCADAM, K.P.W.J.; MARCHANT, A. Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in the Gambia. *Infect. Immun.*, v.69, n.10, p. 6554-6557, 2001.

VERBON, A.; KUIJPER, S.; JANSEN, H.M.; SPEELMAN, P.; KOLK, A.H.J. Antigens in culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis*: epitopes defined by monoclonal and human antibodies. *J. Gen. Microbiol.*, v.136, p.995-964, 1990.

VERBON, A. Development of a serological test for tuberculosis. *Trop. Geog. Med.*, v. 46, p. 275-279, 1994.

VERBON, A.; HARTSKEERL, R.A.; SCHUITEMA, A.; KOLK, A.H.J.; YOUNG, D.B.; LATHRIGRA, R. The 14,000 molecular weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystalline family of low molecular weight heat shock proteins. *J. Bacteriol.*, v.174, p. 1352-1359, 1992a.

VERBON, A.; HARTSKEERL, R.A.; MORENO, C.; KOLK, A.H.J. Characterization of B cell epitopes on the 16 K antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 89, p. 395-401, 1992b.

VILLEMIN J. A. 1865, In: Rubin, S.A. – Tuberculosis – Captain of all these men of deaths. *Radiol. Clin. North Am.*, v.33, p.619-639, 1995.

VOLDERMEIER, H.M.; CHAMBERS, M.A.; COCKLE, P.J.; WHELAN, A.O.; SIMMONS, J.; HEWINSON, R.G. Correlation of ESAT-6 specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.*, v.70, p.3026-3032, 2002.

WADEE, A.A.; COHEN, J.; RABSON, R.A. An enzyme-linked immunosorbent assay using adsorbed mycobacterial sonicates for the serodiagnosis of tuberculosis. *S. Afr. Med. J.*, v.71, p.154-156, 1987.

WAYNE, L.G. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.13, p. 908,914, 1994.

WAYNE, L.G.; DIAZ, G.A. Autolysis and secondary growth of *Mycobacterium tuberculosis* in submerged culture. *J. Bacteriol.*, v.93, p. 1374-1381, 1967.

WEBB, J.R.; VEDVICK, T.S.; ALDERSEN, M.R.; GUEDERIAN, J.Á.; JEN, S.S.; OVENDALE, P.J.; JONHSON, S.M.; REED, S.G.; SKEIKY, Y.A. Molecular cloning, expression, and immunogenicity of MTB12, a novel low molecular weight antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, v.66, p. 4208-4214, 1998.

WEIR, M.R.; THORNTON, G.F. Extrapulmonary tuberculosis: experience of a community hospital and review of the literature. *Am. J. Med.*, v.79, p. 467-478, 1985.

WHO (1995) DOTS stops TB at the source: Who report on the tuberculosis epidemic. Geneva: World Health Organization. Amsterdam Disponível em: <http://www.stoptb.org/conference/Decla.access.html>. Acesso em: 20 mai. 2003

WHO-(2000). Fifty-third World Health Assembly. Stop Tuberculosis Initiative, Report by the Director-General A53/5, 5 may 2000; Resolution WHA53.1 May Disponível em <http://www.who.int/wha_1998/WHOO/PDF/ea5.pdf>. Acesso em: Acesso em 10 mar. 2003

WHO/CDS/2000- 275 World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO report 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/gtb/publications/globrep01/index.html>>. Acesso em: 19 ago. 2003

WHO CDS TB 99.269 Disponível em <http://www.who.int/gtb/publications/healthcare/PDF/WHO99.269.pdf>. Acesso em 12 mar. 2003

WHO/TB 2000. Mimeo-Working paper prepared for WHO/TDR Consultation Meeting on "Diagnosis of Tuberculosis: Countdown to New Tools" Disponível em <<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/tbdiagnostics-exsumm.pdf>>. Acesso em 29 ago. 2003.

WIKER, H.G. Liberation of Soluble Proteins from Live and Dead Mycobacterial Cell and the Implications for Pathogenicity of Tubercle Bacilli. *Scand. J. Immunol.*, v. 54, p. 82-86-2001.

WIKER, H.G.; NAGAI, S.; HARBOE, M.; LJUNGQVIST, L. A family of cross reacting proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.*, v.36, p.307-319, 1992.

WIKER, H.G.; HARBOE, M.; NAGAI, S.A. Localization index for distinction between extra cellular and intracellular antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Gen. Microbiol.*, v.137, p. 875-874, 1991.

WIKER, H.G.; HARBOE, M.; LEA, T.E. Purification and characterization of two protein antigens from the heterogeneous BCG 85 complex in *Mycobacterium bovis* BCG. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v.81, p. 298-306, 1986.

- WIKER, H.G.; HARBOE, M.; BENNEDSEN, J.; CLOSS, O. The antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, H37Rv, studied by crossed immunoelectrophoresis. Comparison with a reference system for *Mycobacterium bovis*, BCG. *Scand. J Immunol.*, v.27, p. 223-239, 1988.
- WILKINS, E.G.L.; BOTHAMLEY, G.; JACKETT, P. A rapid, simple enzyme immunoassay for detection of antibody to individual epitopes in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.10, n.7, p. 559-63, 1991.
- WILKINS, E.G.L.; IVANYI, J. Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet*, v.336, p.641-644, 1990.
- WILKINSON, R.J.; HASLOV, K.; RAPPUOLI, R.; GIOVANNONI, F.; NARAYANAN, P.R.; DESAI, C.R.; VORDERMEIER, H.M.; PAULSEN, J.; PASVOL, G.; IVANYI, J.; SINGH, M. Evaluation of the Recombinant 38kDa Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a Potential Immunodiagnostic Reagent. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.3, p. 553-557, 1997.
- WILSON, M.B. & NAKANE, P.K. Recent developments in periodate antibodies. In: W. Kanpp, W.; Holubar, K.; Wick, G. – Immunofluorescence and related staining techniques – Amsterdam, Elsevier, p. 215-224, 1978.
- WU-HSIEH, A.B.; CHEN, C.K.; CHANG, J.H.; LAI, S.Y.; WU, H.H.; CHERNG, W.C.; ANDERSEN, P.; DOHERTY, T.M. Long-lived immune response to Early secretory antigenic target 6 in individuals who had recovered from tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 33, p. 1336-40, 2001.
- YEAGER, H.Jr.; LACY, J.; SMITH L.R.; LeMAISTRE C.A. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am. Rev Respir Dis*, v. 95, p. 998-1004, 1967.
- YUAN, Y.; CRANE, F.F.; SIMPSON, R.M.; ZHU, Y.Q.; HICKEY, M.J.; SHERMAN, D.R.; BARRY, C.E. 3rd. The 16kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.95, p.9578-9583, 1998.
- ZIELONKA, T.M.; DEMKOW, U.; FILEWSKA, M.; BIALAS-CHROMIEC, B.; BOROS, P.; ZALESKA, J.; RADZIKOWSKA, E.; RADZIUKIEWIEWCZ-BYSZEWSKA, D. Usefulness of antibodies against A60 mycobacterial antigen in tuberculosis diagnosis. *Pol. Merkurusz. Lek.*, v.12, n.72, p. 486-90, 2002.
- ZOU, Y.L., ZHANG, J.D., CHEN, M.H., SHI, G.Q.; PRINGNOT, J., COCITO, C. Serological analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis with enzyme-linked immunosorbent assay for anti A60 immunoglobulins. *Clin Infec Dis*. v.19, p. 1084-1091, 1994.
-

APENDICE A
Características e dados microbiológicos e radiológicos de
pacientes com tuberculose pulmonar

N	TIPO	SEXO	IDADE	sintomas (meses)	BK	cruzes	Cultura	RX Infiltrado	RX Caverna
1	P	M	54	2	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	ND	ND
2	P	M	31	1	positivo	++	<i>M. Kansasii</i>	sim	não
3	P	M	49	0,5	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	não	sim
4	P	M	18	1	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
5	P	M	24	ND	positivo	++	<i>M. tuberculosis</i>	ND	ND
6	P	M	58	ND	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	ND	ND
7	P	M	54	2	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
8	P	M	45	6	negativo	-	<i>M. Kansasii</i>	sim	não
9	P	F	27	1	positivo	++++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
10	P	F	39	2	positivo	++	<i>M. Kansasii</i>	sim	não
12	P	M	34	4	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
13	P	M	33	24	positivo	++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
14	P	M	64	4	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
15	P	F	23	2	positivo	++++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
16	P	F	21	4	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
17	P	M	23	2	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
18	P	F	26	7	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
19	P	F	21	1	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
20	P	M	74	3	positivo	++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
21	P	F	14	1	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	não	não
22	P	M	70	1	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
23	P	M	17		positivo	++	<i>M. tuberculosis</i>	ND	ND
24	P	F	52	1	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	ND	ND
25	P	F	34	7	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	não	não
26	P	M	48	5	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
28	P	M	75	48	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
29	P	M	35	9	positivo	++++	<i>M. tuberculosis</i>	ND	ND
30	P	M	26	24	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
31	P	M	69	ND	positivo	++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
32	P	M	27	3	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
34	P	M	29	2	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
35	P	M	58	4	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
36	P	M	48	12	positivo	++++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
37	P	F	25	3	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
38	P	F	49	0,5	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
40	P	M	34	0,5	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
41	P	M	24	6	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
43	P	F	35	ND	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	ND	ND
44	P	F	53	ND	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
45	P	F	36	1	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
46	P	F	46	4	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
47	P	F	23	2	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
48	P	M	23	12	positivo	++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
49	P	F	46	2	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
50	P	F	43	5	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	não	sim
51	P	M	57	5	positivo	++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
53	P	M	25	0,7	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
54	P	M	30	3	positivo	++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
55	P	M	41	2	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
56	P	M	26	3	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim

N	TIPO	SEXO	IDADE	sintomas (meses)	BK	cruzes	Cultura	RX Infiltrado	RX Caverna
57	P	M	26	3	positivo	+	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
59	P	M	32	3	positivo	+++	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não
60	P	F	20	3	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	sim	sim
62	P	F	19	0,5	negativo	-	<i>M. tuberculosis</i>	sim	não

APENDICE B
Características e dados microbiológicos e radiológicos de
pacientes com tuberculose ganglionar

N	TIPO	SEXO	IDADE	Sintomas (meses)	BK	cruzes	Cultura	RX Infiltrado	RX Caverna
11	G	M	23	ND	negativo	-	ND	sim	não
27	G	M	24	5	positivo	BP	ND	não	não
42	G	M	32	ND	positivo	LV	positiva	ND	ND
52	G	M	18	ND	positivo	BP	ND	não	não

APENDICE C

Reatividade dos soros de indivíduos sadios frente a diferentes antígenos e resultado do teste intradérmico (PPD)

N	PPD	Antígenos				
		Mtb81	Bruto	TbF10	TbF6	TbF6DPEP
1	N	0.177	0.163	0.244	0.228	0.028
2	N	0.082	0.104	0.096	0.175	0.012
3	N	0.127	0.111	0.146	0.157	0.195
4	N	0.033	0.148	0.105	0.095	0.281
5	N	0.134	0.137	0.228	0.071	0.118
6	N	0.124	0.164	0.203	0.094	0.053
7	N	0.088	0.088	0.085	0.15	0.278
8	N	0.103	0.272	0.349	0.15	0.418
9	P	0.252	0.202	0.231	0.088	0.051
10	P	0.195	0.187	0.366	0.088	0.208
11	P	0.325	0.314	0.443	0.177	0.164
12	P	0.407	0.522	0.255	0.265	0.051
13	P	0.071	0.136	0.096	0.181	0.226
14	P	0.043	0.168	0.06	0.18	0.207
15	P	0.443	0.295	0.36	0.159	0.188
16	P	0.156	0.136	0.151	0.054	0.267
17	P	0.203	0.138	0.325	0.062	0.253
18	P	0.383	0.274	0.52	0.432	0.079
19	P	0.166	0.184	0.262	0.402	0.415
20	P	0.025	0.057	0.096	0.102	0.482
21	P	0.125	0.242	0.141	0.177	0.074
22	P	0.33	0.234	0.216	0.197	0.239
23	P	0.142	0.229	0.159	0.192	0.075
24	P	0.243	0.169	0.135	0.175	0.016
25	P	0.08	0.139	0.078	0.115	0.41
26	P	0.122	0.13	0.188	0.133	0.062
27	P	0.059	0.086	0.068	0.092	0.3404
28	P	0.064	0.159	0.089	0.076	0.207
29	P	0.266	0.256	0.45	0.318	0.27
30	P	0.126	0.145	0.27	0.187	0.081
Média		0.169	0.1863	0.213	0.165	0.197
DP		0.114	0.090	0.125	0.091	0.131
M+1DP		0.283	0.276	0.339	0.257	0.329
M+2DP		0.398	0.367	0.465	0.348	0.460

N=negativo P= positivo DP= desvio padrão M=média

ANEXO A

**HOSPITAL DAS CLINICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE No.	SEXO:	DATA NASC:
ENDEREÇO	No.	APTO
BAIRRO	CIDADE:	
CEP:	TELEFONE:	

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA: (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOC. DE IDENTIDADE:	SEXO:	DATA NASC:
ENDEREÇO	No.	APTO:
BAIRRO	CIDADE:	
CEP:	TELEFONE:	

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CLINICA

1. TITULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

**Padronização e Desenvolvimento de Testes Sorológicos Para o Diagnóstico da
Tuberculose Humana**

2. PESQUISADOR: Farmacêtica Bioquímica Sandra Trevisan Beck

CARGO/FUNÇÃO: Pós graduanda -Doutorado INSC. CONS. REG. FARM No: 3297

UNIDADE DO HCFMUSP:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO: RISCO MÍNIMO :X RISCO MÉDIO: RISCO MAIOR:

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 30 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 padronização e desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico rápido e específico da tuberculose humana, infecção causada pelo bacilo *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 da 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 deste estudo é padronizar um teste realizado em laboratório, para diagnóstico rápido de pessoas infectadas com o bacilo da tuberculose. Com isto, será possível iniciar o rapidamente o tratamento das pessoas que se encontrarem com a doença ativa, contendo a transmissão da doença. Serão também avaliadas todas as pessoas que mantiveram contato com o doente, para verificar possível contaminação.

Serão avaliados aproximadamente 500 pacientes divididos conforme os grupos apresentados abaixo:

- Grupo 1: 50 acientes , independente de idade, sexo, e raça, com diagnóstico comprovado de infecção pulmonar tuberculosa.
- Grupo 2: 50 indivíduos sensibilizados com *M.tuberculosis* , através de contato com pessoa doente, ou previamente vacinados
- Grupo 3 50 indivíduos com outras doenças do pulmão, que não seja tuberculose
- Grupo 4 100 indivíduos não sensibilizados

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, teste intradérmico para verificar o contato com o agente causador da tuberculose.

Durante a pesquisa, serão retiradas amostras de sangue. Essas amostras serão usadas para verificar a presença de 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 examinadas, para verificar se elas também estão com a doença.

Desconforto e Riscos

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

Quando necessário será realizado um teste intradérmico, que consiste na aplicação de uma substância em baixo da pele do seu antebraço. Caso você tenha entrado em contato com o bacilo da tuberculose, aparecerá um halo vermelho, semelhante a uma picada de mosquito (no início), que será examinado pelo seu médico, após dois dias. Esta reação desaparecerá depois de algum tempo, sem prejuízo para sua saúde.

Os efeitos indesejáveis mais comuns em pacientes que realizam este tipo de teste, são reações do tipo alérgica, que podem ser controladas.

Benefícios

Você estará colaborando para a realização de um teste que poderá auxiliar no diagnóstico da sua doença, impedindo assim que ela seja transmitida para pessoas de seu convívio.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS 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.

Você não renunciará a quaisquer direitos legais, assinando este formulário.

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 Sandra Trevisan Beck, pelos telefones: 853-0416 (horário comercial) ou 282-2645.

Se você tiver alguma dúvida sobre seus direitos como participante desta pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Jorge Kalil no telefone 3069.6442.

Este Termo de Consentimento foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP, que é um grupo de pessoas que avaliam e aprovam ou não pesquisas ou estudos que envolvam pessoas. Este grupo de pessoas também avaliam o andamento do estudo.

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 uma razão e sem que isso tenha conseqüência negativas 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

Data ___/___/___

Hora: _____:_____

assinatura do responsável, quando pertinente

Data: ____/____/____

Hora: ____:____

assinatura do investigador do estudo (nome e carimbo)

Data: ____/____/____

Hora: ____:____

assinatura do coordenador do estudo (carimbo e nome)