



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

MICHELLE CRISTINA GUERREIRO DOS REIS

**ESTUDO SOBRE OS CONTATOS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE
PULMONAR DA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA**

GOIÂNIA

2011

MICHELLE CRISTINA GUERREIRO DOS REIS

**ESTUDO SOBRE OS CONTATOS DE PACIENTES COM TUBERCULOSE
PULMONAR DA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Ana Paula Junqueira Kipnis

Co-orientador: André Kipnis

GOIÂNIA

2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

R357e Reis, Michelle Cristina Guerreiro dos.
Estudo sobre contatos de pacientes com tuberculose pulmonar da região metropolitana de Goiânia [manuscrito]: uma avaliação dos fatores epidemiológicos e da resposta imune humoral dos contatos expostos à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* / Michelle Cristina Guerreiro dos Reis. - 2011.
100 f. : figs, tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Medicina Tropical, 2011.
Bibliografia.

1. *Mycobacterium tuberculosis* 2. Anticorpos. I. Título.

CDU: 616.24-002.5(817.3)

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, irmãs, sobrinha, tios, tias e primos, pelo apoio, paciência, incentivo em todas as horas e o amor incondicional.

À Prof^{ta}. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis, sua inteligência, entusiasmo e perseverança muito me inspiraram, fazendo crescer em mim a sede de conhecimento e a vontade de contribuir para o bem da sociedade. Além disso, se tornou uma grande amiga que me acompanhará além da vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. André Kipnis, por me inspirar com sua paciência, sua aguçada percepção dos fatos e clareza de pensamento.

Aos Profs. Dr. Afrânio Lineu Kritskij e Dr. Marcelo Fouad Rabahi, pelas contribuições que enriqueceram ainda mais este trabalho.

Aos colegas do laboratório: Abadio, Aline, Camila, Danilo, Duane, Edianne, Eduardo, Viviane, pela compreensão do meu 'humor geminiano' e pela ajuda em todos os momentos.

Às colegas Bruna Daniella, Adeliane e Monalisa, especialmente, pela ajuda no acompanhamento dos contatos e pelo incentivo nas horas difíceis.

A todos os professores e funcionários do IPTSP.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa, pela contribuição à ampliação dos conhecimentos.

A todos os profissionais dos CAIS e HDTAA que ajudaram no recrutamento dos pacientes e contatos.

A todos os pacientes e contatos que gentilmente me receberam em suas casas e cuja participação foi fundamental para que este trabalho se concretizasse.

Ao CNPq, Fapeg e Funape, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Revisão da literatura.....	04
2.1. Latência na Tuberculose Pulmonar.....	04
2.2. Resposta Imune a Tuberculose.....	07
2.3. Mecanismos de evasão	17
2.4. Antígenos de Mtb	18
2.4. Diagnóstico de TB ativa e latente.....	21
3. Justificativa.....	26
4. Objetivos	28
4.1. Objetivos específicos	28
5. Métodos	29
5.1. População de estudo	29
5.2. Prova tuberculínica	30
5.3. ELISA	30
5.4. Análises estatísticas	31
6. Resultados	32
6.1. Perfil sócio-epidemiológico e avaliação da infectividade por Mtb dos contatos de pacientes com TBP atendidos nos CAIS da cidade de Goiânia nos anos de 2008 a 2009	32
6.2. Resposta imune humoral dos contatos de pacientes com TBP ao antígeno Hsp ₆₅ de Mtb	39
6.3. Avaliação da acurácia do ELISA-Hsp ₆₅ na discriminação de contatos convertidos dos PT positivos antigos e dos PT negativos	41
7. Discussão	44
8. Conclusões	51
9. Recomendações	52
10. Referências	53
11. Anexos	85
11.1. Aprovação do comitê de ética HC	86
11.2. Questionário sócio-epidemiológico/acompanhamento aplicado aos contatos.....	87

11.3. Distribuição dos contatos por intervalo de idade	88
11.4. Distribuição dos contatos por relação de parentesco	89
11.5. Distribuição dos contatos por comorbidade	90
11.6. Distribuição dos contatos por grau de instrução	91
11.7. Distribuição dos contatos por cor	92
11.8. Representação gráfica da acurácia do ELISA-Hsp α IgM	93
11.9. Representação gráfica da acurácia do ELISA-Hsp α IgG	94

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Evolução da exposição ao Mtb	04
Figura 2. Representação esquemática da hipótese da dinâmica da TBL.....	15
Figura 3. Contatos de TBP acompanhados por 1 ano	36
Figura 4. Variações nos resultados da PT dos contatos que converteram o teste para positivo	38
Figura 5. Dosagem de IgM anti-Hspx em contatos de pacientes com TBP	42
Figura 6. Dosagem de IgG anti-Hspx em contatos de pacientes com TBP	43
Tabela 1. Dados sócio-epidemiológicos dos contatos de pacientes com TBP utilizados neste estudo agrupados pelo resultado da PT	33
Tabela 2. Estudo dos principais fatores de risco associados à infecção por Mtb em contatos de pacientes com TBP	37
Tabela 3. Títulos de anticorpos contra Hspx de Mtb de contatos de pacientes com TBP agrupados de acordo com as características sócio-epidemiológicas	40

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AG – Arabinogalactano

AM - arabinomanana

BAAR – Bacilo Álcool Ácido Resistente

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

CAIS- Centros de Assistência Integral à Saúde

CD – Grupo de Diferenciação

CDC – Centro de Controle e prevenção de doenças

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CR3 – Receptor do Complemento 3

DO – densidade ótica

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

EMB - etambutol

FAPEG- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás

FUNAPE – Fundação de Apoio à Pesquisa

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

INCTB – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose

IFN- γ – Interferon Gama

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

IGRA- ensaios de liberação de Interferon-gama

IL- Interleucina

INH - isoniazida

iNOS – Óxido Nítrico Sintetase induzível

kDa - kilodalton

LAM – Lipoarabinomanana

LM- Lipomanana

LprA -

LprG

ManLam – manose associada à lipoarabinomanana

MIP – Proteína Inflamatória de Macrófagos

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal
Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
NF – nuclear factor (fator nuclear)
NLR – receptores de domínio de oligomerização de nucleotídeos
NLRP3 – receptor de domínio de oligomerização de nucleotídeo- 3- fosfato
NO – Óxido Nítrico
OMS (WHO) – Organização Mundial de Saúde
PBS – solução salina tamponada com fosfato
PDIM – dimicocerosato de filiocerol
PGL – Glicolípido Fenólico
PIM – Manosídeo de Fosfatidilinositol
PPD – Derivado Proteico Purificado
PT – prova tuberculínica
PZA - pirazinamida
RIF - rifampicina
RNI- Reativos Intermediários do Nitrogênio
TACO – proteína que se liga ao triptofano-aspartato
TB – Tuberculose
TB MR – Tuberculose multiresistente
TB XDR – Tuberculose superresistente
SL- Sulfolípídeos
SIV – vírus da imunodeficiência símio
SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
TBL- Tuberculose Latente
TBP- Tuberculose Pulmonar
TLR – receptor semelhante ao Toll
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

RESUMO

A Tuberculose (TB) atinge milhões de pessoas anualmente e aproximadamente um terço da população mundial está infectado pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A detecção da infecção e o monitoramento dos contatos de TB com alto risco de adoecimento contribuiriam para o controle da disseminação da doença. Propõe-se neste estudo a avaliação de características epidemiológicas que podem contribuir para a infecção e o uso da resposta imune humoral contra o antígeno recombinante Hsp_x de Mtb para avaliação do risco de adoecimento em indivíduos recém infectados numa coorte de contatos de pacientes com tuberculose pulmonar. Os indivíduos incluídos foram submetidos à prova tuberculínica (PT) e coleta de sangue para dosagem de anticorpos (IgM/ IgG - ELISA). Quarenta e cinco pacientes com TBP e 177 contatos foram recrutados nos Centros de Assistência Integral a Saúde (CAIS) da região metropolitana de Goiânia de 2008 a 2009 e acompanhados por um (1) ano. Durante o acompanhamento, apenas a frequência do contato (diário) com o paciente foi associada ao status da PT no momento do diagnóstico ($p=0,006$). Dois (2) contatos PT positiva adoeceram, oito (8) contatos converteram a PT para positiva, seis (6) sofreram booster, 44 permaneceram PT negativa e 20 desistiram do estudo. Os níveis de IgM-Hsp_x encontrados foram de $0,841\pm 0,40$ para os contatos PT positivos, de $0,807\pm 0,32$ para os PT negativos, de $0,732\pm 0,21$ para os PT convertidos e de $0,961\pm 0,48$ para os que sofreram booster. Os níveis de IgM-Hsp_x dos contatos que adoeceram permaneceram inalterados. As dosagens de IgG-Hsp_x foram de $0,242\pm 0,10$ nos contatos PT positiva, de $0,237\pm 0,10$ nos PT negativa, de $0,140\pm 0,02$ nos PT convertidos e de $0,255\pm 0,22$ nos que sofreram booster, sendo significativa a diferença entre as médias ($p=0,019$). Os resultados obtidos mostraram que contato diário com o paciente está relacionado à PT positiva e que não houve associação entre a presença de anticorpos (IgM/IgG) e risco de adoecimento em contatos recém infectados de pacientes com tuberculose pulmonar.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) affects millions of people every year and it is estimated that one third of world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). The identification of infection and monitoring of close contacts of TB patients would contribute to disease dissemination control. In the present study the epidemiological characteristics that may facilitate contact's infection were evaluated. Additionally, the antibody profile against Hsp_x from Mtb, among individuals that were in frequent contact of pulmonary tuberculosis (PTB) patients, was investigated as a marker for risk of active disease development. All participants were submitted to tuberculin skin test (TST) and their blood were harvested to determine the antibody profile (IgM/IgG - ELISA). Forty-five PTB patients and 177 contacts were followed for one year. During the follow-up period, only daily contact with patient was associated with positive TST at the moment of diagnosis. Two TST positive contacts developed active PTB, eight contacts converted their TST to positive, 6 individuals presented the booster effect, 44 remained TST negative and 20 dropped out of the study. The IgM-Hsp_x levels were $0,841 \pm 0,40$ for TST positive contacts, $0,807 \pm 0,32$ for TST negative, $0,732 \pm 0,218$ for TST converted and $0,961 \pm 0,48$ to contacts that boosted their TST. The IgG-Hsp_x levels were $0,242 \pm 0,10$ for TST positive contacts, $0,237 \pm 0,10$ for TST negative, $0,140 \pm 0,02$ for TST converted and $0,255 \pm 0,22$ for contacts that boosted their TST, with significant statistical difference ($p=0,019$). Our data show that daily contact is associated with TST positivity and the risk of disease development and antibodies against Hsp_x (both, IgM and IgG) were not associated among recent latently infected contacts of PTB patients.

INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa com longo histórico. O seu agente causador é a micobactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), pertencente ao complexo também chamado *Mycobacterium tuberculosis* (Aranaz et al. 1999). A característica mais marcante desta micobactéria é o seu envelope formado por uma membrana citoplasmática, uma parede celular composta por lipídeos e polissacarídeos, além de ácidos micólicos. Esta estrutura é responsável pela proteção dos constituintes celulares e pelo suporte mecânico, conferindo ao bacilo a sua forma característica (bastonete/bacilo) (Brennan 2003).

A transmissão da TB ocorre através da inalação do bacilo contido em gotículas expelidas por indivíduos com a doença clinicamente ativa, através da fala, tosse ou espirro (Doherty & Anderesen 2005). Apenas 5 – 10% dos indivíduos infectados desenvolverão a doença. O seu estabelecimento depende tanto de fatores associados ao bacilo, como a quantidade e a virulência, quanto de fatores associados ao hospedeiro, como condição imunológica e características genéticas (Dannenberg 1993).

A forma primária da TB caracteriza-se pela baixa carga bacteriana infectante, sendo pouco contagiosa e de grande dificuldade de diagnóstico. Esta forma pode ser fatal em indivíduos gravemente imunocomprometidos, como os co-infectados com HIV, ou que apresentem defeitos em receptores de citocinas como IFN- γ ou IL-12 (Kritski & Melo 2007). A TB se manifesta principalmente na forma pós-primária, quando a doença se estabelece mesmo após uma resposta imune específica ter sido desencadeada, em decorrência de uma nova infecção ou reativação de um foco primário (Verver et al. 2005).

A Tuberculose pulmonar (TBP) é a manifestação pós-primária mais comum, no entanto outros órgãos podem ser acometidos como a pleura, rins, ossos e sistema nervoso central (Robbins et al. 1984). Os sintomas mais comuns são tosse que inicialmente se apresenta seca, evoluindo para uma expectoração mucosa intensa, purulenta, com hemoptise ou não, febre baixa intermitente, suor noturno, falta de apetite, astenia, irritabilidade, enxaqueca, dor torácica causada pelo esforço da respiração/expectoração (Hopewell 2006). A TB pode assumir ainda uma forma subclínica, chamada de latente (TBL), na qual o indivíduo infectado não apresenta sinais nem sintomas, nem é capaz de transmitir a doença.

Quanto à resistência do Mtb a antibióticos existem dois subtipos de TB pós-primária: a TB multirresistente (TB MR), na qual o bacilo é resistente a dois dos fármacos utilizados no tratamento, a rifampicina (RIF) e a isoniazida (INH); e a TB superresistente (TB XDR – do inglês, extremely drug resistant), na qual o bacilo além de ser resistente à RIF e INH, é também resistente à qualquer fluoroquinolona e a pelo menos uma dos três medicamentos injetáveis utilizadas no tratamento, a capreomicina, ou a kanamicina ou a amicacina (Gandhi et al. 2006).

Observou-se que em áreas de alta incidência de TB, como a África e a Ásia, onde a transmissão do bacilo é constante ou aumentada, a população mais afetada é a de adultos jovens em decorrência de infecção recente ou reinfeção. No Brasil, apesar de incidência ser intermediária à daqueles países a população afetada também é de adultos jovens. Já em áreas de baixa incidência, como a América do Norte e a Europa Ocidental, a maioria dos casos ocorre em indivíduos de idade avançada ou entre imigrantes vindos de áreas endêmicas (Dye C 2006).

O diagnóstico da TB inclui exame clínico, radiológico e laboratorial. As características da parede celular do Mtb são exploradas no principal teste de diagnóstico laboratorial utilizado, a baciloscopia, no qual o corante carbolfucsina penetra na parede bacteriana que resiste ao descoramento por álcool-ácido, conferindo uma cor avermelhada ao bacilo, propriedade descrita por Zhiel e Neelsen em 1881 (Varughese et al. 1974).

O tratamento da doença faz uso da combinação de pelo menos três das seguintes substâncias: rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) e o etambutol (EMB) (Chan & Iseman 2002). No Brasil o esquema de tratamento com três drogas (RIF, INH e PZA) que era utilizado desde 1979, sofreu alterações, tendo sido acrescentado um quarto fármaco (EMB) à combinação, e modificado a forma de administração dos medicamentos, agora compactados em um só comprimido (Comissão de Tuberculose da SBPT, 2009).

Acredita-se que um terço da população mundial esteja infectado por Mtb (Dye et al. 1999). Além disso, estima-se que ocorreram 9,4 milhões de casos de TB no mundo, culminando em 1,7 milhões de mortes (WHO 2010). Apesar do número de casos ter crescido, o número de indivíduos tratados e curados superou a meta de 85% estabelecida pela OMS (41 milhões de pessoas). A maioria dos casos aconteceu na Ásia (55%) e na África (30%), enquanto a região das Américas foi responsável por 3% do total de casos (WHO 2010).

O Brasil ainda pertence ao grupo dos 22 países responsáveis por 80% da TB no mundo, no entanto ocupamos agora o 19º lugar (WHO 2010). A doença está distribuída por todo o país, refletindo numa taxa de incidência de 38,2/100.000 habitantes em 2007. A forma mais comum da TB é a pulmonar, correspondendo a 83% dos casos, a forma extrapulmonar corresponde a 14% e a ocorrência das duas formas ao mesmo tempo corresponde a 3% dos casos (SVS/MS 2009). A distribuição da TB no país é irregular, já que estados como o Rio de Janeiro, Amazonas e Pernambuco apresentam taxa de incidência maior que a nacional, 73,2, 67,7 e 47,8 por 100.000 habitantes, respectivamente, enquanto estados como Goiás e Tocantins tem incidência abaixo da nacional 9,6 e 15,4 por 100.000 habitantes, respectivamente (SVS/MS 2009).

Em Goiás, a TB parece estar localizada principalmente na região metropolitana de sua capital, Goiânia, com 550 casos novos de TB em 2008, visto que o total de casos no estado foi de 942 neste mesmo ano. A forma pulmonar também é a mais comum no estado, correspondendo a 81.2% dos casos de TB registrados (SVS/MS 2009).

A TB ainda é motivo de preocupação para saúde pública no mundo. A redução na prevalência em 50% até 2015, além do aumento da identificação de casos novos e seus contatos, a diminuição do abandono do tratamento, a identificação dos portadores de HIV e de doença multirresistente são as principais metas da WHO a serem alcançadas (WHO 2010).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Imunopatologia das doenças infecciosas tem como objetivo principal avaliar diferentes antígenos de Mtb para o diagnóstico sorológico das diversas formas da TB, assim como a busca de biomarcadores das diversas formas clínicas da doença. Este estudo faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB- CNPq), sob coordenação dos Dr. Diógenes Santiago Santos e Dr. Afrânio Lineu Kritski assim como da rede goiana de pesquisa em Tuberculose, sob coordenação da professora Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis.

Esta tese teve como propósito colaborar para o conhecimento sobre a dinâmica de transmissão e adoecimento em indivíduos diretamente expostos ao contágio de TB, como os contatos de pacientes com a doença ativa, avaliando fatores epidemiológicos que favoreceram a infecção/adoecimento bem como propondo um teste imunoenzimático (ELISA) baseado no antígeno de Mtb – Hsp₆₅ - para identificação dos contatos que possuem maiores chances de desenvolver TB ativa dentre os contatos expostos recém infectados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. LATÊNCIA NA TUBERCULOSE PULMONAR

A TBP acomete o trato respiratório e o paciente que apresenta baciloscopia positiva é a principal fonte de disseminação da doença (Menzies 1997). A infecção por Mtb se dá pela inalação de partículas contendo o bacilo (partículas de Wells), expelidas pelo paciente índice principalmente ao tossir (Doherty & Andersen 2005). O risco de infecção é dependente de alguns fatores como a intensidade da carga bacilar do paciente, a proximidade do contato com o paciente, a carga bacilar inalada e a integridade do sistema imune do hospedeiro (Menzies 1997, Morán-Mendoza et al. 2010).

A maioria dos indivíduos infectados por Mtb desenvolve uma resposta celular efetiva e a replicação do Mtb é contida, sendo a maior parte deles eliminada (Figura 1). A doença ativa se manifesta em apenas 5-10% dos indivíduos expostos ao contágio com o bacilo, e nestes a resposta imune desencadeada não será suficiente para conter a infecção, culminando no estabelecimento da doença (Parrish 1998, North & Jung 2004). Nos demais indivíduos infectados (90-95%), uma parte dos bacilos consegue persistir, caracterizando a doença latente (TBL). Dentre estes indivíduos, somente 2 - 5% poderão desenvolver TB ativa em virtude de fatores associados à imunidade do hospedeiro. Estima-se que 2 bilhões de pessoas no mundo são portadores latentes de Mtb, o que corresponde a um terço da população mundial (Dye et al. 1999). A constatação da TBL se dá pela resposta imune ao bacilo pela prova tuberculínica (PT), que avalia a presença de linfócitos T de memória por meio da reação de hipersensibilidade tardia a um conjunto de antígenos purificados do complexo Mtb, conhecido como PPD (derivado protéico purificado) (Menzies 1999).

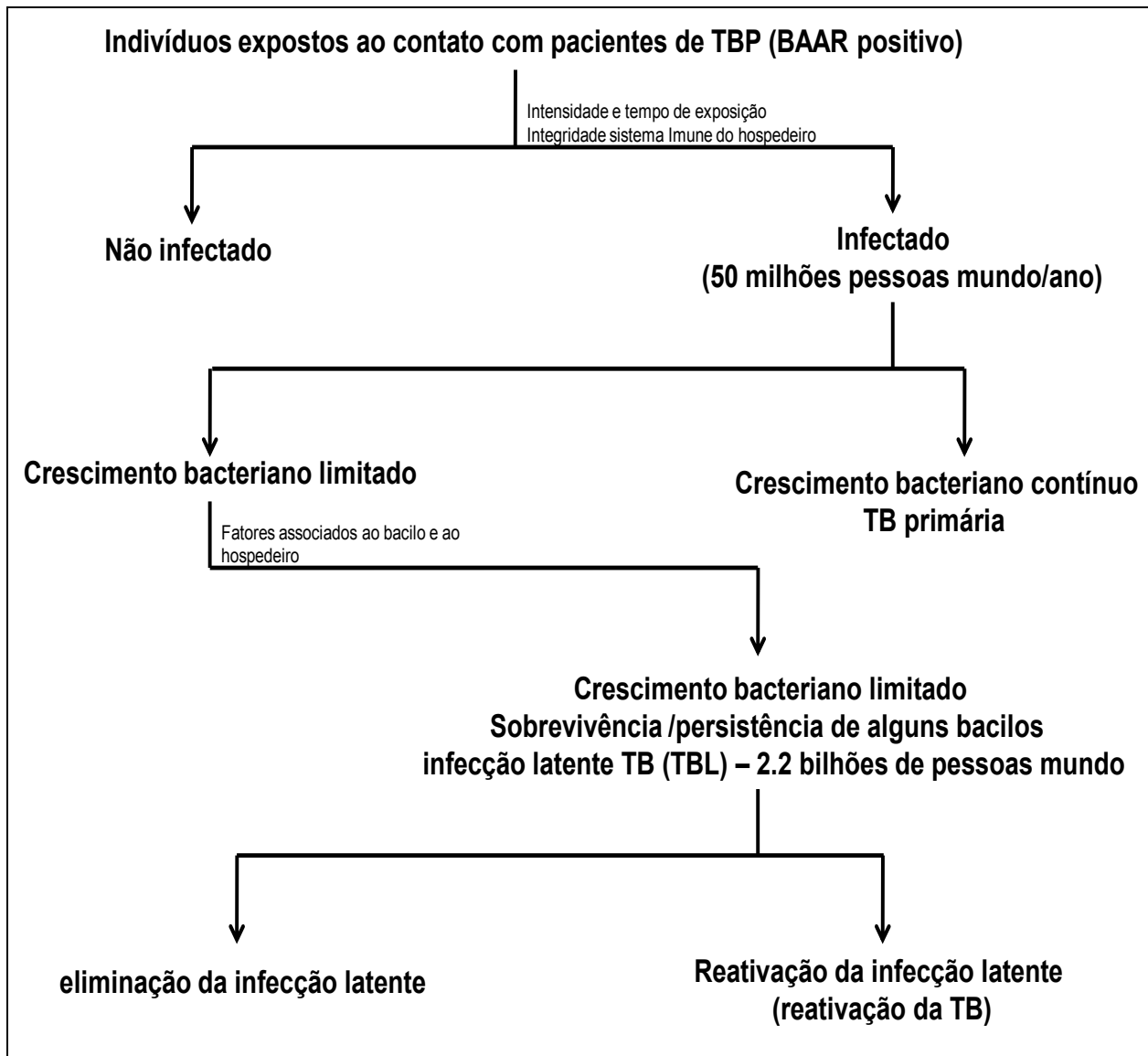


Figura 1. Evolução da exposição ao Mtb (adaptado de Ahmad 2010). É mostrada a progressão natural dos eventos iniciados pela exposição de indivíduos imunocompetentes a um paciente índice com baciloscopia positiva.

A comprovação da existência da TBL data de meados da década de 30 do século passado onde estudos mostravam que apenas alguns (11%) dos indivíduos infectados (PT positiva) acompanhados por sete anos e que apresentavam alterações radiográficas de lesões pulmonares semelhantes à de TB, desenvolviam a doença ativa (Gedde-Dahl 1952). Adicionalmente, estudos pós-mortem em indivíduos que não apresentavam sinais nem sintomas sugestivos de TB, e os modelos animais ajudaram a colher evidências da persistência do bacilo sem a ocorrência da doença ativa (Opie 1927; Robertson 1933; Feldman & Baggenstsson 1938). Hernandez-Pando e colaboradores, por exemplo, demonstraram a presença de DNA de Mtb em pneumócitos do tipo II, células endoteliais e fibroblastos em tecido pulmonar saudável advindo de indivíduos de área endêmica (Hernandez-Pando et al. 2000), desafiando a noção de que o bacilo apenas persistiria em lesões primárias granulomatosas, fibróticas, ou calcificadas (Lenaerts et al. 2007).

Questiona-se a existência ou não de atividade metabólica nesse bacilo persistente. Acredita-se que as condições que o levem à forma quiescente estejam associadas ao pH baixo, depleção de oxigênio, limitação de ferro, stress pelo acúmulo de reativos intermediários do nitrogênio e escassez de nutrientes (Wayne 1994, Betts et al. 2002, Ohno et al. 2003, Park et al. 2003, Voskuili et al. 2004). Entendia-se que a TBL correspondia a um estado no qual a infecção por Mtb foi contida, sem a erradicação (esterelização) do bacilo, que deteria a habilidade de sair do estado de dormência e promover o desenvolvimento de TB ativa quando o sistema imune do hospedeiro sofresse algum tipo de supressão (Ulrichs & Kaufmann 2006).

Pesquisas com pulmão de camundongos infectados cronicamente com Mtb e escarro de pacientes com TB revelaram pela análise do perfil de RNA que ocorrem mudanças na expressão gênica do bacilo para sua adaptação. Nos camundongos infectados houve uma expressão aumentada de genes envolvidos nas vias lipolíticas e nos reguladores de virulência (Talaat et al. 2007), enquanto que nos pacientes TBP observou-se o aumento da expressão dos genes da região Dos-R e dos envolvidos nas vias de utilização de lipídeos como fonte de energia, bem como a regulação negativa dos genes envolvidos com metabolismo aeróbio e proliferação (Garton et al. 2008). Com base nos conhecimentos atuais, uma nova hipótese foi sugerida na qual a infecção latente seria um processo dinâmico, onde o sistema imune do hospedeiro e a bactéria responderiam continuamente e ativamente nos indivíduos infectados imunocompetentes (Cardona 2009).

Os indivíduos infectados latente, teoricamente, serviriam como um “reservatório” de *Mtb*, já que a probabilidade maior de desenvolverem TB seria nos dois primeiros anos após sua exposição, entretanto na fase de latência não há evidências de que eles sejam capazes de disseminar o bacilo (AMS 2000). Em regiões de baixa prevalência de TB, como os EUA, estima-se que 20-30% dos contatos de pacientes sejam infectados latentes (Marks et al. 2000). Já em regiões de alta prevalência, como o Brasil, esta proporção pode alcançar 50% e 12 horas ou mais de exposição constitui sério fator de risco (Kritiski & Melo 2007).

Além do tempo de exposição, outras condições colaboram para que a infecção latente resulte no desenvolvimento da doença. Embora muitas vezes não se comprove se a TB é primária ou uma reativação do estado latência, algumas doenças favorecem o desenvolvimento da doença ativa. Em indivíduos com diabetes mellitus a TB tende a ser mais agressiva, com lesões extensas e cavitações no terço inferior dos pulmões (Ikezoe et al. 1992). Na insuficiência renal crônica, a ocorrência de TB (ganglionar) é frequente, especialmente naqueles indivíduos submetidos a longos períodos de diálise (Moore et al. 2002). Pacientes com artrite reumatóide, uma doença inflamatória crônica, autoimune, em tratamento com bloqueadores de TNF- α , apresentam maiores chances de desenvolver TB (Marques et al. 2009).

2.2. RESPOSTA IMUNE A TUBERCULOSE

A infecção por *Mtb* interrompe a homeostasia no hospedeiro, que induz uma resposta imune na tentativa de reestabelecê-la. A resposta imune abrange a resposta inata, composta pelas barreiras físico-químicas e por células fagocíticas e NK responsáveis pelo reconhecimento de microorganismos estranhos, e a resposta adaptativa, composta principalmente por linfócitos, caracterizada pela extraordinária especificidade e capacidade de memória das células que a compõe (Getz 2005). Acreditava-se que a recuperação do estado inicial de equilíbrio, só seria alcançada com o desenvolvimento da resposta imune adquirida, com participação fundamental dos linfócitos T CD4⁺ produtores de interferon-gamma (IFN- γ) (Muller et al. 1987). Entretanto, a resposta imune inata, com o aumento do entendimento dos mecanismos utilizados no reconhecimento e eliminação dos patógenos, igualou-se em importância na participação da resposta imune capaz de conter a infecção e evitar o estabelecimento da doença (Bhatt & Salgame 2007, Korbelt et al. 2008, Kawai & Akira 2009).

O Mtb alcança os alvéolos pulmonares após desvencilhar-se das barreiras protetoras do trato respiratório, onde são reconhecidos principalmente pelos macrófagos residentes. Células dendríticas e epitelióides alveolares também são capazes de reconhecer o bacilo (Bermudez et al. 2002, Bhatt et al. 2004). Alguns dos receptores utilizados no reconhecimento promovem a ativação celular em direção à eliminação do bacilo e outros promovem a entrada silenciosa do Mtb, isto é sem promover ativação do macrófago (Quesniaux et al. 2004).

Os principais receptores de reconhecimento padrão (do inglês, pattern recognition receptor - PRR) de patógenos presentes nos macrófagos, células apresentadoras de antígeno, dentre outras, são os receptores semelhantes ao receptor Toll de drosófilas, chamados TLRs (do inglês, Toll like receptor) (Brightbill et al. 1999). O TLR-2 reconhece uma grande variedade de antígenos micobacterianos como as lipoproteínas de 19-kDa, a lipoarabinomanana (LAM) (Brightbill et al. 1999), a LprA (Rv1270) e LprG (Rv1411c) (Gehring et al. 2004, Pecora et al. 2006), além do glicolípido manosídeo de fosfatidilinositol (PIM) (Jones et al. 2001). A ativação do TLR-2 em resposta aos padrões moleculares associados (do inglês: PAMP: pathogen associated molecular pattern) às micobactérias, culmina na produção de um peptídeo com função microbicida, a catelecidina, numa via dependente de vitamina D (Liu et al. 2006) e pode ainda direcionar a organização do granuloma e induzir a formação das células gigantes multinucleadas em um modelo *in vitro* de granuloma humano (Puissegur et al. 2007).

A proteína ESAT-6 de Mtb, no entanto, quando reconhecida via TLR-2 presente nos macrófagos, compromete a indução da cascata de ativação do TLR-2 dependente da proteína adaptadora chamada de fator de diferenciação mielóide 88 (MyD-88) (Pathak et al. 2007), além de limitar a resposta ao IFN- γ e conseqüentemente a expressão de moléculas de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) (Noss et al. 2001). Outros TLRs podem participar do reconhecimento de antígenos micobacterianos, como o TLR-4 que também identifica PIM (Abel et al. 2002), e o TLR-9 que se localizam intracelularmente e reconhece CpG DNA de Mtb (Bafica et al. 2005).

Existem PRRs capazes de reconhecer outros PAMPs, como os receptores de manose, expressos principalmente nos macrófagos alveolares e relacionados à entrada silenciosa de Mtb na célula (Schlesinger et al. 1993). Estes receptores reconhecem além de manose, arabinomanana (AM), PIM e ManLam (manose associada a lipoarabinomanana) (Torreles et al. 2006). Além destes, também participam do reconhecimento destes antígenos de Mtb os

receptores scavengers, os de proteína surfactante e o CD14 (Ernest 1998). Outro tipo de PRR são os receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (do inglês, Nucleotide Oligomerization Domain like receptors), que se localizam intracelularmente e reconhecem antígenos micobacterianos (ácidos nucleicos) que se encontrem no citoplasma (Ferwerda et al. 2005).

Os antígenos micobacterianos podem ser opsonizados por anticorpos e componentes do sistema Complemento, promovendo a fagocitose via receptor da fração Fc dos anticorpos e os receptores do sistema complemento, como o CR3 (Ernest 1998, Collins & Kaufman 2001). Além de promover a fagocitose, a interação com o receptor de Fc dos anticorpos induz a formação de reativos do oxigênio e permite a fusão do fagossoma com o lisossoma (Armstrong & Hart 1975), enquanto a interação com o CR3 impede a geração destes intermediários e a maturação do fagossoma contendo o bacilo e a sua fusão com o lisossoma (Sturgill-Koszycki et al. 1996, Le Cabec et al. 2000).

O reconhecimento de antígenos de Mtb por meio dos PRRs leva a uma cascata de ativação intracelular que culminará na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a pro-interleucina 1 (IL-1) e 12 (IL-12) (Jo 2008). Essa ativação pode ser dependente ou independente de proteína adaptadoras, como a MyD-88, com consequente ativação do fator de transcrição nuclear (NF) - κ B, induzindo a transcrição das proteínas pró-inflamatórias como as citocinas TNF- α e a IL-1 (Jo 2008, Yamamoto et al. 2003). Esse reconhecimento antigênico, principalmente via NLRs (nucleotide oligomerization domain like receptors - NLRP3), induz também os inflamassomas, que são plataformas de ativação molecular que desencadeiam a maturação e secreção de citocinas como a IL-1 β e a IL-18 pela ativação da caspase 1 (Schroder & Tschopp 2010). Ainda não está bem esclarecido qual o papel dos inflamassomas na TBP, há evidências de que ambos Mtb e BCG são capazes de inibir os inflamassomas pela via das metaloproteinases bacterianas dependentes de zinco (Master et al. 2008), entretanto também é sugerido que a micobacteria seja capaz de induzir a ativação da caspase 1 com liberação de IL-1 β em células infectadas (Koo et al. 2008).

A fagocitose do bacilo ocorre após o seu reconhecimento pelo macrófago, com a formação do fagossoma. A remodelação do citoesqueleto para a formação do fagossoma tem a participação da proteína TACO e glicerol presente na membrana do hospedeiro que contém aspartato e triptofano (do inglês, tryptophane aspartate-containing coat protein, TACO) pela sua capacidade de ligação ao colesterol e à actina (Ferrari et al. 1999, Gatfield & Pieters

2000). Uma série de eventos de fusão e fissão de vesículas contendo ATPases transportadoras de prótons e de lisossomas contendo hidrolases com o fagossoma proporciona o pH ideal para que as hidrolases funcionem eficientemente para promover a destruição do bacilo, no fagolisossoma formado (Yates & Russell 2005). Esses eventos são dependentes de cálcio (Ca^+) e levam à ativação de fosfatidil inositol-3-fosfato que também participa da maturação do fagossoma em fagolisossoma (do inglês, early endosomal antigen1) (Chua & Deretic 2004, Kusner 2005).

Outro mecanismo de destruição do Mtb é a produção de mediadores da oxidação, como os reativos intermediários do nitrogênio (RIN), como o óxido nítrico (NO), e de reativos intermediários do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Nicholson et al. 1996). Entretanto, a eliminação do bacilo por estes mecanismos só foi demonstrada em modelos animais, havendo apenas evidências experimentais de que o óxido nítrico tem alguma importância na resposta do hospedeiro na TB em humanos (Flech & Kaufmann 1987; Chan & Flynn 1999).

As células dendríticas também são capazes de fagocitar o bacilo, e em seguida passam por um processo de maturação que envolve a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86), moléculas de adesão e receptores para quimiocinas, principalmente para o CCR7, permitindo a sua migração para o linfonodo drenante (Bhatt et al. 2004, Buettner et al. 2005). Neste local, elas apresentam os antígenos micobacterianos aos linfócitos T CD4^+ e CD8^+ virgens, que se ativam, proliferam, diferenciam-se em linfócitos efetores e migram de volta ao sítio da inflamação para exercerem suas funções efetoras (Cella et al. 1996, Serbina et al. 2001, Tufariello et al. 2003).

Após o processamento do bacilo, macrófagos e células dendríticas apresentam os peptídeos resultantes complexados aos MHCs de classe I e II aos linfócitos T CD8^+ e T CD4^+ , respectivamente (Flynn & Chan 2001). Ao mesmo tempo, secretam citocinas como a IL-12 que estimula os linfócitos T($\alpha\beta$) CD4^+ , CD8^+ e células NK a secretarem IFN- γ , principal indutor da produção de NO e de RNI responsáveis pela destruição do bacilo (Ding et al. 1998). Camundongos BALB/C tratados com IL-12 antes do desafio com Mtb, apresentaram aumento na sobrevivência e carga bacteriana reduzida (Flynn et al. 1995). Crianças com receptores defeituosos para IFN- γ e IL-12 são mais susceptíveis a doenças micobacterianas (Jouanguy et al. 1999, Alcais et al. 2005). Este perfil de citocinas (IL-12, IFN- γ) chamado de

Th1 (do inglês, helper, efetora) é o principal responsável pela resposta protetora à infecção por Mtb (Flynn & Chan 2001).

Os linfócitos T CD4⁺ são as principais células envolvidas na ativação dos macrófagos, pela produção de IFN- γ (Th1) que juntamente com o TNF- α potencializa a ação microbicida dos macrófagos (Kaufmann 2002). Experimentos com camundongos depletados de linfócitos T CD4⁺ demonstram a importância destas células na resposta à infecção pelo Mtb (Muller et al. 1987). Em um modelo murino de TBL, a depleção de linfócitos T CD4⁺ resultou na rápida reativação da doença, apesar da presença de IFN- γ e da enzima iNOS (Scanga et al. 2000). Pessoas com prova tuberculínica positiva (PT+), co-infectados com o HIV, apresentam chances aumentadas tanto de desenvolver quanto de reativar a TB, quando os níveis de linfócitos T CD4⁺ diminuem no sangue periférico (Selwyn et al. 1989). Em primatas infectados com SIV (simian immunodeficiency virus), a redução nos níveis de linfócitos T CD4⁺ foi associada ao tempo para reativação de TBL (Diedrich et al. 2010).

O linfócito T CD8⁺ é outra célula envolvida na resposta à infecção por Mtb. Os T CD8⁺ podem secretar IFN- γ , TNF- α , e promover ação citotóxica sobre a célula infectada através da liberação de grânulos contendo perforina, granzima e granulósina (Collins & Kaufman 2001), ou ainda induzir apoptose nessa célula via CD95-CD123 (Brookes et al. 2003). Camundongos infectados que apresentavam moléculas de MHC-I defeituosas tinham maior carga bacteriana do que os animais controle (Lazarevic & Flynn 2002). Existe ainda um subtipo de linfócito T CD8⁺ capaz de reconhecer lipídeos e/ou glicolipídeos apresentados pela molécula CD1 presentes na maioria das células apresentadoras de antígeno (Rosat et al. 1999). A reativação de infecção latente após depleção de linfócitos T CD8⁺ no modelo de TBL de Cornell sugere que a presença destas células pode ter um papel no controle da infecção latente (Van Pinxteren et al. 2000).

Outro tipo de linfócito T mais raro é o linfócito T $\gamma\delta$. Eles representam menos de 5% dos linfócitos sanguíneos em homens e camundongos (Janis et al. 1989). Em camundongos, os linfócitos T $\gamma\delta$ são os primeiros a chegarem ao sítio de infecção e podem produzir algumas quimiocinas e ainda promover a secreção de IL-12 pelas células dendríticas e macrófagos (Ferrero et al. 2003). Além de produzirem IFN- γ e TNF- α , em resposta a IL-23 produzida pelas células dendríticas, estas células ainda secretam IL-17, citocina proinflamatória estimuladora de neutrófilos, sugerindo papel importante na resistência nos estágios iniciais da infecção (Lockhart et al. 2006). A especificidade antigênica dos linfócitos T $\gamma\delta$ ainda não está

esclarecida, entretanto em humanos e primatas elas parecem reconhecer fosfoantígenos, sendo capazes inclusive de induzir memória (Shen et al. 2002, Chen 2005).

Os linfócitos B também estão presentes no sítio de infecção (Tsai et al. 2006). Eles são ativados principalmente no linfonodo drenante por linfócitos T primados por células dendríticas maduras, ativando-as tanto pela secreção de IL-2, IL-4 e IL-5, quanto pelo contato intercelular direto (Clark et al. 1992). O contato ocorre pela interação entre a molécula CD40 presente no linfócito B e CD40-Ligante, presente no linfócito T, sendo fundamental para a completa ativação do linfócito B (Noelle et al. 1992). Estudos recentes *in vivo* sugerem que o linfócito B também pode reconhecer antígenos e ser ativado diretamente, sem interação com outras células (Pape et al. 2007). Após ativação o linfócito B gera clones de memória e outro de plasmócitos produtores de anticorpos (McHeyzer-Williams et al. 2005). Além de células apresentadora de antígeno (Maglione & Chan 2009), outras funções vêm sendo associadas aos linfócitos B, como a de regulador dos linfócitos T pela produção de IL-10 (Mizoguchi & Bhan 2006), juntamente com estudos mostrando o aumento desta citocina em modelos murinos deficientes em linfócitos B (Maglione et al. 2007, Junqueira-Kipnis et al. 2005).

O sucesso ou fracasso do estabelecimento da resposta imune protetora pode levar ao controle da infecção e o subsequente estado de latência (mesmo que momentâneo), ou ao desenvolvimento da doença. A TB ativa foi inicialmente associada a um desequilíbrio entre a resposta protetora Th1, caracterizada pela produção de IL-12 e IFN- γ , e a resposta imune do tipo Th2, caracterizada pela presença de IL-4 e IL-5 (Mosmann et al 1986, Glimcher & Murphy 2000). No entanto, o desenvolvimento da doença mostrou-se mais complexo e indo além do paradigma Th1/Th2 (Kidd 2003). Há ainda a participação da resposta do tipo Th 17, caracterizada pela produção de citocinas próinflamatórias como a IL-17, associada à migração de neutrófilos (Lan et al. 2003, Kolls & Lindén 2004). Pacientes com TB apresentaram porcentagem maior de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 do que controles saudáveis (Peng et al 2008). Além disso, há a resposta reguladora (Tr), caracterizada pela produção de citocinas como a IL-10 e TGF- β , que tenta minimizar as injúrias teciduais causadas pela resposta inflamatória (Hougardy et al. 2007). Alguns estudos sugerem que estas células contribuam para a supressão da resposta protetora Th1, visto que esta população aparece aumentada em pacientes com a doença ativa (Guyot-Revol et al. 2006, Chen et al. 2007).

A migração de células sanguíneas para o sítio da infecção acontece em função da secreção de citocinas e quimiocinas próinflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, MIP-1, e

principalmente TNF- α , pelos macrófagos e células dendríticas enquanto processam o bacilo (Dannenberg 1993). O TNF- α influencia ainda a expressão de moléculas de adesão (Windish et al. 2009), de outras citocinas (Algood et al. 2004), além de promover a vasodilatação. Adicionalmente ao TNF- α , a IL-1 organiza a formação do granuloma na tentativa de isolamento do macrófago infectado pelo Mtb, induzem a resposta inflamatória e efeitos citotóxicos (Flesch & Kaufman 1993, Wang & Kuo 2001). A IL-6 está associada à estimulação da hematopoese e dos linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos secretores de anticorpos (Flesch & Kaufman 1993). A IL-8 é um potente quimioatraente de polimorfonucleares (PMN) e pode ser produzido por pneumócitos do tipo II, contribuindo no processo inflamatório em resposta ao estímulo micobacteriano (Wickremasinghe et al. 1999). A proteína inflamatória de macrófago 1 (MIP-1), também é uma quimiocina que recruta PMNs para o local da infecção (Castella 1995, Faldt et al. 2002). Além do recrutamento de células essas citocinas e quimiocinas, também produzidas por PMNs, aumentam a expressão das moléculas de adesão (Ridel & Kaufman 1997, Pokkali et al. 2009).

A mobilização das células sanguíneas culminará no isolamento do macrófago infectado, levando à formação do granuloma, limitando a inflamação a um sítio específico e impedindo a sua disseminação (Algood et al. 2005). O granuloma é local de interações intensas e dinâmicas entre macrófagos, células dendríticas e linfócitos T, constituindo uma estrutura bem organizada (Tsai et al. 2006). Com a evolução da resposta imune os macrófagos atingem vários estágios de diferenciação, incluindo células gigantes multinucleadas, células epitelióides e de macrófagos espumosos, assim chamados por conter concentrações altas de resíduos lipídicos, derivados da destruição das células infectadas (Ordway et al. 2005, Peyron et al. 2008). Em humanos, a necrose caseosa gerada por essa intensa resposta ao bacilo é centralizada, sendo circundada por macrófago e linfócitos T. Existe também a formação de agregados de células B, situados na periferia dos granulomas, próximos aos linfócitos T e outros macrófagos que envolvem a necrose, randomicamente distribuídos (Tsai et al. 2006). É controverso se a transição do granuloma sólido para necrose caseosa representaria a progressão da doença (Canetti 1959) ou se seria uma consequência necessária à resposta imune que conteve e destruiu o bacilo (Canetti 1955).

Em camundongos, estudos imunohistoquímicos revelaram que os linfócitos T (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺), neutrófilos e células dendríticas não estabelecem um padrão de localização no granuloma, que as células B formam agregados bem organizados cercados por macrófagos, e

que as células gigantes multinucleadas estão ausentes, bem como a necrose caseosa ao centro. Polimorfonucleares como os neutrófilos também estão presentes (Gonzalez-Juarrero et al. 2001, Ulrichs et al. 2004).

Os processos utilizados pelas células para o seu desenvolvimento e homeostasia, como a apoptose e autofagia, vem sendo explorados também como mecanismos de defesa do hospedeiro (Bocchino et al. 2005; Deretic & Levine 2009; Behar et al. 2011). A apoptose é a morte programada da célula infectada, que induz a formação de vesículas contendo os destroços celulares (corpos apoptóticos) removidos por outras células com preservação das células saudáveis e dos tecidos adjacentes (Steller 1995, Thompson 1995). A autofagia é o mecanismo pelo qual a célula promove a renovação de suas organelas e pode também regular outras funções celulares (Deretic & Levine 2009). Conquanto a necrose caseosa seja um fato, sabe-se que o Mtb também utiliza estes mecanismos para sua sobrevivência, uma vez que foi mostrado que o gene *eis* do Mtb (do inglês, *enhanced intracellular survival* – sobrevivência intracelular melhorada) é capaz de regular a autofagia no macrófago por uma via dependente de reativos do oxigênio (Shin et al. 2010). Adicionalmente o Mtb pode bloquear a apoptose (Rojas et al. 2000), e favorecer o desenvolvimento de necrose (Abebe et al. 2011).

O desenvolvimento de lesões granulomatosas distintas em indivíduos expostos ao contato com Mtb que montaram resposta imune diferentes, sugere que o granuloma formado pode induzir a eliminação do bacilo ou a sua persistência (Young et al. 2009, Ulrichs et al. 2005). Estudos com macacos *cynomolgus* infectados, reproduzindo as características clínicas da TB latente em humanos, evidenciaram a formação de pelo menos dois tipos de granuloma num mesmo animal (Barry III et al. 2009). O tipo considerado clássico por estudos histopatológicos era o caracterizado pela necrose caseosa central composta macrófagos/fagócitos mortos, ou contendo Mtb em condições de hipóxia, por macrófagos e neutrófilos periféricos à necrose, cercados por fibroblastos (Via et al. 2008, Barry III et al. 2009). O outro tipo de granuloma era composto quase exclusivamente por fibroblastos que circundavam pouquíssimos macrófagos (Barry III et al. 2009).

Com base na hipótese da infecção ser dinâmica na TBL, (Cardona 2009) a sobrevivência do bacilo depende da sua habilidade em promover a formação de novos focos de infecção e conseqüentemente novos granulomas. A principal contribuição deste modelo seria a possível evolução do granuloma do estado de latência para a doença ativa. Neste modelo alguns bacilos estariam no estado replicativo, induzindo uma forte resposta

inflamatória que recrutaria macrófagos e neutrófilos para o sítio de infecção, enquanto outros bacilos entrariam em estado de quiescência. Durante o desencadeamento do processo inflamatório crônico, os bacilos dormentes seriam fagocitados pelos macrófagos espumosos juntamente com os debris celulares, ricos em ácidos graxos e colesterol, derivados das membranas celulares. O bacilo fagocitado pelo macrófago espumoso não seria destruído, e tão pouco se replicaria, e poderia ser drenado para outras regiões do parênquima pulmonar, dando início a nova infecção em outra região. Esse processo dinâmico poderia ocorrer até que o bacilo (contido no macrófago espumoso) alcançasse os lóbulos pulmonares superiores, onde há concentração alta de oxigênio, o que sustentaria um rápido crescimento bacteriano extracelular, induzindo forte resposta inflamatória levando a destruição celular, liquefação, podendo promover cavitações (Figura 2).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na latência ainda permanecem obscuros, sugerindo que enquanto houver equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e a baixa atividade metabólica do Mtb, não haverá nem esterelização/eliminação nem doença ativa.

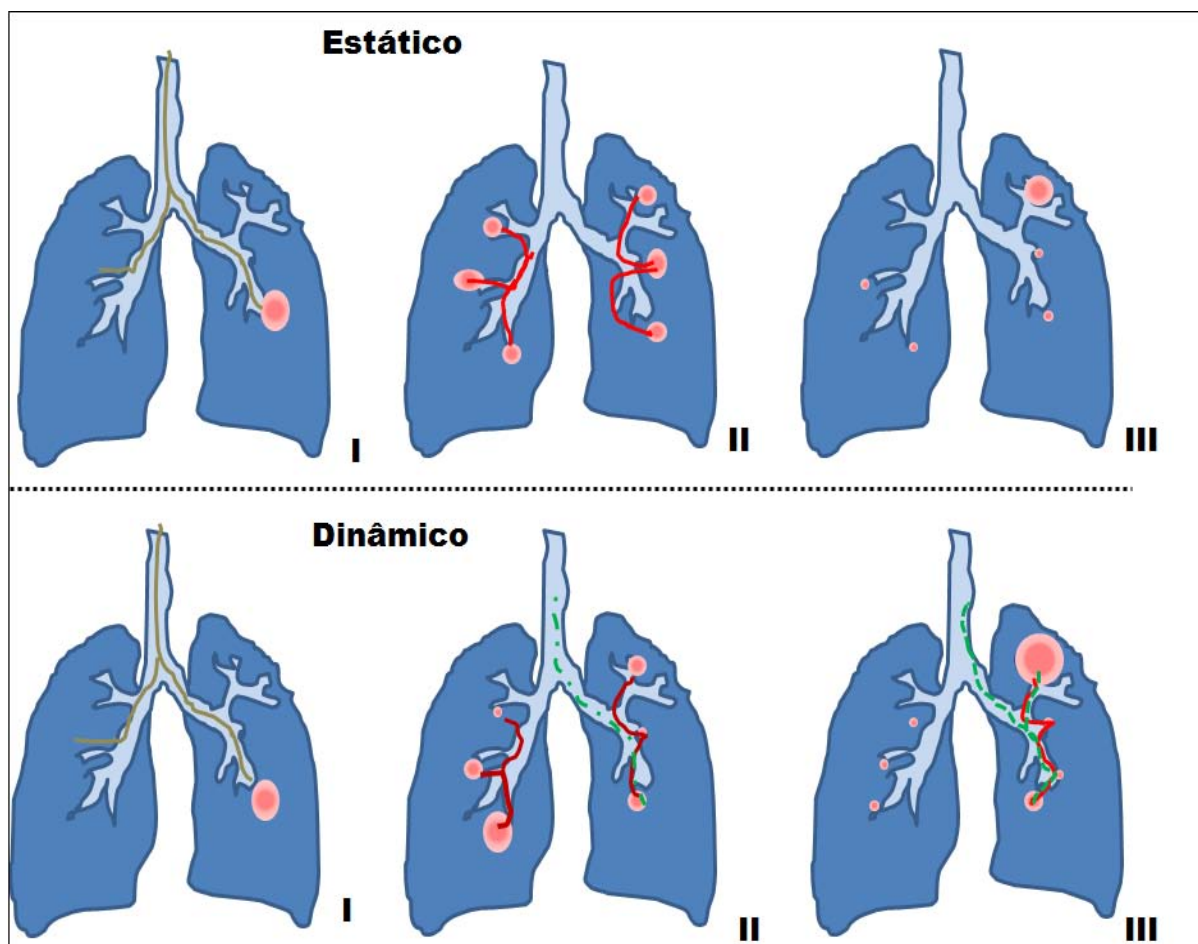


Figura 2. Hipótese da reinfecção endógena dinâmica da TBL (adaptado de Cardona 2009). Comparação do modelo de TBL estático com a hipótese dinâmica. Uma vez gerado granuloma (I), pode haver a disseminação para outros brônquios (setas vermelhas) (II). Com o desenvolvimento da resposta imune específica é controlada a infecção, o bacilo se mantém quiescente (círculos pequenos) por longos períodos até que o ambiente seja favorável à sua replicação (círculo grande) (III). N hipótese da dinâmica, a drenagem constante de bacilos quiescentes pela árvore brônquica (setas contínuas) e também por aerólios inspirados (setas tracejadas) podem transportar os bacilos e estes podem gerar novos granulomas (II). Nesse processo são geradas várias lesões até que o bacilo alcance os lóbulos superiores e consigam promover lesão com cavitação (III).

2.3. MECANISMOS DE EVASÃO DE Mtb

As estratégias utilizadas pelo bacilo para fugir da resposta imune do hospedeiro e evitar a sua extinção são conhecidos como mecanismos de evasão. A TBL poderia ser entendida como o êxito obtido pelo bacilo na execução dos mecanismos de evasão.

O Mtb apresenta já na sua parede celular substâncias capazes de inativar a ação de radicais livres de oxigênio como o superperóxido dismutase, catalase, peroxidase e o sistema tioredoxina (Daffé & Ettiene 1999). Tem sido mostrado que LAM de Mtb podem inibir a proliferação de linfócitos T (Sibley et al. 1988), interferindo indiretamente na ativação de macrófagos pelo IFN- γ (Chan et al. 1991). Macrófagos espumosos contendo LAM, predominantes em TB avançada, foram capazes de, parcialmente, induzir apoptose de linfócitos TCD4⁺ através de CD95/CD123 em camundongos BALB/c (Ríos-Barrera et al. 2006).

Posteriormente à sua fagocitose o bacilo evita o seu processamento, impedindo: a acidificação do lisossoma pelo uso da bomba de prótons via ATPases (V ATPase) (Crowle et al. 1991, Sturgill-Koszycki et al. 1994), a maturação do fagossoma pela retenção da proteína TACO, e das proteínas Rab5, Rab14 e GTPases, na membrana do fagossoma, e a sua subsequente fusão com o lisossoma (Kyei et al. 2006, Deretic et al. 1997, Ferrari et al. 1999). Há evidências de que o reconhecimento de Mtb pelo receptor CR3 do complemento evita a explosão respiratória (estresse oxidativo) e bloqueia a maturação do fagossoma que o contém (Sturgill-Koszycki et al. 1994). Contudo, o bacilo parece dispor também de genes que conferem resistência ao estresse oxidativo, caso os mesmos sejam ativados, como os genes *noxR1* e *noxR3*, que quando transferidos a bactérias suscetíveis, as mesmas foram capazes de sobreviver a este efeito (Ehrt et al. 1997, Ruan et al. 1999).

Estudos *in vitro* sugerem que o bacilo também é capaz de modular a apresentação via MHC-II. Esta função acontece principalmente pelo sequestro intracelular dos heterodímeros imaturos que compõe o MHC e a inibição de sua expressão membranar. A glicoproteína de 25-kDa e a lipoproteína de 19-kDa de Mtb estão envolvidas nestes mecanismos. A ação da lipoproteína é dependente do seu reconhecimento via TLR-2 (Wadee et al. 1995, Noss et al. 2001). Também pode ocorrer pela inibição da expressão gênica de IFN- γ e do transativador de classe II (Hmama et al. 1998, Chan et al. 1991, Wojciechowski et al. 1999).

Como última tentativa de sobrevivência, diante de um microambiente desfavorável ao seu crescimento (hipóxia e estresse oxidativo), o Mtb aumenta a expressão de genes envolvidos na indução da dormência (Wayne & Sramek 1979, Voskuil et al. 2004). Estudos in vitro mostraram que genes do operon *mce* (Dunphy et al. 2010) e os responsáveis por algumas fosfolipases (Raynaud et al. 2002) estão associados à persistência/sobrevivência do Mtb em células de mamíferos. Também já foi mostrado que genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo dos ácidos glioxilatos, fonte alternativa de obtenção de energia (Wayne & Lin 1982, Smith et al. 2003), e proteínas envolvidas na manutenção da parede celular (Hu & Coates 1999, Hu et al. 2006) tem sua expressão aumentada na fase não replicativa do bacilo.

2.4. ANTÍGENOS DE Mtb UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DE TB

Proteínas secretadas além dos componentes da sua parede celular constituem os principais antígenos de Mtb. Dentre eles, o mais conhecido é o PPD (Seibert 1934). O PPD é utilizado no teste de triagem de infecção por Mtb, também conhecido como prova tuberculínica (PT) (Menzies 1999).

O avanço das técnicas moleculares, como o sequenciamento genômico, a clonagem, expressão e purificação de proteínas acelerou a identificação de novos antígenos de Mtb, a serem utilizados principalmente em testes de diagnóstico de TB (Abebe et al. 2007). Os antígenos que despertaram maior interesse e têm a sua aplicabilidade mais explorada são as proteínas mais expressas no filtrado de cultura de Mtb submetido à condições de estresse (Sonneberg & Belisle 1997, Samanich et al. 1998). Dentre outras estão o complexo antígeno 85 (Ag-85), a malato sintase (GLcB), a MPT51, e a Hsp_x. Algumas proteínas identificadas no filtrado de cultura são codificadas pela região de diferença RD1 (do inglês, region of difference 1) do Mtb ausente no *M.bovis* BCG, *M. avium* e na maioria das micobacterias ambientais (Sorensen et al 1995, Andersen et al. 2000), como as proteínas ESAT-6 (do inglês, early secretory antigen target 6) e CFP-10 (do inglês, culture filtrate protein 10). Além dessas proteínas os componentes da parede celular do bacilo também têm sido avaliadas quanto à sua imunogenicidade, como a lipoproteína de 38-kDa e a glicoproteína de 19-kDa.

A maior fração das proteínas secretadas pelo Mtb no filtrado de cultura é composta pelo complexo Ag85, uma família de proteínas (Ag85A, Ag85B e Ag85C), na qual a fração

Ag85B (30-kDa, Rv1886c) é a predominante, e encontrada já no terceiro dia da cultura (Wiker & Harboe 1992, Lim et al.1999). Essas proteínas possuem atividade mycolil transferase e são utilizadas na biosíntese do fator corda (trealose dimeticolato), componente de grande imunogenicidade do Mtb (Belisle et al. 1997). A produção destas proteínas *in vitro* também pode ser confirmada pela secreção de proteínas do Ag85 por monócitos humanos infectados por Mtb (Sable et al. 2007). Títulos de anticorpos anti-Ag85 têm sido em associados à pacientes sem lesões cavitárias (Samanich et al. 2001, Sanchez-Rodriguez et al. 2002) e a detecção das proteínas do complexo Ag-85 também foi proposta para diagnóstico de TB (Kashyap et al. 2007).

A malato sintase (Rv 1837c), também conhecida por GLcB ou MTB81, é uma proteína de 88-kDa, homóloga à GLcB encontrada em *Corynebacterium glutamicum* e em *Escherichia coli*, com atividade enzimática na via de síntese de glicose-oxalato, catalisando a assimilação de carbono como fonte de energia para o bacilo (Smith et al. 2003), que não é utilizada por mamíferos. Outra função atribuída à malato sintase é a de adesão à laminina e fibronectina das células epiteliais pulmonares pelo seu domínio C terminal (Kinhikar et al. 2006). Essa proteína induz forte resposta humoral em pacientes com TB (Laal et al. 1997; Almeida et al. 2008), em particular em pacientes com TBP coinfectados com HIV (Samanich et al. 2000). Corroborando com esta idéia o estudo de Singh e colaboradores sugeriu que a malato sintase é imunodominante em indivíduos com TB-HIV negativos e TB-HIV positivos, sendo que nestes últimos os anticorpos anti-GLcB estão presentes meses antes da manifestação clínica da doença (Singh et al. 2005). Além disso, a participação da malato sintase no ciclo da glicose-oxalato é alvo de estudos para desenvolvimento de novos fármacos anti-Mtb (Florczyk et al 2001; Smith et al. 2003).

A MPT51 (Rv3803c) é uma proteína de 27-kDa, também conhecida como Ag85D, codificada pelo gene FbpC1 adjacente ao gene FbpA que codifica as proteínas do complexo Ag85, entretanto não possui atividade mycolil-transferase daquela família de proteínas e sua função está relacionada à ligação ao tecido do hospedeiro através da fibronectina (Wilson et al. 2004). Em estudo realizado no centro-oeste brasileiro, a dosagem de anticorpos contra as proteínas MPT51 conseguiu distinguir pacientes com TBP de pacientes com hanseníase e de controles saudáveis (Almeida et al. 2008). Singh e colaboradores mostraram que pacientes com TB coinfectados com HIV já apresentaram anticorpos anti-MPT51 quando a TB encontrava-se na fase subclínica (Singh et al. 2005).

A Hsp_x (Rv2031c) é uma proteína de 16-kDa expressa em altas concentrações quando o bacilo encontra um ambiente hostil no hospedeiro, como a privação de oxigênio, nutrientes, baixo pH e acúmulo de radicais livres, localizada no citosol e específica do complexo Mtb (Wayne 1994, O'Toole et al. 2003). Foi mostrado também que a Hsp_x pode funcionar como uma chaperonina, auxiliando na manutenção da conformação final das proteínas recém formadas (Qamra et al. 2005). Estudos *in vitro* mostraram que a deleção do gene que codifica esta proteína impede que a bactéria diminua o ritmo de crescimento, sugerindo que ela esteja relacionada à capacidade do bacilo de se manter num estado não replicativo, associado à TBL (Hu et al. 2006). Vários estudos corroboram com esta idéia e sugerem que a presença de anticorpos anti-Hsp_x esteja correlacionada com a fase subclínica (latente) de TB (Beck et al. 2005, Davidow et al. 2005, Demissie et al. 2006, Rabahi et al. 2007).

As proteínas ESAT-6 de 6-kDa (Rv3875) e CFP-10 de 10-kDa (Rv3874) são expressas logo após a infecção pelo Mtb (Andersen et al. 2000). A região RD1 que codifica essas proteínas também está relacionada à virulência do bacilo, o que pode explicar a grande capacidade imunogênica da ESAT-6 e da CFP-10 (Brodin et al. 2005). Testes de diagnóstico de TB foram propostos com base na produção de IFN- γ pelas células do sangue periférico após estimulação com ESAT-6 e CFP-10, justamente pela ausência da região RD1 no BCG (Barnes 2004, Mori et al. 2004), conferindo maior especificidade ao teste. Ambas estão associadas à resposta imune protetora em modelos animais e além de serem reconhecidas por anticorpos do soro de pacientes com TB (Kanaujia et al. 2003, Wu et al. 2010). Foi proposto o uso de ESAT-6 e CFP-10 em teste intradérmico para identificação de infecção latente pelo Mtb em modelo animal (Weldingh & Andersen 2008), entretanto Demissie e colaboradores sugeriram que o ESAT-6 seria bom marcador de progressão da doença e o Hsp_x seria específico para portadores de infecção latente por Mtb (Demissie et al. 2006).

A lipoproteína de 38-kDa (Rv 0934), também conhecida como antígeno 5, está exposta na superfície do bacilo e está relacionada ao transporte de fosfato. O antígeno de 38-kDa foi utilizado no desenvolvimento de vários testes de diagnóstico disponíveis comercialmente, tanto para identificação de TBP quanto das formas extrapulmonares (Harboe & Wiker 1992). Sua associação com outros antígenos também foi proposta na detecção de anticorpos específicos em pacientes com TB coinfectados com HIV (Thybo et al. 1995, Wilkinson et al. 1997, Ramalingam et al. 2003). Entretanto sua especificidade e sensibilidade

em pacientes de TB com baciloscopia negativa é baixa, variando também de acordo com a população estudada (Wilkinson et al. 1997, Cole et al. 1996, Lodes et al. 2001, Demkow et al. 2004).

A lipoproteína de 19-kDa (Rv3763) também está exposta na superfície do bacilo, entretanto alguns componentes do complexo Mtb não expressam essa proteína (Lathigra et al. 1996) e alguns estudos sugeriram que ela não é essencial para crescimento e virulência do bacilo (Mahenthiralingam et al. 1998, Yermeev et al. 2000). A lipoproteína de 19-kDa se mostrou imunogênica e é reconhecida pelo soro de pacientes com TB (Greenaway et al. 2005, Jackett et al. 1988), apresentando correlação inversa entre o título de anticorpos anti-19-kDa e o número de lesões nos pulmões dos pacientes (Bothamley et al. 1992).

2.5. DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE ATIVA E LATENTE

A rotina médica para diagnóstico da TB inclui os exames clínico, radiológico e laboratorial. A identificação do agente etiológico em espécimes do trato respiratório inferior (TBP) ou de outros sítios de infecção (TB extrapulmonar) constitui a base do diagnóstico laboratorial da TB. A pesquisa de bacilo ácido resistente (BAAR) no escarro, chamada de baciloscopia, e a radiografia de tórax são os primeiros a serem solicitados. A broncoscopia, recomendada para os indivíduos que não apresentam expectoração espontânea, e a cultura de espécimes biológicos, especialmente do escarro, podem também ser utilizadas no diagnóstico da TB (Comissão de Tuberculose da SBPT, 2009). A baciloscopia (BAAR) e a cultura em meio Löweinsten-Jensen de escarro de indivíduos sintomáticos ainda são considerados testes padrão ouro no diagnóstico, especialmente em países em desenvolvimento (Waard & Robledo 2007).

A baciloscopia apresenta baixo custo e relativa rapidez na emissão do resultado, entretanto a sua sensibilidade é muito variável (50-80%), podendo comprometer o diagnóstico em indivíduos com baixa carga bacilar que frequentemente apresentam resultado negativo (Steingart et al. 2006). No Brasil a técnica de coloração utilizada na baciloscopia é a de Ziehl-Neelsen. Outro tipo de coloração é a com auramina, que apresenta acurácia semelhante a do Ziehl-Neelsen e com tempo de leitura menor, entretanto necessita de técnicos treinados e tem custo mais elevado, sendo recomendada em laboratórios que processem de 30-50 amostras por dia (Comissão de Tuberculose da SBPT, 2009). O teste de cultura se mostra mais sensível

e específico, conseguindo detectar o bacilo mesmo em pacientes paucibacilares, entretanto o longo tempo exigido para sua realização (3-4 semanas em meio sólido e 10-14 dias em meio líquido) constitui sua grande desvantagem (Dorman 2010).

A PT é ferramenta auxiliar no diagnóstico da TB. Consiste na avaliação da resposta imune mediada por células na forma de hipersensibilidade tardia em resposta ao derivado protéico purificado (PPD) de cultura do complexo Mtb aplicado intradermicamente. Recentemente foi mostrado que a maioria das células colhidas em biópsia de pele após estimulação intradérmica eram linfócitos apresentando um fenótipo de células primadas/memória (CD45RA⁻, CD45RO⁺), sustentando o princípio utilizado pela PT (Vukmanovic-Stejić et al. 2008).

Várias são as limitações da PT: baixa especificidade em países onde há a vacinação com o BCG e a exposição à micobactérias ambientais; baixa sensibilidade em indivíduos em condições de imunodepressão (HIV positivos, desnutridos, doença autoimune); variabilidade na interpretação do resultado (dependente de técnicos treinados); e exige uma segunda visita do indivíduo testado para a realização da leitura do teste (Pai et al. 2004).

A PT é amplamente utilizada na triagem de TBL em indivíduos expostos à infecção como os contatos de pacientes com doença ativa e trabalhadores da área da saúde, nos quais é sugerida a avaliação regular do risco de infecção para controle de TB ocupacional (Kritski 1993). Este controle é realizado pelo tratamento profilático dos indivíduos. Em consequência disso, surgiram peculiaridades na interpretação do teste, como os efeitos booster e conversão (Menzies 1999), uma vez que os candidatos ao tratamento são aqueles que convertem a PT. A associação entre os fenômenos booster ou conversão e desenvolvimento de TB ativa ainda precisa ser elucidado, mas acredita-se que indivíduos recém infectados (conversão tuberculínica) têm chances aumentadas de se tornarem pacientes nos dois anos subseqüentes à infecção por Mtb (AMS 2000). O efeito booster se refere a um chamado à memória da resposta imune específica (segundo teste realizado em 4 semanas) em indivíduos prévia ou remotamente expostos a antígenos micobacterianos, após um primeiro teste (Thompson et al. 1979). A conversão tuberculínica se refere a um aumento na induração cutânea no segundo teste (realizado após 6 semanas até um ano) provavelmente em função de uma infecção recente após um primeiro teste negativo. A distinção entre os dois fenômenos pode ser complicada, e além do intervalo de tempo entre os testes, o do status da vacinação com BCG,

os aspectos clínicos também devem ser considerados para que a interpretação seja fidedigna (Menzies 1999).

A ocorrência destes fenômenos varia com a população em questão. Em um estudo conduzido pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention) americano com trabalhadores da área da saúde taxas de booster de 0 a 9.7% foram encontradas (Sepkowitz et al. 1997). Estudos realizados no Brasil mostraram que nos trabalhadores brasileiros esta taxa variou de 5.8 - 8.4% (Muzy de Souza et al. 1998, Silva et al. 2001, Teixeira et al. 2008). Também no Brasil, um estudo em uma coorte de contatos de pacientes com TBP constatou a ocorrência do efeito booster em 6% da população estudada (Salles et al. 2007).

A conversão tuberculínica foi detectada em 3.9% dos indivíduos de um hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro e em 6% dos contatos de uma coorte de contatos de pacientes com TBP também naquela cidade (Silva et al. 2002, Cailleaux-Cezar et al. 2009). Em países com alta taxa de incidência de TB, como Uganda, foi encontrada taxa de conversão de 27% dentre contatos de pacientes com a doença ativa (Whalen et al. 2006). Apesar de todas as intercorrências que envolvem a PT, ela ainda é utilizada, especialmente em países em desenvolvimento. Uma adaptação na técnica substituindo o PPD pelos antígenos ESAT-6 e CFP-10, foi proposta para melhor diagnóstico da TBL em humanos (Aggerbeck & Madsen 2006, Bergsted et al. 2010).

Os ensaios para diagnóstico de TB baseados na resposta imune contra o Mtb vêm sendo propostos em substituição ao de detecção da micobactéria que é a base do teste em uso (baciloscopia). Estes testes apresentam vantagens como uma maior rapidez e simplicidade na obtenção dos resultados em comparação à microscopia.

Um dos testes imunológicos propostos para diagnóstico de TB, que se baseia na imunidade celular, é o chamado IGRA (do inglês Interferon-gamma release assay). Este teste quantifica a produção de IFN- γ por células T sensibilizadas com antígenos do Mtb. Dois tipos de IGRA estão disponíveis comercialmente: o QuantiFERON TB Gold, (Cellestis Ltd, Carnegie, Australia) e o T-SPOT.TB (Oxford Immunotech, Abingdon,UK). Ambos utilizam os antígenos ESAT-6 e CFP-10 como estímulo para as células produzirem IFN- γ , mas as técnicas em que se baseiam são diferentes, o ELISA e ELISpot respectivamente. Uma nova versão do QuantiFERON TB foi desenvolvida, e uma das melhorias técnicas foi a adição do antígeno TB 7.7, também codificado pela região RD1 ausente no *M.bovis* BCG, passando a

se chamar então QuantiFERON-TB Gold IT, também disponível comercialmente (Pai et al. 2004).

O desempenho destes IGRAs tem sugerido que eles possuem maior sensibilidade que a PT (Pai et al. 2008, Al-Orainley 2009). Entretanto, o custo destes testes é muito alto, cerca de \$30-40 dólares cada (Al-Orainley 2009), e a maioria dos estudos sobre sua aplicabilidade foi realizado em países de baixa incidência de TB (Pai et al. 2008, Al-Orainley 2009). Dheda e colaboradores mostraram que os IGRAS em áreas cobertas pelo BCG e de alta incidência de TB apresentam sensibilidade reduzida e acabam tendo desempenho semelhante à PT, que tem um custo muito menor (Dheda et al. 2009).

A detecção de anticorpos contra antígenos de *Mtb* constitui a base de outro tipo de teste imunológico (Beck et al. 2005, Davidow et al. 2005, Demissie et al. 2007, Rabahi et al. 2007, Senol et al. 2007, Abebe et al. 2007). A técnica mais utilizada nestes testes, também chamados sorológicos, é a do ensaio imunoenzimático (do inglês, enzyme linked immunosorbent assay – ELISA (Safi 2010). Os antígenos utilizados nos testes sorológicos são associados às fases da doença, bem como os perfis sorológicos específicos associados a eles (Davidow et al. 2005, Demissie et al. 2006, Rabahi et al. 2007, Sartain et al. 2006).

Uma recente metanálise que avaliou o desempenho de testes para diagnóstico de TB disponíveis comercialmente revelou que a associação de antígenos contribui para a acurácia do teste, a sensibilidade varia com o *status* da baciloscopia do paciente e que não há estudos suficientes para determinar a acurácia dos testes disponíveis em crianças e indivíduos imunodeprimidos (Steingart et al. 2007), e talvez por estas razões ainda não tenham indicação de uso clínico. Contudo, os testes sorológicos apresentam vantagens como rapidez na obtenção do resultado, o baixo custo, e o fato de não exigir células vivas (como nos ensaios baseados na imunidade celular) que ainda os fazem fortes candidatos ao êxito no diagnóstico da TB, especialmente em países em desenvolvimento (Abebe et al. 2007).

A identificação da TBL é feita pela PT até os dias atuais, entretanto o seu resultado pode sofrer interferência da exposição a micobactérias ambientais (Pai et al. 2004), e em área de incidência de hanseníase, da exposição ao *Mycobacterium leprae* (Dupre et al. 1990, Silva et al. 2009). A influência da vacina BCG é moderada e tem duração de poucos anos após sua administração (Wang et al. 2002). A substituição da PT pelos IGRAs tem sido proposta, especialmente na triagem de indivíduos com doenças autoimunes em uso de bloqueadores de

TNF- α (Hyrich et al. 2004, Villiger et al. 2009). O desempenho obtido pelo IGRA na identificação de TBL é semelhante ao obtido no diagnóstico de TB ativa.

Ambos os testes, PT e IGRA, não são capazes de diferenciar entre doença ativa e latente. Os testes sorológicos para diagnóstico de TB ainda não foram amplamente estudados para sua aplicação na fase latente da doença, entretanto evidências de que indivíduos infectados latentes apresentam anticorpos específicos para alguns antígenos de Mtb associados à fase latente, como o Hsp α (Demissie et al. 2006, Davidow et al. 2005, Rabahi et al 2007) sugerem que este é um campo a ser explorado.

3. JUSTIFICATIVA

A tuberculose (TB) permanece até os dias atuais como um problema de saúde pública. A OMS estima que um terço da população mundial esteja infectado por Mtb. O Brasil é considerado área endêmica de TB, e apesar da taxa de incidência em 2007 ter caído em relação a 2005, ainda apresenta 38.2 casos a cada 100.000 habitantes (SVS 2009). Atualmente um dos principais desafios no controle da tuberculose é a identificação dos portadores latentes.

Cerca de 2-5% dos indivíduos infectados latentes pode desenvolver TB ativa após supressão do sistema imune (Dye et al. 1999). Os indivíduos que têm chances aumentadas de se tornarem latentes são, por exemplo, os contatos de pacientes com doença ativa, trabalhadores da área da saúde (AMS 2000, Hyrich e al. 2004). A identificação de quais indivíduos com TBL (tuberculose latente) teriam chances maiores de evoluir para doença ativa permitiria uma intervenção específica neste grupo com possível impacto no controle de TB, já que o desenvolvimento desta doença ocorre principalmente nos dois anos subsequentes à infecção (AMS 2000).

O teste utilizado para o diagnóstico de TBL ainda é a PT, que não distingue infecção recente e antiga, tão pouco funciona em indivíduos em uso de imunossuppressores, portanto a validação de um teste de triagem que fosse de baixo custo, rápido, de simples realização, reprodutível e capaz de identificar a TBL recente nestes indivíduos teria grande importância para saúde pública.

A técnica de ELISA apresenta parâmetros de sensibilidade e especificidade relativamente superiores quando comparados com a PT. A determinação dos níveis de IgM e IgG de indivíduos com tuberculose latente pode fornecer dados importantes que identifiquem a infecção pelo Mtb em estágio mais precoce, podendo dessa forma discriminar pacientes TB ativos de TB latente e assim contribuir para a prevenção da doença. Portanto, a identificação e o tratamento de pacientes com TBL recente preservariam a saúde do indivíduo e protegeriam a população, eliminando uma fonte potencial de disseminação da doença (Jasmer et al. 2002).

Anteriormente nosso grupo de pesquisa mostrou que trabalhadores da área da saúde recém infectados (convertidos) por Mtb apresentaram níveis de IgM anti-Hspx aumentados em relação aos trabalhadores não infectados e aos infectados latente (PT positiva) (Rabahi et

al. 2007). Este resultado nos motivou a testar a acurácia deste ELISA em uma população de risco (contatos de pacientes com TBP ativa).

Esta tese é parte de um projeto maior que objetiva contribuir para o conhecimento sobre a TB, e o grupo de pesquisa que a desenvolveu faz parte da Rede Brasileira de Pesquisa em TB, entidade voltada ao desenvolvimento de conhecimento e tecnologia sobre tuberculose. A identificação da resposta imune humoral de pacientes (Almeida et al. 2008, Araujo-Filho et al. 2008), e de indivíduos mais expostos ao risco de infecção (Rabahi et al. 2007, Reis et al. 2009, Silva et al. 2010) são algumas das contribuições oferecidas por este grupo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral:

Identificar fatores epidemiológicos envolvidos na infecção por Mtb e analisar a resposta imune humoral contra Hsp_x de Mtb através do ensaio imunoenzimático (ELISA) em contatos de pacientes com tuberculose pulmonar (TBP).

4.2. Objetivos específicos:

- Identificar a infecção por Mtb nos contatos utilizando a PT;
- Avaliar os fatores epidemiológicos associados à infecção por Mtb;
- Acompanhar durante um ano os contatos dos pacientes para detectar infecção por Mtb e o desenvolvimento ou não de doença ativa;
- Quantificar os níveis plasmáticos de anticorpos IgM e IgG contra o Hsp_x nos contatos;
- Validar a técnica de ELISA para uso como teste de triagem de indivíduos com chances aumentadas de adoecimento dentre contatos recém infectados de pacientes com TBP;

5. MÉTODOS

5.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional longitudinal de contatos de pacientes com tuberculose pulmonar. Os critérios de inclusão foram: a) para os pacientes: diagnóstico de tuberculose pulmonar (TBP) - sintomatologia característica, radiografia de tórax sugestiva de TB e baciloscopia positiva (escarro/líquido bronco-alveolar) – realizado pela equipe médica nos Centros de Assistência Integral a Saúde (CAIS) da região metropolitana de Goiânia; b) para os contatos: indivíduos residentes no mesmo domicílio (ou lote), freqüentadores assíduos (no mínimo três visitas semanais) e empregados domésticos do domicílio do paciente, de qualquer sexo ou idade. Os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, e os indivíduos menores de 18 anos foram incluídos mediante autorização de seus responsáveis. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (protocolo número 161/07).

Pacientes e contatos foram recrutados nos CAIS da região metropolitana de Goiânia. Ciente do diagnóstico e depois de consultar os contatos, os pacientes autorizaram a visita do pesquisador. As visitas do pesquisador ocorreram nos seguintes momentos: ao diagnóstico do caso índice, 4 semanas, 12 semanas, 6 meses e 1 ano após o diagnóstico, nos quais foram realizados a aplicação de questionário e a prova tuberculínica (PT). O *status* da vacinação com BCG foi feito pela presença de cicatriz vacinal no braço direito do indivíduo.

Os indivíduos PT negativos foram submetidos a novo teste (após 4 semanas do diagnóstico, 12 semanas, 6 meses e 1 ano) até que fosse detectada mudança no resultado ou completado um ano. Para as famílias nas quais todos os contatos foram PT positivos no momento do diagnóstico, o acompanhamento foi feito por telefone. Todos os contatos à medida que recebiam um resultado positivo para a PT foram orientados a procurar a equipe médica responsável pelo paciente índice para avaliação da necessidade de um tratamento preventivo.

5.2. PROVA TUBERCULÍNICA

Foram aplicados intradermicamente no antebraço esquerdo 100 µl de PPD RT 23 (2 UT)(Copenhague, Dinamarca) e a leitura da induração cutânea realizada 72 horas após a aplicação. O resultado foi interpretado de acordo com parâmetros adotados pelo Ministério da Saúde (Comissão de Tuberculose da SBPT, 2009). Induração cutânea com diâmetro de 0 a 4 mm é considerado como não reator (PT negativa), com diâmetro de 5 a 9 mm é considerado reator fraco e com diâmetro maior ou igual a 10 mm, reator forte (ambos considerados PT positiva). O efeito booster foi considerado uma PT positiva (≥ 10 mm) com um aumento de pelo menos 6 mm em relação ao teste anterior, avaliado na quarta semana de acompanhamento. A Conversão tuberculínica foi considerada uma PT positiva (≥ 10 mm) com um aumento de pelo menos 10 mm ou mais em relação ao primeiro teste (diagnóstico), avaliado na quarta ou décima segunda semanas, 6 meses ou em 1 ano (Menzies 1999, Teixeira et al. 2008).

5.3. ELISA

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo heparina (BD Vacutainer®). O plasma separado, aliquoteado e congelado a -20°C até o momento da realização dos ensaios (cego). Foi utilizado o antígeno protéico recombinante, Hspx de Mtb (Rv 2031c) produzido pelo nosso laboratório como publicado anteriormente (Sonenberg & Belisle 1997). Adsorveu-se o antígeno rHspx em placas de poliestireno (50µl/poço - 2,5µg/ml – Corning Incorporated, USA) em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 por 18 horas a 4°C . Fez-se o bloqueio pela adição de 100 µl de tampão carbonato bicarbonato e leite desnatado a 1% a 37°C por 2 horas. As placas foram lavadas uma vez com tampão PBS e em seguida adicionado o plasma teste diluído em PBS leite desnatado a 0,05%, a 1/40 (IgM) e 1/100 (IgG), e incubadas por 18 h a 4°C . Posteriormente as placas foram lavadas com tampão PBS-Tween 20 a 0,5% por seis vezes. Foi então adicionado o anti-IgM ou IgG humana (Sigma) marcado com peroxidase diluído em tampão PBS leite desnatado a 0,05%, a 1/2500 e a 1/10.000, respectivamente, e incubado por 1 hora a 37°C . Novamente procedeu-se à lavagem

com PBS-Tween 20 a 0,5% por seis vezes. Adicionou-se em seguida 50 µl de substrato cromógeno (tampão citrato pH 4,5, orto-fenilenodiamina (OPD) (5µg/ml) e água oxigenada 30 volumes) e incubou-se 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Finalizou-se a reação pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 4N) e procedeu-se à leitura em espectrofotômetro (Thermo Systems Multiskan) utilizando filtro de 492 nm de comprimento de onda. Os resultados obtidos no ELISA são representativos de dois experimentos independentes, nos quais todas as amostras foram testadas em duplicata.

5.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados epidemiológicos foram tabulados e analisados utilizando o software SPSS (IBM Statistics versão 16). As análises estatísticas foram feitas utilizando testes paramétricos (distribuição normal) e não paramétricos (distribuição não normal), sendo as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. Inicialmente os contatos (177) foram agrupados em PT positivos ou negativos e as relações com os diversos fatores (sexo, idade, etc) analisadas. Posteriormente os contatos foram agrupados em conversão, os PT convertidos, e em não conversão, os que permaneceram PT negativos até o final do acompanhamento, e as relações com os mesmos fatores foram analisadas. Os resultados do ELISA foram tabulados em Excel Microsoft® (2007) e analisados utilizando o software GraphPad Prism® versão 5.0 (2009). As análises das médias das densidades óticas dos grupos foram feitas por ANOVA, teste de t de Student, Mann Whitney e curva ROC. Resultados significativamente diferentes foram considerados quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Perfil sócio-epidemiológico e avaliação da infectividade por Mtb dos contatos de pacientes com TBP atendidos nos CAIS da cidade de Goiânia nos anos de 2008 a 2009.

Com o objetivo de verificar se os contatos de pacientes com TBP estavam infectados com Mtb, contatos foram recrutados e avaliados pela prova tuberculínica (PT). Duzentos e quarenta (240) contatos de 45 pacientes foram convidados a participar do estudo, dentre eles 177 aceitaram. Considerando apenas estes indivíduos, a média de contatos por paciente foi de 3,9 indivíduos. Os dados sócio-demográficos dos contatos são mostrados na Tabela 1. Os 177 contatos eram compostos por 85 mulheres e 92 homens. A idade deles variou de 6 a 80, sendo que 14,7% (26/177) dos contatos eram menores de 16 anos. Cento e trinta e oito (77,9%) dos contatos foram vacinados com BCG, e 105 (59,3%) tinham grau de parentesco com o paciente índice. Cento e sessenta contatos (90,4%) habitavam o mesmo local e 165 (94,1%) mantinham contato diário com o paciente índice, entretanto apenas a frequência do contato (diário) pode ter influenciado o resultado da PT quando no diagnóstico ($p= 0,006$, odds ratio 7,1, 1,51-33,58, IC 95%). Cento e quarenta e cinco (82,7%) contatos vinham de um núcleo familiar. Três pacientes eram residentes de clínicas de reabilitação de usuários de drogas e álcool e seus contatos classificados como institucional (32/177). Cento e quarenta e três participantes (80,1%) não apresentavam nenhuma comorbidade, e quando constatada a existência de condição clínica crônica, a hipertensão arterial (12/177) e o diabetes mellitus (5/177) foram as mais comuns. As distribuições dos contatos de pacientes com TBP deste estudo por faixa etária, pela relação de parentesco, comorbidade e pelo grau de instrução são mostradas nos anexos.

Tabela 1. Dados sócio-epidemiológicos dos contatos de pacientes com TBP utilizados neste estudo agrupados pelo resultado da PT.

	PT ≥ 5mm	PT ≤ 4mm	
Gênero			
Feminino	50 (58,8%)	35 (41,2%)	p=0,555
Masculino	49 (53,3%)	43 (46,7%)	
Idade			
< 16 anos	13 (50%)	13 (50%)	p=0,435
≥ 16 anos	86 (57%)	65 (43%)	
BCG			
Sim	83 (60,1%)	55 (39,9%)	p=4,51
Não	16 (41%)	23 (59%)	
Parentesco			
Sim	58 (55,2%)	47 (44,8%)	p=0,05
Não	41 (56,9%)	31 (43,1%)	
Mesma Residência			
Sim	95 (59,4%)	65 (40,6%)	p=0,08
Não	4 (23,5%)	13 (76,5%)	
Frequência do contato			
Diário	97 (58,8%)	68 (41,2%)	p=0,006*
semanal	2 (16,7%)	10 (83,3%)	
Tipo de contatos			
Familiar	82 (56,6%)	63 (43,4%)	p=0,125
Institucional	17 (53,1%)	15 (46,9%)	
Comorbidade			
Presente	20 (58,8%)	14 (41,2%)	p=0,143
ausente	79 (55,2%)	64 (44,8%)	

Os contatos foram avaliados quanto à infecção por Mtb pela PT no momento do diagnóstico do paciente índice para identificação dos indivíduos infectados (PT positivos, considerados portadores de TB latente „antiga’) e os não infectados (PT negativos). Consideramos aqui a PT como teste padrão ouro para a identificação dos indivíduos infectados latentes.

No momento do diagnóstico 99 contatos foram classificados como PT positivos (infectados) e 78 como PT negativos (não-infectados). Dois contatos PT positivos (2%) de um mesmo paciente índice, adoeceram (apresentaram TBP ativa) após um (1) ano do diagnóstico do mesmo. Ambos eram do sexo feminino, com diâmetro da induração cutânea de 15 e 18 mm, com idade de 18 e 46 anos, com contato diário, habitantes da mesma residência e com grau de parentesco próximo (irmã e mãe). Dentre os não infectados, 44 indivíduos mantiveram-se PT negativos até o final do acompanhamento, 6 sofreram o efeito booster, 8 passaram a apresentar PT positiva (conversão tuberculínica), e 20 não puderam ser avaliados porque não quiseram mais submeter-se ao teste (Figura 3).

Dentre os indivíduos que sofreram booster a média do aumento na PT foi de $10 \pm 2,5$ mm, com idade entre 16-64 anos ($35,1 \pm 16,6$). Três (50%) destes contatos eram do sexo masculino e 66,7% (4/6) foram vacinados com BCG. A metade deles (3/6) tinha relação de parentesco, 50% vinham de um núcleo familiar, e todos mantiveram contato diário com o paciente índice.

Oito contatos converteram o resultado da PT, ou seja, partiram de uma PT negativa no diagnóstico ($87,5\% = 0$ mm) e sofreram um aumento ≥ 10 mm em relação a este primeiro teste, alterando o status para positivo (Figura 4). Essa mudança foi constatada na décima segunda semana após o diagnóstico para 75% deles (6/8), para 12,5% (1/8) a conversão ocorreu na quarta semana e para 12,5% (1) no sexto mês após o diagnóstico, sendo a média do aumento do diâmetro da induração cutânea de $14,5 \pm 3,7$ mm. A conversão aconteceu mais entre mulheres do que homens (5/8). A idade deles variou de 23-46 anos ($32,75 \pm 10,9$), 87,5% eram vacinados com BCG, e também 87,5% vinham de um núcleo familiar. Seis indivíduos (75%) tinham grau de parentesco com o paciente, sendo que 83.3% (5/6) eram esposo/a, filho/a ou sobrinho. Todos mantiveram contato diário e habitavam a mesma residência do paciente índice. Apenas dois destes contatos apresentaram comorbidade. Nenhum dos parâmetros avaliados parece ter influenciado a conversão da PT no grupo estudado (Tabela 2).

As características dos contatos que permaneceram PT negativos até o final do acompanhamento também são mostradas na Tabela 2. O resultado da PT nestes indivíduos não sofreu flutuações em relação ao primeiro teste (diagnóstico). Nenhum dos indivíduos que manifestou a conversão tuberculínica, ou que sofreram booster ou que continuaram PT negativos desenvolveu TBP até a finalização deste estudo.

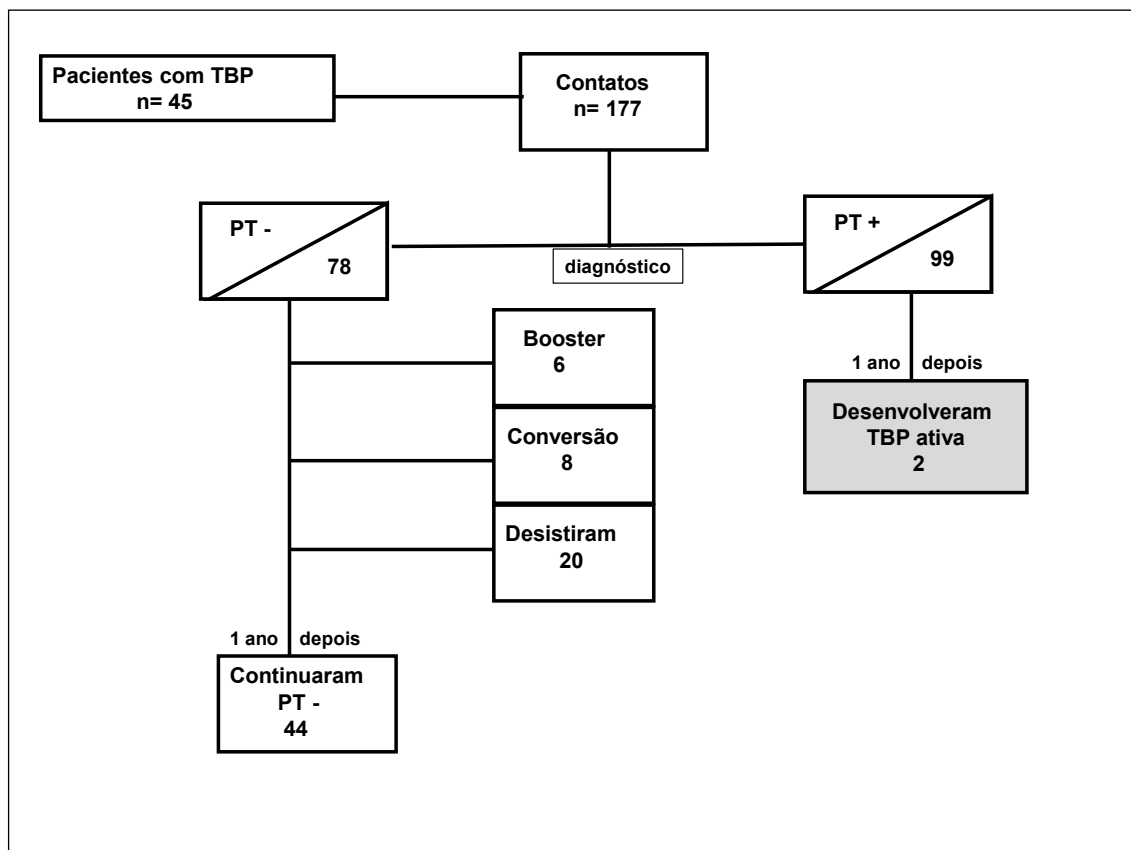


Figura 3. Contatos de pacientes com TBP foram acompanhados por 1 ano. Os contatos foram classificados pela PT no momento do diagnóstico dos pacientes, depois de 4 semanas, 12 semanas, 6 meses e ao completar 1 ano. Foram constatados os efeitos booster e conversão tuberculínica, o desenvolvimento de doença ativa, a ausência de mudança no status da PT e a desistência dos contatos.

Tabela 2. Estudo dos principais fatores de risco associados à infecção por Mtb em contatos de pacientes com TBP.

	Conversão	Não-Conversão (PT negativo)	
Gênero			
Feminino	5 (17,9%)	23 (82,1%)	p = 0,711
Masculino	3 (12,5%)	21 (87,5%)	
Idade			
< 16 anos	0 (0%)	10 (100%)	p = 0,328
≥ 16 anos	8 (19%)	34 (81%)	
BCG			
Sim	7 (17,9%)	32 (82,1%)	p = 0,662
Não	1 (7,7%)	12 (92,3%)	
Parentesco			
Sim	5 (12,5%)	35 (87,5%)	p = 0,366
Não	3 (25%)	9 (75%)	
Mesma Residência			
Sim	7 (15,6%)	38 (84,4%)	p = 1,0
Não	1 (14,3%)	6 (85,7%)	
Frequência do contato			
Diário	8 (16,7%)	40 (83,3%)	p = 1,0
semanal	0 (0%)	4 (100%)	
Tipo de contatos			
Familiar	7 (14,6%)	41 (85,4%)	p = 0,499
Institucional	1 (25%)	3 (75%)	
Comorbidade			
Presente	1 (11,1%)	8 (88,9%)	p = 1,0
ausente	7 (16,3%)	36 (83,7%)	

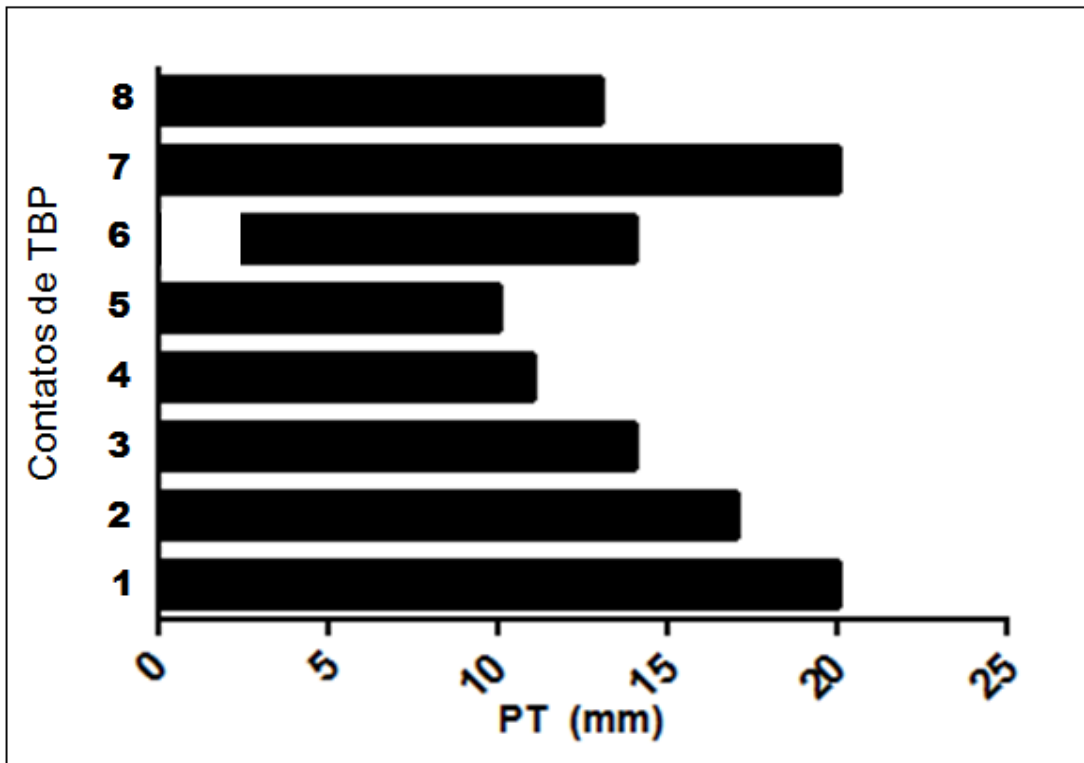


Figura 4. Variações nos resultados da PT dos contatos que converteram o teste para positivo. Cada contato é representado por uma barra horizontal; apenas um (1) contato partiu de uma PT inicial (diagnóstico) de 3 mm. O aumento médio no diâmetro da induração cutânea foi de $14,5 \pm 3,7$ mm.

6.2. Resposta Imune Humoral dos contatos de pacientes com TBP ao antígeno Hsp-x de Mtb.

Para avaliar a resposta imune humoral ao antígeno Hsp-x de Mtb dos contatos de pacientes com TBP, o teste de ELISA foi realizado para quantificar anticorpos específicos da classe IgM e IgG. Os níveis de anticorpos (densidade ótica- D.O.) contra Hsp-x dos contatos (no momento do diagnóstico, n=177) agrupados pelas características sócio-epidemiológicas são mostrados na Tabela 3. Para IgM-Hsp-x, os níveis de anticorpos foram semelhantes entre homens ($0,805 \pm 0,36$) e mulheres ($0,853 \pm 0,39$), indivíduos menores ($0,895 \pm 0,36$) e maiores de 16 anos ($0,816 \pm 0,37$), indivíduos residentes da mesma casa ($0,828 \pm 0,38$) e não residentes ($0,823 \pm 0,33$), e entre indivíduos que apresentavam comorbidades ($0,863 \pm 0,40$) e os que não apresentavam ($0,820 \pm 0,36$). Os indivíduos não vacinados ($0,908 \pm 0,43$) apresentaram níveis de IgM-Hsp-x discretamente superiores aos dos vacinados ($0,805 \pm 0,35$). A diferença sutil nas densidades óticas também ocorreu entre os contatos que apresentavam grau de parentesco ($0,849 \pm 0,39$) e os que não eram membros da família do paciente ($0,761 \pm 0,31$), para os contatos que pertenciam a um núcleo familiar ($0,849 \pm 0,38$) e aos que vinham de um núcleo institucional ($0,732 \pm 0,30$), e para os indivíduos que mantinham contato diário ($0,830 \pm 0,38$) e os que mantinham contato semanal ($0,798 \pm 0,27$) com o paciente índice.

Os níveis de anticorpos IgG foram inferiores aos de IgM. Os níveis de IgG-Hsp-x foram semelhantes entre homens ($0,238 \pm 0,08$) e mulheres ($0,241 \pm 0,12$), contatos residentes da mesma moradia que o paciente índice ($0,242 \pm 0,10$) ou não que residiam em outras moradias ($0,226 \pm 0,06$), e para os contatos que apresentavam comorbidades ($0,241 \pm 0,13$) ou não ($0,260 \pm 0,10$). Já para os contatos menores de 16 anos os níveis de IgG-Hsp-x foram superiores aos dos indivíduos maiores de 16 anos, de $0,287 \pm 0,11$ e de $0,233 \pm 0,10$ ($p=0,019$), respectivamente. Os indivíduos vacinados com BCG apresentaram níveis de IgG-Hsp-x semelhantes aos dos indivíduos não vacinados, $0,236 \pm 0,09$ e $0,252 \pm 0,13$, respectivamente. O que também ocorreu dentre os indivíduos que mantiveram contato diário ($0,240 \pm 0,10$) ou semanal ($0,246 \pm 0,08$), para os indivíduos que vinham de um núcleo familiar ($0,247 \pm 0,11$) ou institucional ($0,219 \pm 0,06$). Os contatos que tinham relação de parentesco com o paciente índice apresentaram níveis de IgG-Hsp-x ligeiramente superiores ($0,251 \pm 0,11$) aos dos que não tinham grau de parentesco ($0,208 \pm 0,06$).

Tabela 3. Títulos de anticorpos contra Hsp_x de Mtb de contatos de pacientes TBP agrupados de acordo com as características sócio-epidemiológicas.

	D.O. (IgM-Hsp _x)	D.O. (IgG-Hsp _x)
Gênero		
Feminino	0,853±0,39 (p=0,53)	0,241±0,12 (p=0,57)
Masculino	0,805±0,36	0,238±0,08
Idade		
< 16 anos	0,895±0,36 (p= 0,30)	0,287±0,11 (p=0,019)
≥ 16 anos	0,816±0,37	0,233±0,10
BCG		
Sim	0,805±0,35 (p=0,25)	0,237±0,09 (p=0,65)
Não	0,908±0,43	0,252±0,13
Parentesco		
Sim	0,849±0,39 (p=0,28)	0,251±0,11 (p=0,09)
Não	0,761±0,31	0,208±0,06
Mesma Residência		
Sim	0,828±0,38 (p=0,89)	0,242±0,10 (p=0,47)
Não	0,823±0,33	0,226±0,08
Frequência do contato		
Diário	0,830±0,38 (p=0,96)	0,240±0,10 (p=0,88)
semanal	0,798±0,27	0,246±0,08
Tipo de contatos		
Familiar	0,849±0,38 (p=0,17)	0,247±0,11 (p=0,30)
Institucional	0,732±0,30	0,219±0,06
Comorbidade		
Presente	0,863±0,40 (p=0,48)	0,241±0,13 (p=0,70)
Ausente	0,820±0,36	0,260±0,10

6.3. Avaliação da acurácia do ELISA-Hspx na discriminação de contatos convertidos dos PT positivos antigos e dos PT negativos.

Acredita-se que dentre os contatos de pacientes com TBP ativa, aqueles que convertem a PT, passam de PT negativo para positivo, são os indivíduos que apresentam maiores chances de adoecer. Avaliamos então se os níveis de anticorpos anti-Hspx de Mtb de contatos de pacientes com TBP, recém infectados (conversão tuberculínica), poderiam discriminar estes indivíduos dos contatos não infectados (PT negativa), dos latentes (PT positiva antiga) ou dos que sofreram o efeito booster. Os níveis de anticorpos anti-Hspx destes grupos são mostrados nas figuras 5 e 6. Os níveis de IgM-Hspx foram semelhantes entre os grupos ($p=0,87$), e os níveis encontrados foram de $0,841\pm 0,40$ para os contatos PT positivos, de $0,807\pm 0,32$ para os PT negativos, de $0,732\pm 0,21$ para os que sofreram conversão tuberculínica e de $0,961\pm 0,48$ para os contatos que apresentaram o efeito booster (Fig. 5). Já as dosagens de IgG-Hspx mostraram-se diferentes entre os grupos ($p<0,0002$), e os níveis de anticorpos encontrados foram de $0,242\pm 0,10$ para os PT positivos, de $0,237\pm 0,10$ para os PT negativos, de $0,140\pm 0,02$ para os que manifestaram a conversão tuberculínica e de $0,255\pm 0,22$ para os contatos que sofreram o efeito booster. Houve diferença significativa nas dosagens de IgG-Hspx entre os contatos PT positivos e os que manifestaram a conversão tuberculínica ($p<0,0001$) e entre estes últimos e os contatos que apresentaram efeito booster ($p<0,0001$) (Fig. 6). A acurácia do ELISA foi analisada pelo cálculo estatístico da curva ROC. Considerando o ELISA IgM-Hspx a área da curva foi de 0,55 e do ELISA IgG-Hspx a área da curva foi de 0,94. Os gráficos da análise da curva ROC são mostrados nos anexos.

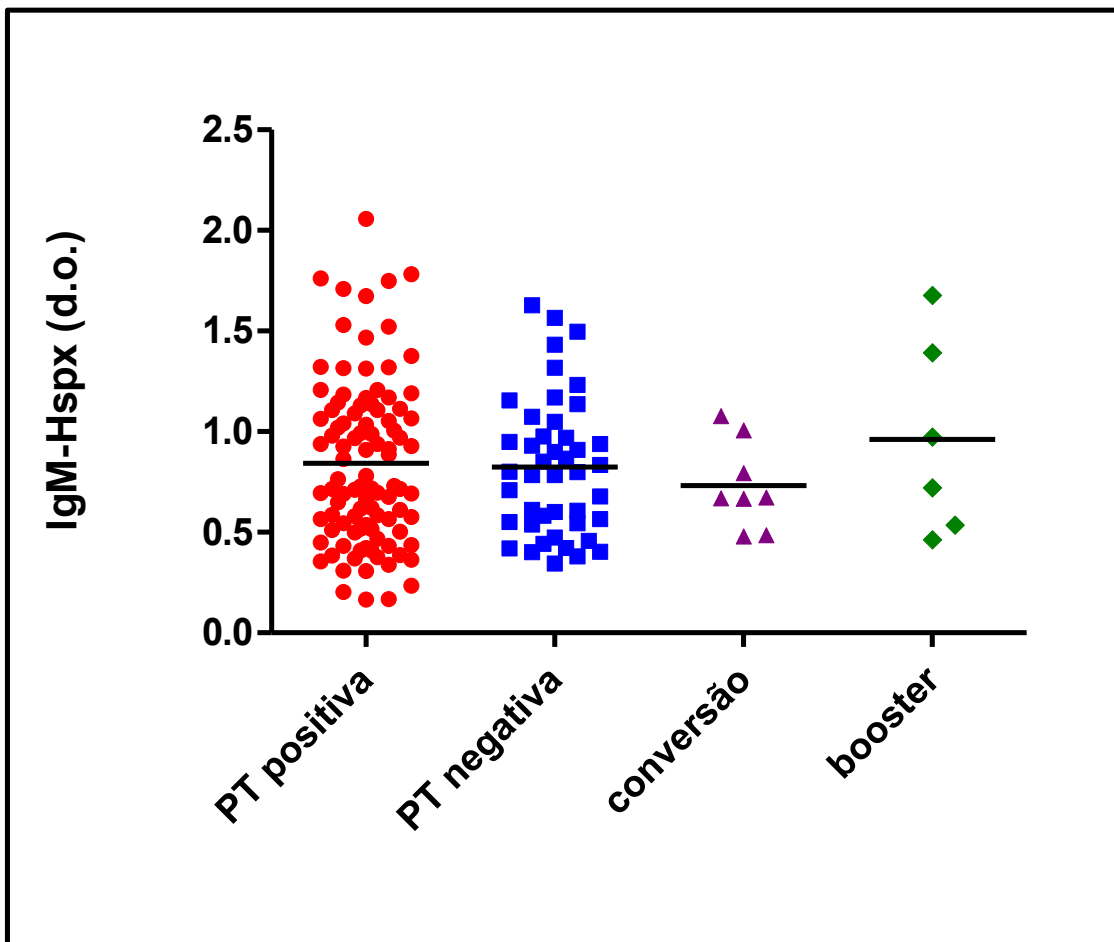


Figura 5. Dosagem de IgM anti-Hspix em contatos de pacientes com TBP. Níveis de IgM-Hspix em contatos agrupados pelo resultado da PT (positiva= 99, negativa= 44, conversão= 8 e booster= 6). Os níveis de anticorpos foram semelhantes entre os grupos ($p=0,87$).

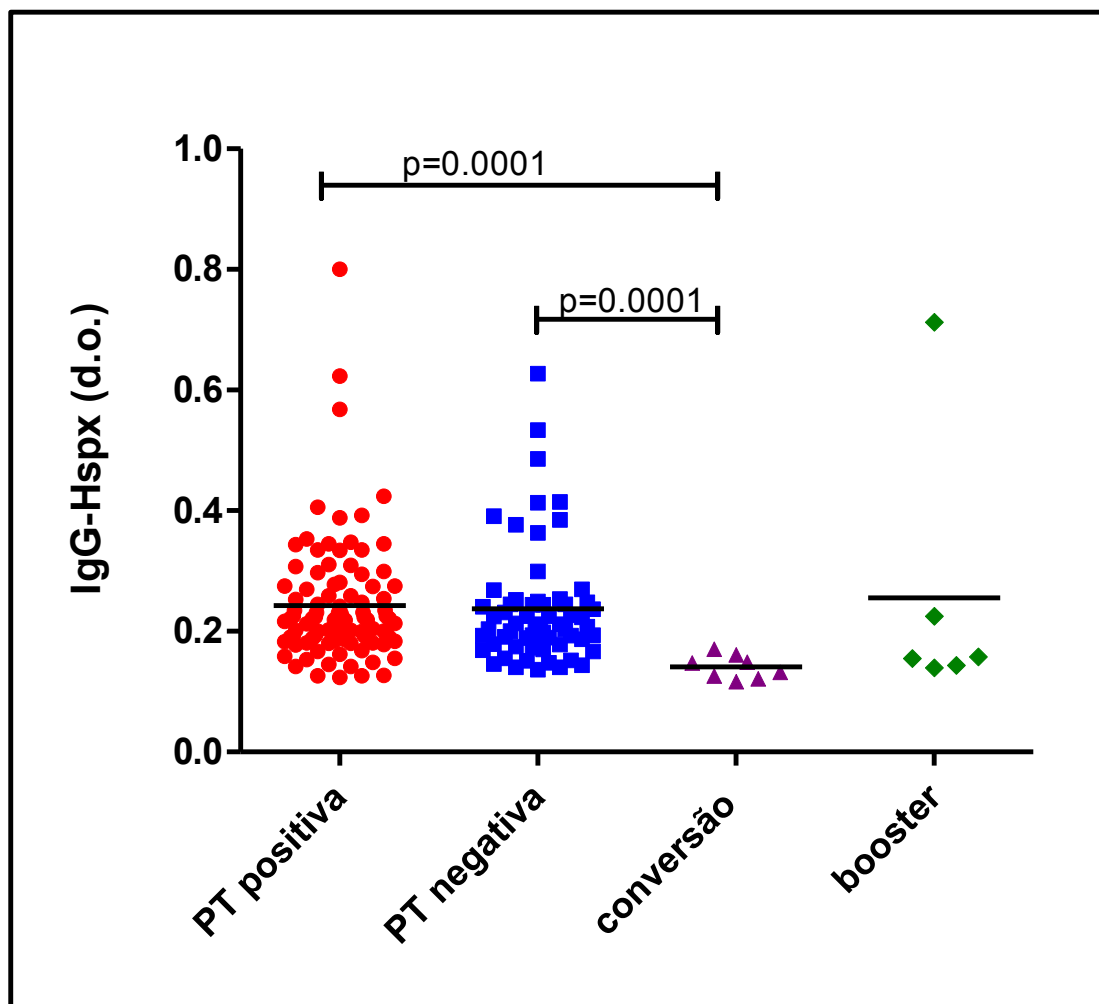


Figura 6. Dosagem de IgG anti-HspX em contatos de pacientes com TBP. Níveis de IgG-HspX em contatos agrupados pelo resultado da PT (positiva= 99, negativa= 44, conversão= 8 e booster= 6). Os níveis de anticorpos se mostraram diferentes entre os grupos ($p < 0,0002$). Os níveis de IgG-HspX foram diferentes entre contatos PT positiva e conversão ($p < 0,0001$), e entre contatos PT negativa e conversão ($p < 0,0001$).

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, 177 contatos de pacientes com TBP foram acompanhados por 1 ano, e dentre eles foram identificados indivíduos considerados infectados (PT positivos = 99) e indivíduos considerados não infectados (PT negativos = 78). Dentre os indivíduos do primeiro grupo, dois (2%) desenvolveram doença ativa e dentre os indivíduos do segundo grupo, 44 (56,4%) mantiveram-se PT negativos, 6 (7,7%) sofreram booster e 8 (10,2%) converteram a PT para positiva. A dosagem de anticorpos contra Hspx de Mtb dos contatos também foi analisada e os níveis de IgM-Hspx encontrados se mostraram semelhantes entre eles, independente do parâmetro utilizado para o agrupamento dos indivíduos (as características sócio-epidemiológicas ou o *status* da PT). Os níveis de IgM-Hspx encontrados foram superiores aos de IgG-Hspx. Os níveis de IgG-Hspx nos contatos menores de 16 anos foram superiores aos encontrados nos indivíduos maiores de 16 anos. Os contatos que sofreram conversão tuberculínica apresentaram os menores níveis de IgG-Hspx do que os contatos PT positivos, PT negativos e que sofreram booster. Nenhum dos contatos inicialmente classificados como PT negativos adoeceu.

A população estudada foi composta por adultos jovens, com ampla distribuição de idade e sexo, semelhante ao encontrado em outros estudos (Gazetta et al. 2006). A maioria dos contatos foi vacinada com BCG (77,9%), o que já era esperado visto que a vacina é administrada ao nascer no Brasil. Os contatos de pacientes com TBP mais comumente encontrados são pais, irmãos, filhos, netos (Gazetta et al. 2006, Cailleaux-Cezar et al. 2009), o que corrobora com os achados deste estudo que revelaram que a maioria dos indivíduos pertencia a um núcleo familiar, conseqüentemente habitavam a mesma residência e tinham grau de parentesco com o paciente índice. Essas características refletiram-se no tipo de contato mais registrado, o contato diário com o indivíduo doente, o que pode ter favorecido a infecção dos indivíduos que se relacionavam com ele. Características como o tempo e a intensidade do contato podem se aliar às condições clínicas do paciente e favorecer a infecção, e conseqüentemente a continuidade da doença (Menzies 1997). Além disso, também já foi mostrado que contatos intradomiciliares de pacientes com TB têm chances aumentadas de serem infectados e desenvolverem a doença (Wang & Lin 2000, Morán-Mendoza et al. 2010).

Dentre os contatos acompanhados neste estudo, 64,5% foram considerados infectados pelo Mtb. Eles foram identificados no momento do diagnóstico do paciente (99) ou no decorrer do acompanhamento (6 booster, 8 convertidos). A PT ainda é utilizada para diagnóstico de infecção por Mtb, entretanto o seu resultado não permite precisar o momento da infecção, se há doença ou não (Menzies 1999). Em estudos como este, o resultado da PT pode ser interpretado como infecção antiga, quando o resultado é positivo antes da exposição conhecida a um paciente índice (momento do diagnóstico). Ainda pode ser interpretado como infecção recente, quando o indivíduo, após exposição a um paciente índice, parte de um resultado negativo e muda para positivo após ser testado novamente (aumento no diâmetro da induração cutânea), situação conhecida como conversão tuberculínica (Teixeira et al. 2008, Whalen et al. 2006).

Estudos sugerem que o critério para avaliação de conversão deve considerar a prevalência de booster, que geralmente correlaciona-se com a prevalência de reações positivas da PT (Menzies 1999). Em função disso o critério adotado neste estudo para a conversão foi do aumento maior ou igual a 10 mm. Oito contatos (7,4%) deste estudo converteram a PT para positiva. Em populações consideradas mais expostas ao risco de infecção foram encontrados índices de conversão (3,9% e 10,7/1000, respectivamente) inferiores ao encontrado no presente estudo (Silva et al. 2002, Roth et al. 2005). Cailleaux-cesar e colaboradores em um estudo também sobre contatos de pacientes com TBP encontrou 6% de PT convertidos, sem associação significativa com o *status* da baciloscopia do paciente (Cailleaux-Cezar et al. 2009, Menzies 1997). Whalen e colaboradores constataram conversão tuberculínica em 27% dos contatos, estando a ela associada o grau de proximidade e de positividade da baciloscopia do paciente (Whalen et al. 2006). Esta associação não foi avaliada neste estudo, contudo os contatos que manifestaram a conversão tuberculínica relacionaram-se diariamente com o paciente, que tiveram baciloscopia positiva, com grau variando de 1 a 3, sendo próximo o grau de parentesco entre eles (mãe/pai, filho/a, irmã/o). Deve-se ressaltar que o tamanho amostral dos estudos é diferente, porém em nenhum deles constatou-se o desenvolvimento de doença ativa nos indivíduos que manifestaram mudança no *status* da PT.

A conversão é aceita como indício de infecção recente, e como a maioria dos indivíduos infectados (90%) consegue conter esta infecção, ela poderia estar relacionada à proteção (Teixeira et al. 2008, Comstock et al. 1982). Hussain e colaboradores mostraram que

contatos de pacientes com TBP apresentaram níveis de IFN γ e IL-10 aumentados logo após sofrerem conversão, sugerindo que a relação entre estas duas citocinas poderia estar envolvida na contenção da infecção e estabelecimento da latência, respectivamente (Hussain et al. 2009). É sugerido também que em indivíduos latentes (PT positivo, infecção antiga) a produção de IFN γ (Guio et al. 2010) e IL4 δ 2 (Demissie et al. 2004), por exemplo, esteja aumentada e que isso possa estar relacionado ao não desenvolvimento de TB ativa.

A ocorrência de outro fenômeno associado à PT também foi registrado neste estudo, o booster. O intervalo recomendado para uma melhor avaliação deste efeito é de 1 a 5 semanas após o primeiro teste (Menzies 1999). Aqui os contatos foram avaliados 4 semanas após o primeiro teste e seis deles (7.7%) manifestaram booster. Num estudo em uma população semelhante a esta foi mostrado que 6% dos contatos se encaixaram no critério deste fenômeno (Salles et al. 2007). Entretanto existem alguns fatores que podem influenciar o resultado da PT, como a sensibilização com micobactérias ambientais (Pai et al. 2004) e a vacinação com BCG. A interferência da vacinação com BCG parece improvável, visto que em regiões endêmicas como o Brasil, sua influência na PT ocorre somente durante os 10 anos seguintes à vacinação (Wang et al. 2002). Além disso, há evidências de reação cruzada com a micobactéria *M. leprae*, causadora de hanseníase, doença que também ocorre na região onde o estudo foi desenvolvido (Silva et al. 2009, Dupre et al. 1990).

Devemos acrescentar que 66,6% (4/6) dos classificados como booster apresentaram aumento superior ou igual a 10 mm (11,5 \pm 2,3), mesmo critério de conversão, entretanto como esta avaliação foi feita na quarta semana de acompanhamento, o mais provável é que seja mesmo um resgate da resposta imune de memória. Isso também foi encontrado por Salles e colaboradores, que sugeriu que a interpretação deste fenômeno pode ser difícil distinção e necessita de um número amostral significativo para que os achados sejam conclusivos (Salles et al. 2007).

Anteriormente, quando a TB acometia principalmente indivíduos de baixa renda, se estimava que o número de contatos de um paciente índice variava entre 6 a 12 indivíduos, todavia, hoje, em regiões como Goiânia, local desse estudo, o número de contatos de pacientes com TB reduziu-se (240 contatos/45 pacientes= 5,3 contatos/paciente índice). Este fato deve-se provavelmente a melhoria das condições de vida nesta região, e por conseguinte ao planejamento familiar (IBGE 2010). Neste contexto, uma população de 177 indivíduos parece pequena, entretanto representa aproximadamente 74% dos contatos dos pacientes

recrutados. Além do mais, estudos longitudinais demandam mais envolvimento e atenção da equipe para que seja bem executado.

Observou-se que com o acompanhamento durante um ano, os contatos ficaram mais atentos à sua manifestação de sintomas e aumentaram os cuidados com o paciente, certificando-se se da administração da medicação. Além disso, em caso de adoecimento, eles se mostraram mais propensos a buscar atendimento e como foram sendo esclarecidos poderiam contribuir melhor com a equipe médica na investigação clínica. Essa mudança de atitude pode ser positiva visto que contatos de pacientes estão expostos a um risco maior do que o da população em geral de serem infectados (AMS 2000) e os contatos PT convertidos a um risco 8 vezes maior de desenvolver a doença no primeiro ano subsequente à infecção (Ferebee 1970). Para o nosso conhecimento este é o primeiro estudo longitudinal abrangente feito com contatos de pacientes de TBP no Brasil, no qual eles receberam visita regular do pesquisador em seus domicílios.

As estratégias brasileiras de avaliação de contatos de pacientes com TBP candidatos à quimioprofilaxia preocupam-se principalmente com os indivíduos menores de 15 anos (Ministério Saúde 2005). Em estudo realizado no Rio de Janeiro em 2000, foram notificados 1866 casos de TB em menores de 15 anos, alcançando um coeficiente de incidência de 27/100.000, com predomínio em menores de 5 anos, sendo um indivíduo adulto, na maioria dos casos, o paciente índice destes menores (Alves et al. 2000). Entretanto aqui observamos o adoecimento de dois contatos, ambos maiores de 18 anos, com PT positiva ($\geq 5\text{mm}$) já no início do acompanhamento, um (1) ano após o diagnóstico do paciente índice. Morán-Mendonza et al. (2010) encontrou dentre fatores relacionados ao risco de adoecimento por TB, PT maior ou igual a 5mm (Morán-Mendonza et al. 2010). É inevitável especularmos se o tratamento profilático destes indivíduos não teria evitado o desenvolvimento da doença, visto que há estudos que apontam a sua eficácia (Hsu 1984, Pineda et al 2004, Saukkonen et al 2006), além de contribuir para o controle da doença. Em um estudo realizado na Turquia, país de incidência intermediária de TB, que tem estratégias semelhantes às brasileiras, sugeriu-se a quimioprofilaxia em indivíduos com idade entre 15 a 34 anos (Kilicaslan et al. 2009). Deve-se acrescentar que os contatos acompanhados neste estudo não se submeteram ao tratamento preventivo com isoniazida.

Os níveis de IgM-Hspx foram semelhantes entre contatos agrupados pelas características sócio-epidemiológicas ou pelo *status* da PT. A presença de IgM está associada

aos estágios iniciais dos processos infecciosos/inflamatórios, e seria esperado que contatos infectados, recentemente ou não, apresentassem níveis aumentados daquela imunoglobulina (Rabahi et al. 2007).

Aqui observamos níveis de IgM-Hsp_x semelhantes entre os contatos agrupados pelas características epidemiológicas ou pelo *status* da PT, inclusive nos indivíduos considerados não infectados (PT negativos). Esse resultado se junta às evidências encontradas anteriormente de que indivíduos que residem em área endêmica de TB, mesmo sendo considerados não infectados podem apresentar anticorpos contra antígenos de Mtb (Rabahi et al. 2007; Reis et al. 2009), e que os títulos de anticorpos contra antígenos micobacterianos correlacionam-se com incidência de TB na região (Hoff et al. 2007).

Foi detectada também nesta coorte de contatos de pacientes com TBP a presença de IgG-Hsp_x. Entretanto, as densidades óticas representativas da presença desta imunoglobulina foram inferiores às encontradas para IgM-Hsp_x. Este fato está de acordo com estudos anteriores que mostraram que a mudança da classe do anticorpo necessita de uma estimulação continuada, com uma demanda de tempo maior para que ela ocorra. Além disso, níveis semelhantes de IgG-Hsp_x em indivíduos PT positivos/negativos foram encontrados por Rabahi e colaboradores (Rabahi et al. 2007). Neste estudo, os contatos com idade inferior a 16 anos apresentaram níveis de IgG-Hsp_x superiores aos dos indivíduos maiores de 16 anos, semelhante ao encontrado por Watanabe e colaboradores (Watanabe et al. 1995). A presença de títulos altos de imunoglobulina IgG (contra antígenos micobacterianos) está associada à progressão/severidade de TB ativa (Davidow et al. 2005), o que corrobora com os nossos achados visto que a população de contatos aqui avaliada é composta de indivíduos saudáveis, considerados infectados ou não.

A detecção da infecção latente por Mtb é uma tarefa desafiadora e tem sido intensificada em função do risco aumentado de desenvolver TB ativa nos contatos de pacientes com a doença ativa e nos indivíduos com doenças autoimunes candidatos ao tratamento com bloqueadores de TNF- α (Bocchino et al. 2009, Silva et al. 2010). A PT ainda é a ferramenta utilizada na triagem de infecção latente (Menzies 1999) e os testes de diagnóstico de TB, que avaliam a produção de IFN- γ pela imunidade celular (IGRA) usados em países desenvolvidos e com baixa incidência de TB, também foram propostos para detecção de infecção latente, especialmente nos indivíduos com desordens autoimunes, nos quais a PT podem apresentar resultado falso negativo (Marques et al. 2009). Além disso, a PT

apresenta sensibilidade e especificidade limitadas, e não é capaz de discriminar entre doença ativa e infecção latente, assim como os IGRAs também não o são, além de também ter o seu desempenho comprometido em áreas endêmicas de TB (Pai et al. 2008).

Existem vários testes sorológicos de diagnóstico de TB disponíveis comercialmente, e um estudo recente sobre a acurácia destes testes revelou que eles têm performances variáveis, e sua sensibilidade/especificidade ainda são o principal requisito a ser melhorado (Steingart et al. 2007). A resposta imune humoral em indivíduos infectados latentes já foi demonstrada (Rabahi et al. 2007, Reis et al. 2009), entretanto não é amplamente utilizada para detecção de infecção por Mtb.

O desenvolvimento de testes para diagnóstico demanda certas características (técnicas/epidemiológicas) que lhes asseguram o sucesso (Mann et al. 2010). Neste estudo propomos o uso da dosagem de anticorpos anti-Hspx para identificação dentre os contatos recém infectados de pacientes com TBP os que têm chances aumentadas de desenvolver a doença ativa. A seleção e recrutamento da população de estudo foram corretos e o teste de ELISA proposto apresentou diferentes desfechos em função da imunoglobulina avaliada. Um limiar de reatividade (cut off) não pode ser desenhado pois os indivíduos com chances aumentadas de adoecer, os considerados infectados (recente), apresentaram níveis de anticorpos semelhantes (IgM-Hspx: ROC área=0,55) aos considerados não infectados além de não apresentavam manifestações clínicas de doença ativa. O ELISA para IgG-Hspx apresentou boa performance (ROC área=0,94), entretanto os baixos títulos deste anticorpo encontrados nos contatos que manifestaram a conversão tuberculínica compromete a sua aplicabilidade.

O antígeno de Mtb Hspx é uma proteína bem caracterizada com função relacionada à manutenção e estabilização da parede celular e das estruturas celulares do bacilo durante sua persistência no hospedeiro (Cunningham et al. 1998), e conseqüentemente perfis sorológicos anti-Hspx têm sido associados à fase subclínica (latente) da TB (Davidow et al. 2005, Demissie et al. 2006). Além disso, níveis aumentados de IFN- γ em resposta ao Hspx foi sugerido como fator preditor de TBL (Demissie et al. 2006) e níveis diminuídos desta citocina foram associados ao desenvolvimento da doença em contatos de TB (Del Corral et al. 2010).

Observamos neste estudo que os contatos que manifestaram a conversão tuberculínica apresentaram os níveis de anticorpos anti-Hspx mais baixos. O papel dos anticorpos na TB é desacreditado porque o bacilo apresenta replicação intracelular (Casadevall & Pirofski 2003)

e a sua aplicabilidade se restringe aos testes sorológicos para diagnóstico da doença ativa (Steingart et al. 2007). Entretanto, foi mostrado que há participação ativa de células B na formação de centros germinativos extrapulmonares e na contenção do bacilo em camundongos infectados com cepas de Mtb (Maglione et al. 2007). Além disso, também foi mostrado que a expressão de receptores da fração constante dos anticorpos (RFc γ) pode distinguir indivíduos não infectados, indivíduos infectados latentes e pacientes com TB (Maertzdorf et al. 2011). Embora podemos especular se a diminuição nos níveis de anticorpos nos contatos PT convertidos se deva à participação deles na resposta imune que conteve a infecção, também nenhum dos contatos dos outros grupos (booster, PT negativos, PT positivos) adoeceu.

Este estudo apresenta algumas limitações. Baseado em cálculo amostral, o tamanho ideal da população de estudo seria de 250 contatos, entretanto o tamanho alcançado correspondeu a 71% (177/250) deste número. Pode-se explicar tal fato pela baixa taxa de incidência de TB encontrada no estado onde o estudo foi realizado, além da resistência de alguns dos indivíduos em participar de estudos desta natureza. Outras deficiências do estudo foram: a não realização de exame radiológico para assegurar a ausência de doença nos contatos infectados, a realização da cultura do escarro em apenas 15,5% dos pacientes e as desistências dos contatos recrutados durante o período de estudo também configuram. Todavia, as perdas representaram uma população com características semelhantes às dos indivíduos que permaneceram no estudo quanto aos critérios avaliados. Não se pode descartar que a utilização de plasma para detecção dos anticorpos pode ter refletido na especificidade/sensibilidade do teste, visto que a maioria dos ensaios utiliza soro, comprometendo seu uso na triagem dentre os infectados latentes aqueles com chances aumentadas de adoecer. Entretanto, é mais provável que o desempenho alcançado pelo teste proposto se deva ao pequeno número amostral da população de estudo.

Este estudo corrobora com os outros que apontam a necessidade do acompanhamento de contatos de TB(P) para o controle da doença (Wang & Lin 2000, Gazetta et al. 2006, Barroso et al. 2004, Tuberculosis Research Center 2007, Lee et al. 2008, Kilicaslan et al. 2009, Morán-Mendoza et al. 2010). A PT ainda desempenha um importante papel na identificação dos indivíduos infectados por Mtb, porém mostrou-se um fator dificultador, induzindo parte dos indivíduos recrutados a desistir da participação no estudo, fato este previamente relatado por outros pesquisadores (Joseph et al. 2004). Os níveis de anticorpos

(IgM/IgG) contra rHsp_x encontrados em contatos pacientes com TBP foram similares, inclusive dentre os que sofreram conversão tuberculínica, não permitindo a validação do seu uso como fator associado ao risco de adoecimento nestes indivíduos. Esses achados enfatizam a necessidade da criação de um teste de triagem que seja capaz de referendar o tratamento preventivo de infectados latentes com isoniazida, medida que já se mostrou eficaz (Pineda et al. 2004). Além disso, levanta novamente a discussão sobre o papel da resposta humoral na resposta imune contra o Mtb.

8. CONCLUSÕES

- A prova tuberculínica identificou os contatos portadores latentes de Mtb dentre os contatos de pacientes com TBP, correspondendo a 64,5% dos contatos que participaram do estudo;
- A infecção latente (PT positiva) dos contatos no momento do diagnóstico do paciente índice foi associada ao contato diário com o mesmo;
- Os contatos foram acompanhados por 1 ano e verificou-se a ocorrência dos efeitos booster (3,4%) e conversão tuberculínica (4,5%) e o adoecimento de 2 contatos (1,1%) classificados como PT positivos;
- Os contatos, independente do critério de agrupamento, apresentaram níveis de IgM-Hspx similares entre si;
- Os contatos PT convertidos e os contatos que sofreram booster apresentaram, respectivamente, os menores e maiores níveis de IgG-Hspx quando agrupados pelo *status* da PT;
- os contatos menores de 16 anos apresentaram níveis de IgG-Hspx maiores que os maiores de 16 anos quando agrupados pelas características epidemiológicas;
- O ELISA-Hspx (IgM/IgG) não pode ser referendado como teste de triagem de indivíduos com chances aumentadas de adoecimento dentre indivíduos recém infectados por Mtb em função do número amostral do estudo.

9. RECOMENDAÇÕES

O acompanhamento de contatos de pacientes com TBP nos proporcionou a convivência com uma doença que evoluiu com a humanidade. A ignorância sobre a existência e eficiência do tratamento ainda é grande, contribuindo para a manutenção do estigma da doença. Acreditamos que a estratégia proposta pela OMS de tratamento diretamente observado (do inglês, direct observed treatment – DOT) do paciente é uma medida de longo prazo, que apesar de difícil manutenção, é eficaz e pode contribuir para o controle da doença, e deveria ser estendido aos contatos dos pacientes, visto que estes indivíduos poderão se tornar pacientes.

A técnica de ELISA continua sendo uma das opções mais viáveis no desenvolvimento de testes de diagnóstico de TB, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil. A proteína recombinante Hsp_x de Mtb ainda pode ter o seu potencial antigênico explorado por outras técnicas e em outras coortes. Além disso, existem vários antígenos identificados em culturas de Mtb que ainda não tiveram a sua imunogenicidade testada. É importante continuar o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas para todas as formas de TB, para que o controle da disseminação da doença seja alcançado. Resultados negativos obtidos hoje podem contribuir para o sucesso de experiências futuras.

10. REFERÊNCIAS

Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, Bjune G 2007. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Scand J Immunol 66(2-3): 176-91.

Abebe M, Kim L, Rook G, Aseffa A, Wassie L, Zewdie M, Zumla A, Engers H, Andersen P, Doherty TM 2011. Modulation of cell death by *M. tuberculosis* as a strategy for pathogen survival. Clin Dev Immunol 2011: 678570.

Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJ, Brown N, Mpagi J, Miyake K, Bihl F, Ryffel B 2002. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J Immunol 15;169(6): 3155-62.

Aggerbeck H, Madsen SM 2006. Safety of ESAT-6. Tuberculosis (Edinb) 86(5):363-73.

Ahmad S 2010. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. Respir Res 11: 169.

Alcais A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL 2005. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic disease. J Exp Med 202: 1617-21.

Algood HM, Lin PL, Yankura D, Jones A, Chan J and Flynn JL 2004. TNF influences chemokine expression of macrophages in vitro and that of CD11b+ cells in vivo during *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol 172: 6846-57.

Almeida CMC, Vasconcelos AC Jr, Kipnis A, Andrade AL, Junqueira-Kipnis AP 2008. Humoral immune responses of tuberculosis patients in Brazil indicate recognition of *Mycobacterium tuberculosis* MPT-51 and GlcB. Clin Vaccine Immunol 15(3): 579-81.

Al-Orainley, IO 2009. Diagnosis of latent tuberculosis: can we do better? Ann Thorac Med 4(1): 5-9.

Alves R, Sant'Ana C, Cunha AJLA 2000. Tuberculosis epidemiology in children, Brazil. Rev Saúde Pública. 34(4): 409-10.

AMS, American Thoracic Society 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Dis Crit Care Med* 161: 1371-95.

Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM 2000. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356(9235): 1099-104.

Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso, Galan JC, Cousins D, Ortega A, Blazquez J, Baquero F, Mateos A, Suarez G and Dominguez L 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* 49(3): 1263-73.

Araújo-Filho JA, Vasconcelos-Jr AC, Sousa EM, Silveira C, Ribeiro E, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP 2008. Extensively drug-resistant tuberculosis: a case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 12(5): 447-52.

Armstrong JA, Hart PD 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 142: 1-16.

Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A 2005. TLR-9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 202: 1715- 24.

Barnes PF 2004. Diagnosing latent tuberculosis infection turning glitter to gold. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 5-6.

Barroso EC, Mota RMS, Pinheiro VGF, Campelo CM, Rodrigues JLN 2004. Occurrence of active tuberculosis in households inhabited by patients with susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. *J Bras Pneumol* 30(4): 401-8.

Barry CE 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrh S, Flynn J, Schnappinger D, Wilkinson RJ, Young D 2009. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* 7(12): 845-55.

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

Behar SM, Martin CJ, Nunes-Alves C, Divangahi M, Remold HG 2011. Lipids, apoptosis, and cross-presentation: links in the chain of host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 2011 [Epub ahead of print].

Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 30;276(5317): 1420-2.

Bergstedt W, Tingskov PN, Thierry-Carstensen B, Hoff ST, Aggerbeck H, Thomsen VO, Andersen P, Andersen AB 2010. First-in-man open clinical trial of a combined rDESAT-6 and rCFP-10 tuberculosis specific skin test reagent. *PLoS One* 25;5(6): e11277.

Bermudez LE, Sangari FJ, Kolonoski P, Petrofsky M, Goodman J 2002. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 70: 140-46.

Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profile. *Mol Microbiol* 43: 717-731.

Bhatt K, Hickman SP, Salgame P 2004. Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. *J Immunol* 172: 2748-51.

Bhatt K & Salgame P 2007. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol* 27(4): 347-62.

Bocchino M, Galati D, Sanduzzi A, Colizzi V, Brunetti E, Mancino G. 2005. Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 9(4): 375-83.

Bocchino M, Matarese A, Bellofiore B, Giacomelli P, Santoro G, Balato N, Castiglione F, Scarpa R, Perna F, Signoriello G, Galati D, Ponticiello A, Sanduzzi A 2009. Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNFalpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27(10): 907-13.

Bothamley GH, Rudd R, Festenstein F, Ivanyi J 1992. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax* 47(4): 270-5.

Brennan PJ 2003. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb) Elsevier* 83(1-3): 91-7.

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 30;285(5428): 732-6.

Brodin P, Jonge MI, Majlessi L, Leclerc C, Nilges M, Cole ST, Brosch 2005. Functional Analysis of Early Secreted Antigenic Target-6, the Dominant T-cell Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, Reveals Key Residues Involved in Secretion, Complex Formation, Virulence, and Immunogenicity. *J Biol Chem* 280(40): 33953-9.

Brookes RH, Pathan AA, McShane H, Hensman M, Price DA, Hill AV 2003. CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. *Eur J Immunol* 33: 3293-3302.

Buettner M, Meinken C, Bastian M, Bhat R, Stossel E, Faller G, Cianciolo G, Ficker J, Wagner M, Rollinghoff M, Stenger S 2005. Inverse correlation of maturity and antibacterial activity in human dendritic cells. *J Immunol* 174: 4203.

Cailleaux-Cesar M, Melo AD, Xavier GM, Salles CLG, Mello FCQ, Ruffino-Netto A, Golub JE, Efron A, Chaisson RE, Conde MB 2009. Tuberculosis incidence among contacts of active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 13(2): 190-95.

Canetti G 1955. *The tubercle bacillus in the pulmonary lesion in man*. New York: Springer publishing Co., p.226.

Canetti G 1959. Changes in tuberculosis as seen by a pathologist. *Am Rev Tuberc* 79: 684-86.

Cardona PJ 2009. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection* 37: 80-86.

Casadevall A, Pirofski L 2003. Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24(9): 474-478.

Castella MA 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16(1): 21-6.

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184(2): 747-52.

Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun* 59(5):1755-61.

Chan J, Flynn J L 1999. Nitric oxide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In: Fang, F C, editor. *Nitric oxide and infection*. New York: Kluwer Academic Plenum 281-310.

Chan ED, Iseman MD 2002. Current medical treatment for tuberculosis. *BMJ* 325: 1282-6.

Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E 2007. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress

Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. Clin Immunol 123(1):50-9.

Chen ZW 2005. Immune regulation of gamma delta T cell responses in mycobacterial infections. Clin Immunol 116: 202.

Chua J, Deretic V 2004. *Mycobacterium tuberculosis* reprograms waves of phosphatidylinositol 3-phosphate on phagosomal organelles. J Biol Chem 279(35): 36982-92.

Clark EA, Ledbetter JA, Aruffo A 1992. How B and T cells talk to each other. Nature (Lond) 367: 425-28.

Cole RA, Lu HM, Shi YZ, Wang J, De-Hua T, Zhou AT 1996. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic assay based on the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* on patients with pulmonary tuberculosis in China. Tuber Lung Dis 77(4): 363-8.

Collins HL, Kaufmann SHE 2001. The many faces of host responses to tuberculosis. Immunology 103: 1-9.

Comissão de Tuberculose da SBPT, Grupo de Trabalho das Diretrizes para Tuberculose da SBPT 2009. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. J Braz Pneumol 35(10): 1018-48.

Cunningham AF, Spreadbury CL 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. J Bacteriol 180: 801-8.

Comstock GW, Edwards LB, Livesay VT 1982. Tuberculosis morbidity in the U.S. Navy: its distribution and decline. Am Rev Respir Dis 110: 572-80.

Crowle AJ, Dahl R, Ross E, May MH 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect Immun* 59(5):1823-31.

Daffé M, Ettienne G 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease* 79(3):153-169.

Dannenbergh AM 1993. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis* 28: 51-58.

Davidow A, Kanaujia GV, Shi L, Kaviar J, Guo X, Sung N, Kaplan G, Menzies D, Gennaro ML 2005. Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state. *Infect Immun* 73:6846-51.

Demissie A, Leyten EMS, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Abate G, Fletcher H, Zumla A, Weldingh K, Brock I, Andersen P, Doherty TM and the VACSEL Study Group 2004. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL4 antagonist IL-4 δ 2. *J Immunol* 13(2):179-186.

Del corral H, Paris SC, Marin ND, Marin DM, López L, Henao HM, Martínez T, Villa L, Barrera LF, Ortiz BL, Ramírez ME, Montes CJ, Oquendo MC, Arango LM, Riaño F, Aguirre C, Bustamante A, Belisle JT, Dobos K, Mejía GI, Giraldo MR, Brennan PJ, Robledo J, Arbeláez MP, Rojas CA, García LF 2010. IFN γ response to mycobacterium tuberculosis, risk of infection and disease in household contacts of tuberculosis patients in Colombia. *Plos One* 4(12): e8257.

Demissie A, Leyten EMS, Abebe M, Wassie L, Aseffa A, Abate G, Fletcher H, Owiafe P, Hill PC, Brookes R, Rook G, Zumla A, Arend SM, Klein M, Ottenhoff THM, Andersen P, Doherty TM and the VACSEL Study Group 2006. Recognition of Stage-Specific Mycobacterial Antigens Differentiates between Acute and Latent Infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 179-186.

Demkow U, Ziółkowski J, Filewska M, Białas-Chromiec B, Zielonka T, Michałowska-Mitczuk D, Kuś J, Augustynowicz E, Zwolska Z, Skopińska-Różewska E, Rowińska-Zakrzewska E 2004. Diagnostic value of different serological tests for tuberculosis in Poland. *J Physiol Pharmacol* 55(3): 57-66.

Deretic V, Via LE, Fratti RA, Deretic D 1997. Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, and intracellular trafficking. *Electrophoresis* 18(14): 2542-7.

Deretic V, Levine B 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 18;5(6): 527-49.

Dheda K, van Zyl Smit R, Badri M, Pai M 2009. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr Opin Pulm Med* 15(3): 188-200.

Diedrich, CR, Mattila JT, Klein E, Janssen C, Phuah J, Sturgeon TJ, Montecarlo RC, Lin PL, Flynn JL 2010. Reactivation of latent tuberculosis in cynomolgus macaques infected with SIV is associated with early peripheral T cell depletion and not virus load. *Plos One* 5: e9611.

Ding AH, Nathan C, Stuehr D 1998. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141: 2407-12.

Doherty TM, Andersen P 2005. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev* 18(4): 687-92.

Dorman SE 2010. New diagnostic tests for tuberculosis: bench, bedside, and beyond. *Clin Infect Dis* 15: 50 Suppl 3:S173-7.

Dunphy KY, Senaratne RH, Masuzawa M, Kendall LV, Riley LW 2010. Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* functionally disrupted in a fatty acyl-coenzyme A synthetase gene *fadD5*. *J Infect Dis* 201(8): 1232-9.

Dupre NC, Alvin MFS, Gallo MEN, Nery JAC, Sarno EM 1990. Fatores envolvidos na reatividade do PPD em pacientes com Doença de Hasen. *Cadernos de Saúde Pública*, 6(2): 175-185.

Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC 1999. Global burden of tuberculosis: estimate incidence, prevalence and mortality by country. *JAMA* 282: 677-86.

Dye C 2006. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 367: 938-40.

Ehrt S, Shiloh MU, Ruan J, Choi M, Gunzburg S, Nathan C, Xie Q, Riley LW 1997. A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 186(11): 1885-96.

Ernst JD 1998. Macrophages receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66(4): 1277-81.

Faldt J, Dahlgren C, Ridell M 2002. Difference in neutrophil cytokine production induced by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *APMIS* 110(9): 593-600.

Feldman WH, Baggenstoss A 1938. The residual infectivity of the primary complex of tuberculosis. *Am J Pathol* 14: 473-90.

Ferebee SH 1970. Controlled chemoimmunoprophylaxis trials in tuberculosis. *Adv Tuberc Res* 17:28-106.

Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97(4): 435-47.

Ferrero E, Biswas P, Vettoretto K, Ferrarini M, Ugucioni M, Piali L, Leone BE, Moser B, Rugarli C, Pardi R 2003. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. *Immunology* 108(3): 365-74.

Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, Langenberg DM, van Crevel R, Adema GJ, Ottenhoff TH, Van der Meer JW, Netea MG 2005. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathog* 1: 279-85.

Flesch IE, Kaufmann SHE 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 138: 4408-4413.

Flesch IE, Kaufmann SHE 1993. Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology* 189(3-4): 316-39.

Florczyk MA, Mccue LA, Stack RF, Hauer CR, Mcdonough KA 2001. Identification and Characterization of Mycobacterial Proteins Differentially Expressed under Standing and Shaking Culture Conditions, Including Rv2623 from a Novel Class of Putative ATP-Binding Proteins. *Infect Immun* 69(9): 5777-85.

Flynn JL, Chan J 2001. Immunology of tuberculosis. *Anm Rev Immunol* 19: 93-129.

Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR 1995. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 155: 2515-24.

Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 368: 1575-80.

Garton NJ, Waddell SJ, Sherratt AL, Lee SM, Smith RJ, Senner C, Hinds J, Rajakumar K, Adegbola RA, Besra GS, Butcher PD, Barer MR 2008. Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persister-like bacilli in tuberculous sputum. *PLoS Med* 1;5(4): e75.

Gatfield J & Pieters J 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 28: 1647-50.

Gazetta CE, Ruffino Netto A, Pinto Neto JM, Santos MLSC, Cury MRCO, Vendramini SHF, Villa TC 2006. Investigation of tuberculosis contacts in the tuberculosis control program of a medium-sized municipality in the southeast of Brazil in 2002. *J Bras Pneumol* 32(6): 559-65.

Gedde-Dahl T 1952. Tuberculous infection in the light of tuberculin matriculation. *Am J Hyg* 56: 139-214.

Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH 2004. *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* 15;173(4): 2660-8.

Getz GS 2005. Bridging the innate and adaptive immune systems. *J Lipid Res* 46(4): 619-22.

Glimcher LH, Murphy KM 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 14: 1693-1711.

Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marieta P, Brooks JV, Orme IM 2001. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 69: 1722-28.

Greenaway C, Lienhardt C, Adegbola R, Brusasca P, McAdam K, Menzies D 2005. Humoral response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with tuberculosis in the Gambia. *Int J Tuberc Lung Dis* 9(10): 1112-9.

Guio H, Ashino Y, Saitoh H, Siddiqi UR, Mizusawa M, Xiao P, Soto A, Theo A, Hattori T 2010. High numbers of interferon-gamma-producing T cells and low titers of anti-tuberculous glycolipid antibody in individuals with latent tuberculosis. *Tohoku J Exp Med* 220 (1): 21-5.

Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A 2006. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 803-10.

Harboe M, Wiker HG 1992. The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J Infect Dis* 166(4): 874-84.

Hernández-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, Aguilar D, Orozco H, Harboe M, Rook GA, Bjune G 2000. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* 356(9248): 2133-8.

Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies WA, de Jong G, Reiner NE 1998. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *J Immunol* 1;161(9): 4882-93.

Hoff ST, Abebe M, Ravn P, Range N, Malenganisho W, Rodriques DS, Kallas EG, Søborg C, Mark Doherty T, Andersen P, Weldingh K 2007 . Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific antibody responses in populations with different levels of exposure from Tanzania, Ethiopia, Brazil, and Denmark. *Clin Infect Dis* 45(5): 575-82.

Hopewell PC, Migliori GB, Raviglione MC 2006. Tuberculosis care and control. *Bull World Health Organ* 2006 84: 428.

Hougardy JM, Place S, Hildebrand M, Drowart A, Debie AS, Loch C, Mascart F 2007. Regulatory T cells depress immune response to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176(4): 409-16.

Hsu KHK 1984. Thirty years after isoniazid. *JAMA* 251(10): 1283-5.

Hu Y & Coates AR 1999. Transcription of the stationary-phase-associated hspX gene of *Mycobacterium tuberculosis* is inversely related to synthesis of the 16-kilodalton protein. *J Bacteriol* 5: 1380-7.

Hu Y, Movahedzadeh F, Stoker NG, Coates AR 2006. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* alpha-crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. *Infect Immun* 74(2): 861-8.

Hyrich KL, Silman AJ, Watson KD, Symmons DP 2004. Anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis: an update on safety. *Ann Rheum Dis* 63(12): 1538-43.

IBGE 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (www.ibge.gov.br/) acesso em dezembro de 2010.

Ikezoe J, Takeuchi N, Johkoh T, Kohno N, Tomiyama N, Kozuka T, Noma K, Ueda E 1992. CT appearance of pulmonary tuberculosis in diabetic and immunocompromised patients: comparison with patients who had no underlying disease. *AJR Am J Roentgenol* 159(6): 1175-9.

Jackett PS, Bothamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi J 1988. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 26(11): 2313-8

Janis EM, Kaufmann SHE, Schwartz RH, Pardoll DM 1989. Activation of gamma-delta T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 244: 713-16.

Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC 2002. Clinical Practice. Latent tuberculosis infection *N Engl J Med* 347(23): 1860-6.

Jo EK 2008. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins and NLRs. *Curr Opin Infect Dis* 21: 279-86.

Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ 2001. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* 60 Suppl 3:iii6-12.

Joseph HA, Shrestha-Kuwahara R, Lowry D, Lambert LA, Panlilio AL, Raucher BG, Holcombe JM, Poujade J, Rasmussen DM, Wilce M 2004. Factors influencing health care

workers' adherence to work site tuberculosis screening and treatment policies. *Am J Infect Control* 32: 456-61.

Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova JL 1999. IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* 11: 346-51.

Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Henao Tamayo M, Harton M, Gonzalez Juarrero M, Basaraba RJ, Orme IM 2005. Interleukin-10 production by lung macrophages in CBA xid mutant mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 115(2): 246-52.

Kanaujia GV, Garcia MA, Bouley DM, Peters R, Gennaro ML 2003. Detection of early secretory antigenic target-6 antibody for diagnosis of tuberculosis in non-human primates. *Comp Med* 53(6): 602-6.

Kaufmann SHE 2002. Protection against tuberculosis; cytokines, T cells and macrophages. *Ann Rheum Dis* 61(suppl II): 54-58.

Kawai T, Akira S 2009. The roles of TLRs, RLRs, and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21: 317- 37.

Kashyap RS, Rajan AN, Ramteke SS, Agrawal VS, Kelkar SS, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF 2007. Diagnosis of tuberculosis in an Indian population by an indirect ELISA protocol based on detection of Antigen 85 complex: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 7: 74.

Kidd P 2003. The Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8(3): 223-46.

Kilicaslan Z, Kiyan E, Kucuk C, Kumbeli S, Sarimut N, Ozturk F, Yapici D, Al S, Erboran T, Ilikso N 2009. Risk of active tuberculosis in adult household contacts of smear-positive pulmonary tuberculosis cases. *Int J Tuber Lung Dis* 13 (1): 93-98.

Kinhikar AG, Vargas D, Li H, Mahaffey SB, Hinds L, Belisle JT, Laal S 2006. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase is a laminin-binding adhesin. Mol Microbiol 60(4): 999-1013.

Koo IC, Wang C, Raghavan S, Morisaki JH, Cox JS, Brown EJ 2008. ESX-1-dependent cytolysis in lysosome secretion and inflammasome activation during mycobacterial infection. Cell Microbiol 10: 1866-78.

Kolls JK, Lindén A 2004. Interleukin 17 family members and inflammation. Immunity 21(4): 467-76.

Korbel DS, Schneider BE, Ulrich ES 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. Microbes Infect 10(9): 995-1004.

Kritski AL, Dalcomo MP, Souza RB, Hollanda T, Gontijo Filho PP, Fiuza de Melo FA 1993. Tuberculose entre profissionais de saúde. Risco ocupacional? J Pneumol 19(2): 113-121.

Kritski A, Fiuza de Melo FA 2007. Tuberculosis in Adults. (www.tuberculosis-textbook.com). 487-523.

Kusner DJ 2005. Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. Clin Immunol 114(3): 239-47.

Kyei GB, Vergne I, Chua J, Roberts E, Harris J, Junutula JR, Deretic V 2006. Rab14 is critical for maintenance of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. EMBO J 15;25(22): 5250-9.

Laal S, Samanich KM, Sonnenberg MG, Zolla-Pazner S, Phadtare JM, Belisle JT 1997. Human humoral responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: immunodominance of high-molecular-mass antigens. Clin Diagn Lab Immunol 4(1): 49-56.

Lan M, Prause O, Miyamoto M, Sjöstrand M, Hytönen AM, Kaneko T, Lötval J, Lindén A 2003. A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF-alpha. *Eur Respir J* 21(3): 387-93.

Lathigra R, Zhang Y, Hill M, Garcia MJ, Jackett PS, Ivanyi J 1996. Lack of production of the 19-kDa glycolipoprotein in certain strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 147(4): 237-49.

Lazarevic V, Flynn JL 2002. CD8+ T cells in tuberculosis. *Am J R espir Crit Care Med* 166: 1116-21.

Lee M S-N, Leung C-C, Kam K-M, Wong M-Y, Leung M M-C, Tam C-M, Leung E C-C 2008. Early and late tuberculosis risk among close contacts in Hong Kong. *Int J Tuberc Lung Dis* 12(3): 281-87.

Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I 2000. Nonopsonic phagocytosis of zymozan and *Mycobacterium kansasii* by CR3(CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun* 68: 4736-45.

Lenaerts AJ, Hoff D, Aly S, Ehlers S, Andries K, Cantarero L, Orme IM, Basaraba RJ 2007. Location of persisting mycobacteria in a Guinea pig model of tuberculosis revealed by r207910. *Antimicrob Agents Chemother* 51(9): 3338-45.

Lim JH, Park JK, Jo EK, Song CH, Min D, Song YJ, Kim HJ 1999. Purification and immunoreactivity of three components from the 30/32-kilodalton antigen 85 complex in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 67(11): 6187-90.

Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 24;311(5768): 1770-3.

Lockhart E, Green AM, Flynn JL 2006. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1;177(7): 4662-9.

Lodes MJ, Dillon DC, Mohamath R, Day CH, Benson DR, Reynolds LD, McNeill P, Sampaio DP, Skeiky YA, Badaro R, Persing DH, Reed SG, Houghton RL 2001. Serological expression cloning and immunological evaluation of MTB48, a novel *Mycobacterium tuberculosis* antigen. *J Clin Microbiol* 39(7): 2485-93.

Maglione PJ, Xu J, Chan J 2007. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1;178(11): 7222-34.

Maglione PJ, Chan J 2009. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 39(3): 676-86.

Maertzdorf J, Reipsilber D, Parida SK, Stanley K, Roberts T, Black G, Walzl G, Kaufmann SH 2011. Human gene expression profiles of susceptibility and resistance in tuberculosis. *Genes Immun* 12(1): 15-22.

Mahenthiralingam E, Marklund BI, Brooks LA, Smith DA, Bancroft GJ, Stokes RW 1998. Site-directed mutagenesis of the 19-kilodalton lipoprotein antigen reveals No essential role for the protein in the growth and virulence of *Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun* 66(8): 3626-34.

Mann G, Squire SB, Bissel K, Toit E Du, Hesselning A, Nicol M, Dejten A, Kritski AL 2010. Beyond accuracy: creating a comprehensive evidence base for tuberculosis diagnostic tools. *Int J Tuberc Lung Dis* 14(12): 1518-1524.

Marks SM, Taylor Z, Qualls NL, Shrestha-Kuwahara RJ, Wilce MA, Nguyen CH 2000. Outcomes of contact investigations of infectious tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 162(6): 2033-8.

Marques CDL, Duarte ALBP, Lorena VMB, Souza JR, Souza WV, Gomes Yde M, de Carvalho EM 2009. Evaluation of an interferon gamma assay in the diagnosis of latent tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 30(1): 57-62.

Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, Timmins GS, Sander P, Deretic V 2008. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe* 3(4): 224-32.

McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG 2005. Antigen-specific memory B cell development. *Ann Rev Immunol* 23: 487-513.

Menzies D 1997. Issues in the management of contacts of patients with active pulmonary tuberculosis. *Can J Public Health* 88(3):197-201.

Menzies D 1999. Interpretation of Repeated Tuberculin Tests. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 15-21.

Ministério da Saúde 2005. Guia de vigilância epidemiológica. Brasilia, Brazil: Ministerio da Saude, 2005. [[http:// portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt-25514](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt-25514)].

Mizoguchi A, Bhan AK 2006. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 15;176(2): 705-10.

Möller MF, Flachsbart A, Till A, Thye T, Horstmann RD, Meyer CG, Osei I, van Helden PD, Hoal EG, Schreiber S, Nebel A, Franke A 2010. A functional haplotype in the 3' untranslated region of TNFRSF1B is associated with tuberculosis in two African populations. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 388-93.

Moore DA, Lightstone L, Javid B, Friedland JS 2002. High rates of tuberculosis in end-stage renal failure: the impact of international migration. *Emerg Infect Dis* 8: 77-8.

Morán-Mendoza O, Marion SA, Elwood K, Patrick D, FitzGerald JM 2010. Risk factors for developing tuberculosis: a 12-year follow-up of contacts of tuberculosis cases. *Int J Tuberc Lung Dis* 14(9): 1112-9.

Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Okada M, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, Mazurek GH, Tsuyuguchi I 2004. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 170(1): 59-64.

Mosman TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348–2357.

Muller I, Cobbold S, Waldmann II, Kaufmann SHE 1987. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt2+ T cells. *Infect Immunol* 55: 2037-41.

Muzzy de Souza GR et al 1998. Tuberculin conversion among health care workers in General Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Final results. *Am J Respir Crit Care Med* 157(suppl)A: 705.

Nicholson S, Bonecini-Almeida M G, Lapa e Silva J R, Nathan C, Xie Q W, Mumford R, Weidner J R, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho J L 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine* 183: 2293-2302.

Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A 1992. CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today*. 1992, 13(11): 431-3.

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

Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 15;167(2): 910-8.

Ohno H, Zhu G, Mohan VP, Chu D, Kohno S, Jacobs WR Jr, Chan JL 2003. The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol* 5: 637-648.

Opie EA J 1927. Tubercule bacilli in latent tuberculosis lesions and in lung tissue without tuberculosis lesions. *Arch Pathol* 4: 1-21.

Ordway D, Henao-Tamayo M, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M 2005. Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF receptor-associated factor family. *J Immunol* 175(6): 3873-81.

O'Toole R, Smeulders MJ, Blokpoel MC, Kay EJ, Loughheed K, Williams HD 2003. A two-component regulator of universal stress protein expression and adaptation to oxygen starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 185(5): 1543-54.

Pai M, Riley LW, Coldford JM Jr 2004. Interferon-gama assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: systematic review. *Lancet Infect Dis* 4: 761-76.

Pai M, Zwerling A, Menzies D 2008. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 5;149(3): 177-84.

Pape KA, Catron DM, Itano AA, Jenkins MK 2007. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26(4): 491-502.

Park HD, Guinn KM, Harrel MI Liao R, Voskuil MI, Tompa M, Schoolnik GK, Sherman DR 2003. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 48: 833-843.

Parrish NM, Dick JD, Bishai WR 1998. Mechanism of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *TRENDS Microbiol* 6: 107-12.

Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Kaisho T, Kundu M, Basu J 2007. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol* 8: 610-18.

Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV 2006. *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J Immunol* 1;177(1): 422-9.

Peng M, Wang Z, Yao C, Jiang L, Jin Q, Wang J, Li B 2008. Interleukin 17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Increased in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *Cell Mol Immunol* 5(3): 203-8.

Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, Daffé M, Emile JF, Marchou B, Cardona PJ, de Chastellier C, Altare F 2008. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M.tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* 4(11): e1000204.

Pineda NIS, Pereira SM, Matos ED, Barreto ML 2004. Chemoprophylaxis in the prevention of tuberculosis. *J Bras Pneumol* 30(4): 485-95.

Pokkali S, Rajavelu P, Sudhakar R, Das SD 2009. Phenotypic modulation in *Mycobacterium tuberculosis* infected neutrophil during tuberculosis. *Indian J Med Res.* 130(2):185-92.

Puissegur MP, Lay G, Gilleron M, Botella L, Nigou J, Marrakchi H, Mari B, Duteyrat JL, Guerardel Y, Kremer L, Barbry P, Puzo G, Altare F 2007. Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM-9 and beta 1 integrin-mediated pathway. *J Immunol* 178: 3161-69.

Qamra R, Mande SC, Coates AR, Henderson B 2005. The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 85(5-6): 385-94.

Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, Bihl F, Erard F, Botha T, Drennan M, Soler MN, Le Bert M, Schnyder B, Ryffel B 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* 6: 946-59.

Rabahi MF, Junqueira-Kipnis AP, Reis MCG, Oelemann W, Conde MB 2007. Humoral response to Hsp60 and GlcB to previous and recent infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Infect Dis* 7: 148.

Ramalingam B, Baulard AR, Locht C, Narayanan PR and Raja A 2004. Cloning, expression and purification of the 27 kDa (MPT51, Rv3803c) protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Elsevier* 36: 53-60.

Raynaud C, Guillhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, Smith I, Gicquel B, Jackson M 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 45(1): 203-17.

Reis MC, Rabahi MF, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP 2009. Health care workers humoral immune response against GLcB, MPT51 and HSPX from *Mycobacterium tuberculosis*. *Braz J Infect Dis* 13(6): 417-21.

Riedel DD, Kaufmann SH 1997. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun* 65(11):4620-3.

Ríos-Barrera VA, Campos-Peña V, Aguilar-León D, Lascurain LR, Meraz-Ríos MA, Moreno J, Figueroa-Granados V, Hernández-Pando R 2006. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. *Eur J Immunol* 36(2): 345-53.

Robbins SL, Angrill M, Kumar V 1984. *Basic Pathology*. third edition. s.l. : WB Saunders Company 162: 6122-31.

Robertson H 1933. The persistence of tuberculous infection. *Am J Pathol* 9: 711- 19.

Rojas M, García LF, Nigou J, Puzo G, Olivier M 2000. Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis by altering Ca²⁺-dependent cell signaling. *J Infect Dis* 182(1): 240-51.

Rosat JP, Grant EP, Beckman EM, Dascher CC, Sieling PA, Frederique D, Modlin RL, Porcelli SA, Furlong ST, Brenner MB 1999. CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8⁺ alpha beta T cell pool. *J Immunol* 1;162(1): 366-71.

Ruan J, St John G, Ehrt S, Riley L, Nathan C 1999. noxR3, a novel gene from *Mycobacterium tuberculosis*, protects *Salmonella typhimurium* from nitrosative and oxidative stress. *Infect Immun* 67(7): 3276-83.

Roth VR, Garret DO, Laerson KF, Starling CE, Kritski AL, Medeiros EAS 2005. A multicenter evaluation of tuberculin skin test positivity and conversion among health care workers in Brazilian hospitals. *Int J Tuberc Lung Dis* 9 (12): 1335-1342.

Sable SB, Goyal D, Verma I, Behera D, Khuller GK 2007. Lung and blood mononuclear cell responses of tuberculosis patients to mycobacterial proteins. *Eur Respir J* 29(2): 337-46.

Safi MA 2010. An overview of various labeled assays used in medical laboratory diagnosis. Immune and non-immune assays. *Saudi Med J* 31(4): 359-68.

Salles CG, Ruffino-Netto A, Lapa-e-Silva JR, Kritski AL, Cailleaux-Cesar M, Queiroz-Melo FC, Conde MB 2007. The presence of booster phenomenon among contacts of active pulmonary tuberculosis cases: a retrospective cohort. *BMC Public Health* 7: 38-42.

Samanich KM, Belisle JT, Sonnenberg MG, Keen MA, Zolla-Pazner S, Laal S 1998. Delineation of human antibody responses to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 178: 1534-8.

Samanich K, Belisle JT, Laal S 2001. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immun* 69(7): 4600-9.

Samanich KM, Keen MA, Vissa VD, Harder JD, Spencer JS, Belisle JT, Zolla-Pazner S, Laal S 2000. Serodiagnostic potential of culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(4):662-8.

Sanchez FO, Rodriguez JI, Agudelo G, Garcia LF 1994. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect Immun* 62: 5673-8.

Sánchez-Rodríguez C, Estrada-Chávez C, García-Vigil J, Laredo-Sánchez F, Halabe-Cherem J, Pereira-Suárez A, Mancilla R 2002. An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with good outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 6(8): 706-12.

Sartain MJ, Slayden RA, Singh KK, Laal S, Belisle JT 2006. Disease State Differentiation and Identification of Tuberculosis Biomarkers via Native Antigen Array Profiling. *Mol Cell Proteomics* 5(11): 2102-13.

Saukkonen J J, Cohn D L, Jasmer R M, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, Peloquin CA, Gordin FM, Nunes D, Strader DB, Bernardo J, Venkataramanan R, Sterling TR; ATS (American Thoracic Society) Hepatotoxicity of Antituberculosis Therapy Subcommittee

2006. An official ATS statement: hepatotoxicity of anti-tuberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 935–952.

Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, Flynn JL 2000. Depletion of T CD4⁺ cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of Interferon gamma and Nitric oxide synthase 2. *J Exp Med* 192: 347-58.

Schlesinger LS 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 150: 2920-30.

Schroder K, Tschopp J 2010. The inflammasomes. *Cell* 140: 821-32.

Seibert FB 1934. The isolation and properties of the purified protein derivative of tuberculin. *Am Rev Tuberc* 30: 713.

Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, Walker AT, Freedland GH 1989. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *New Engl J Med* 320: 545-50.

Senol G, Erer OF, Yalcin YA, Coskun M, Gündüz AT, Biçmen C, Ertas M, Ozkan SA 2007. Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. *Eur Respir J* 29(1): 143-48.

Sepkowitz KA, Feldman J, Louthier J, Rivera P, Villa N, DeHovitz J 1997. Benefit of two-step PPD testing of new employees at a New York City hospital. *Am J Infect Control* 25(3): 283-6.

Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL 2001. CD4⁺T cells are required for the development of cytotoxic CD8⁺T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 167(12): 6991-7000.

Shen Y, Zhou D, Qiu L, Lai X, Simon M, Shen L, Kou Z, Wang Q, Jiang L, Estep J, Hunt R, Clagett M, Sehgal PK, Li Y, Zeng X, Morita CT, Brenner MB, Letvin NL, Chen ZW 2002. Adaptive immune response of Vgamma 2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science* 295: 2255.

Shin DM, Jeon BY, Lee HM, Jin HS, Yuk JM, Song CH, Lee SH, Lee ZW, Cho SN, Kim JM, Friedman RL, Jo EK 2010. *Mycobacterium tuberculosis* eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog* 16;6(12):e1001230.

Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, Krahenbuhl JL 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect Immun* 56(5): 1232-6.

SilvaVJR, Santos FMSA, Kritski AL 2001. Prevalência de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* entre alunos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro. *J Pneumol* 27(2): 77-82.

Silva VM, Cunha JLA, Kritski 2002. Tuberculin skin test conversion among medical students at a teaching hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 23: 591-94.

Silva BDS, Souza MR, Liberman T, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP 2009. Evaluation of total serum antibodies against phenolic glycolipid-1 (PGL-1) of *Mycobacterium leprae* in individuals with Hansen Disease and their house contacts in the State of Goias, Brazil. *Revista Medicina Tropical* 38 (3): 187-196.

Silva DG, Silva BD, Junqueira-Kipnis AP, Rabahi MF 2010. Tuberculosis in rheumatoid arthritis patients: the difficulty in making the diagnosis of latent infection. *J Bras Pneumol* 36(2): 243-51.

Singh KK, Dong Y, Belisle JT, Harder J, Arora VK, Laal S 2005. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* recognized by antibodies during incipient, subclinical tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(2): 354-8.

Smith CV, Huang CC, Miczak A, Russel DG, Sacchetti JC, Honer zu Bentrup K 2003. Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 278(3): 1735-43.

Sonnenberg MG & Belisle JT 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. Infect Immun 65: 4515-24.

Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 63(5): 1710-7.

Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins MD, Aziz MA, Pai M 2006. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis 6(10): 664-74.

Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M 2007. Commercial Serological Antibody Detection Tests for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Systematic Review. Plos Med 2:355-59.

Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science 4;263(5147): 678-81

Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG 1996. *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. EMBO J 16;15(24): 6960-8.

SVS/MS 2009. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Eletrônico. [Online] 2009. www.saude.gov.br/svs.

Talaat AM, Ward SK, Wu CW, Rondon E, Tavano C, Bannantine JP, Lyons R, Johnston SA 2007. Mycobacterial bacilli are metabolically active during chronic tuberculosis in murine lungs: insights from genome-wide transcriptional profiling. *J Bacteriol* 189(11): 4265-74.

Teixeira EG, Kristski A, Ruffino-Neto, Steffen R, Lapa e Silva JR, Belo M, Luiz RR, Menzies D, Trajman A 2008. Two-step tuberculin skin test and booster phenomenon prevalence among Brazilian medical students. *Int J Tuberc Lung Dis* 12(12): 1407-1413.

Thompson NJ, Glassroth JL, Snider DE Jr, Farer LS 1979. The booster phenomenon in serial tuberculin testing. *Am Rev Respir Dis* 119(4): 587-97.

Thompson CB 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203): 1456-62

Thybo S, Richter C, Wachmann H, Maselle SY, Mwakyusa DH, Mtoni I, Andersen AB 1995. Humoral response to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in African tuberculosis patients with high prevalence of human immunodeficiency virus infection. *Tuber Lung Dis* 76(2): 149-55.

Torrelles JB, Azad AK, Schlesinger LS 2006. Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-type lectin pattern recognition receptors. *J Immunol* 177: 1805-16.

Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C, Tufariello J, Flynn J, Chan J 2006. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular Microbiology* 8(2): 218-32.

Tuberculosis Research Centre, Indian Council of Medical Research 2007. Additional risk of developing TB for household members with a TB case at home at intake: a 15-year study. *Int J Tuberc Lung Dis* 11(3): 282-88.

Tufariello J, Chan J, Flynn JL 2003. Latente tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 3: 578-90.

Ulrichs T, Kaufmann SH 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 208(2): 261-9.

Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jorg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SH 2004. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structure to orchestrate local host in the lung. *J Pathol* 204: 217-228.

Ulrichs T, Kosmiadi GA, Jörg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SH 2005. Differential organization of the local immune response in patients with active cavitory tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma. *J Infect Dis* 1;192(1): 89-97.

van Pinxteren LA, Cassidy JP, Smedegaard BH, Agger EM, Andersen P 2000. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent of CD8 T cells. *Eur J Immunol* 30(12): 3689-98.

Varughese P, Helbecque DM, McRae KB, Eidus L 1974. Comparison of strip and Ziehl-Neelsen methods for staining acid-fast bacteria. *Bull World Health Organ* 51(1): 83-91.

Verver S, Warren RM, Beyers N, Richardson M, van der Spuy GD, Borgdorff MW, Enarson DA, Behr MA, van Helden PD 2005. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1430-5.

Via LE, Lin PL, Ray SM, Carrillo J, Allen SS, Eum SY, Taylor K, Klein E, Manjunatha U, Gonzales J, Lee EG, Park SK, Raleigh JA, Cho SN, McMurray DN, Flynn JL, Barry CE 3rd 2008. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infect Immun* 76(6): 2333-40.

Villiger PM, Zellweger JP and Möller B 2009. Novel screening tools for latent tuberculosis: time to leave an old friend? *Curr Opin Rheumatol* 21: 238-43.

Voskuil MI, Visconti KC, Schoolnik GK 2004. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormency. *Tuberculosis (Edinb)* 84: 218-227.

Vukmanovic-Stejic M, Agius E, Booth N, Dunne PJ, Lacy KE, Reed JR, Sobande TO, Kissane S, Salmon M, Rustin MH, Akbar AN 2008. The kinetics of CD4+Foxp3+ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo. *J Clin Invest* 118(11): 3639-50.

Waard JH, Robledo J 2007 *Conventional Diagnostic Methods*. (www.tuberculosis-textbook.com). Vols. Cap.12, 401-424.

Wadee AA, Kuschke RH, Doms TG 1995. The inhibitory effects of *Mycobacterium tuberculosis* on MHC class II expression by monocytes activated with riminophenazines and phagocyte stimulants. *Clin Exp Immunol* 100(3): 434-9.

Wang CH & Kuo HP 2001. Nitric oxide modulates interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha synthesis, and disease regression by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. *Respirology* 6(1): 79-84.

Wang PD, Lin RS 2000. Tuberculosis Transmission in the Family. *J Infection* 41: 249-251.

Wang L, Turner M, Elwood R 2002. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 57: 804-9; erratum, 2003; 58:188.

Watanabe M, Honda I, Kawajiri K, Niinuma S, Kudoh S, Minnikin DE 1995. Distribution of antibodies titres against phenolic glycolipids from *Mycobacterium tuberculosis* in the sera from tuberculosis patients and healthy controls. *Res Microbiol* 146(9): 791-7.

Wayne LG, Sramek HA 1979. Antigenic differences between extracts of actively replicating and synchronized resting cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 24(2): 363-70.

Wayne LG, Lin KY 1982. Glyoxylate metabolism and adaption of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect Immun* 3: 1042-9.

Wayne LG 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 908-14.

Weldingh K, Andersen P 2008. ESAT-6/CFP10 skin test predicts disease in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *PLoS One* 23;3(4): e1978.

Whalen CC, Chiunda A, Zalwango S, Nshuti L, Jones-Lopes E, Okwera A, Hirsch C, Peters P, Boom WH, Mugerwa RD 2006. Immune correlates of acute *Mycobacterium tuberculosis* infection on household contacts in Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 75(1): 55-61.

WHO 2010. Global Tuberculosis Control, 2010. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2010/en/index.html

Wickremasinghe MI, Thomas LH, Friedland JS 1999. Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kappa-B dependent network. *J Immunol* 163(7): 3936-47.

Wilson RA, Maughan WN, Kremer L, Bestra GS, Futter K 2004. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. *J Mol Biol* 2: 519-30.

Wilkinson RJ, Hasløv K, Rappuoli R, Giovannoni F, Narayanan PR, Desai CR, Vordermeier HM, Paulsen J, Pasvol G, Ivanyi J, Singh M 1997. Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. *J Clin Microbiol* 35(3): 553-7.

Windish HP, Lin PL, Mattila JT, Green AM, Onuoha EO, Kane LP and Flynn JL 2009. Aberrant TGF-beta signaling reduces T regulatory cells in ICAM-1 deficient mice, increasing the inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Leukoc Biol* 86: 713-25.

Wiker HG, Harboe M 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Ver* 56(4): 648-61

Wojciechowski W, DeSanctis J, Skamene E, Radzioch D 1999. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin involves class II transactivator and depends on the Nramp1 gene. *J Immunol* 1;163(5): 2688-96.

Wu X, Yang Y, Zhang J, Li B, Liang Y, Zhang C, Dong M, Cheng H, He J 2010. Humoral immune responses against the *Mycobacterium tuberculosis* 38-kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 antigens in tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 17(3): 372-5.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-43.

Yates RM, Hermetter A, Russel DG 2005. The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic* 6(5): 413-420.

Yeremeev VV, Lyadova IV, Nikonenko BV, Apt AS, Abou-Zeid C, Inwald J, Young DB 2000. The 19-kD antigen and protective immunity in a murine model of tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 120(2): 274-9.

Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ 2009. Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol* 17(5): 183-8.

11. ANEXOS

11.1. Aprovação do comitê de ética

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO ESPORTE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 161/07

Goiânia, 01/11/2007

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis

TÍTULO: Padronização de um teste de ELISA para triagem de indivíduos com alto risco de adoecimento para tuberculose, atendidos na rede pública e privada de saúde de Goiânia

Área Temática: Grupo II – Testes Diagnósticos

Local de Realização: IPTSP/UFG


Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

→ Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

→ O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

→ O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa- Item 13*)


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

11.2. Questionário sócio-epidemiológico/acompanhamento aplicados aos contatos.

Questionário dos CONTATOS

Nome: _____
Contato do paciente: _____
Data nascimento: ___/___/___ Idade: _____
Grau de parentesco: _____ Naturalidade: _____
Cor: [] Branca [] Negra [] Amarela [] Parda [] Indígena [] Ignorada
Sexo: [] Masculino [] Feminino
Estado civil: _____ Fone: _____
Grau de instrução: _____
Quanto tempo mora em Goiânia: _____
End.Trabalho: _____
Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____
Ocupação/Ramo de atividade econômica: _____
Quanto tempo neste trabalho: _____

Sintomatologia(?): _____

Foi vacinado (a) com BCG: [] sim [] não [] não sabe
Tem cicatriz: [] sim [] não

Doenças associadas:
[] Diabetes [] Doença Renal [] Doença Cardíaca [] Pressão Arterial [] Hepatite
Outra: _____

Faz uso de medicamentos: [] sim [] não
Qual? _____

É alérgico (a): [] sim [] não [] não sabe
A que? _____

Acompanhamento:

Início do diagnóstico DO PACIENTE Data da 1ª coleta: ___/___/___

PPD: _____ mm.
ELISA: IgM _____ IgG _____

4 semanas após o diagnóstico: Data da coleta: ___/___/___

PPD: _____ mm.
ELISA: IgM _____ IgG _____

12 semanas após o diagnóstico: Data da coleta: ___/___/___

PPD: _____ mm.
ELISA: IgM _____ IgG _____

6 meses após o diagnóstico: Data da coleta: ___/___/___

PPD: _____ mm.
ELISA: IgM _____ IgG _____

1 ano após o diagnóstico: Data da coleta: ___/___/___

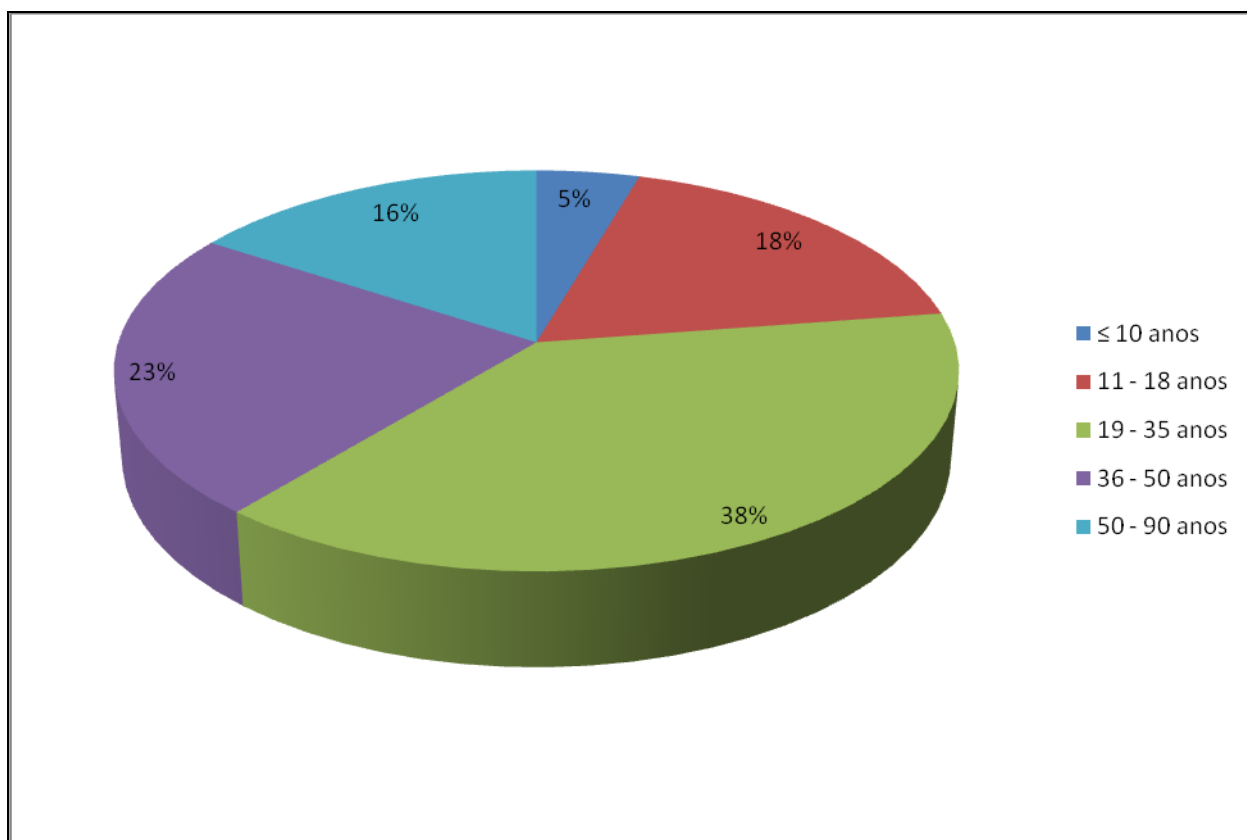
PPD: _____ mm.
ELISA: IgM _____ IgG _____

2 anos após o diagnóstico: Data da coleta: ___/___/___

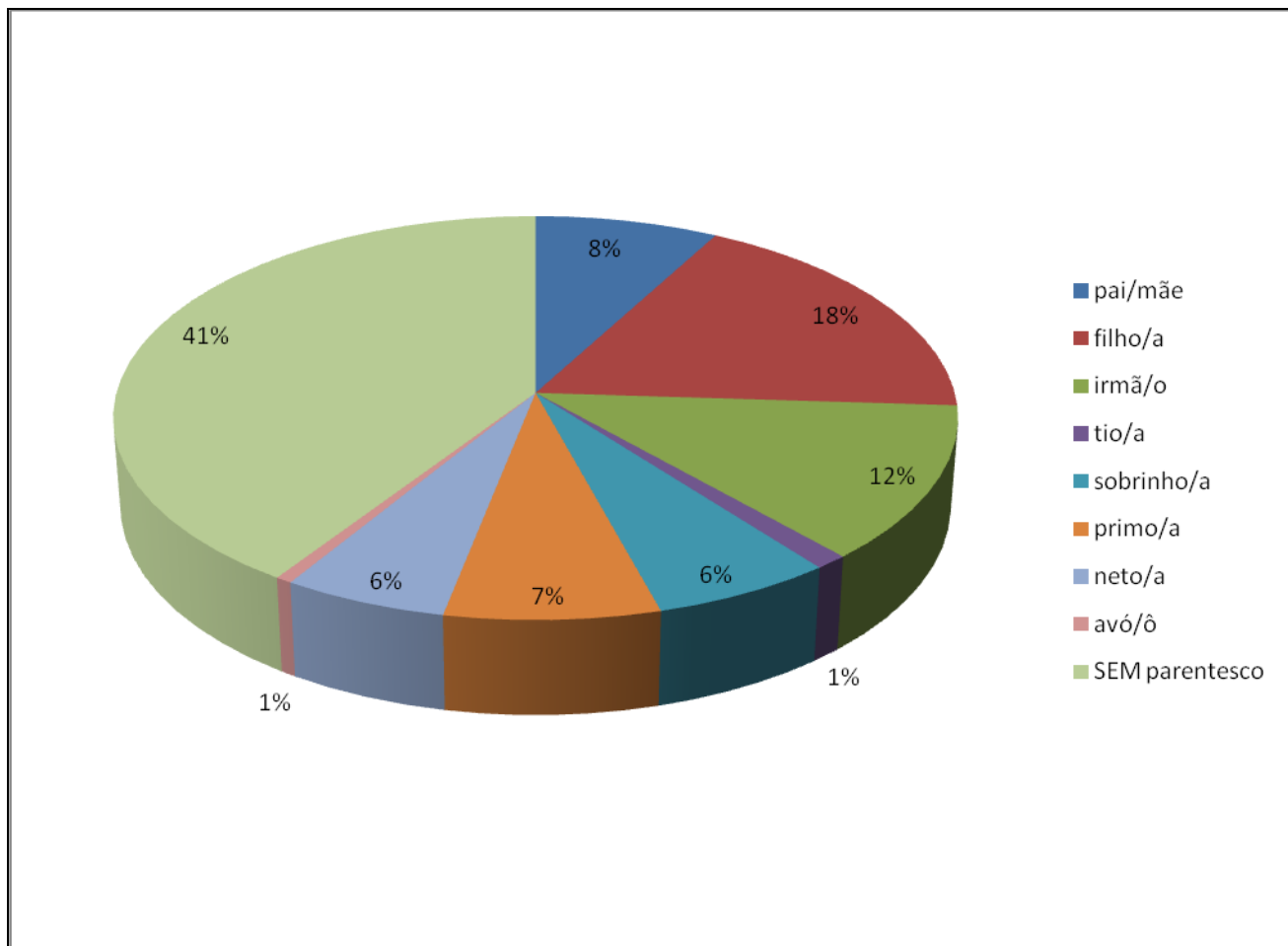
PPD: _____ mm.
ELISA: IgM _____ IgG _____

Obs.: _____

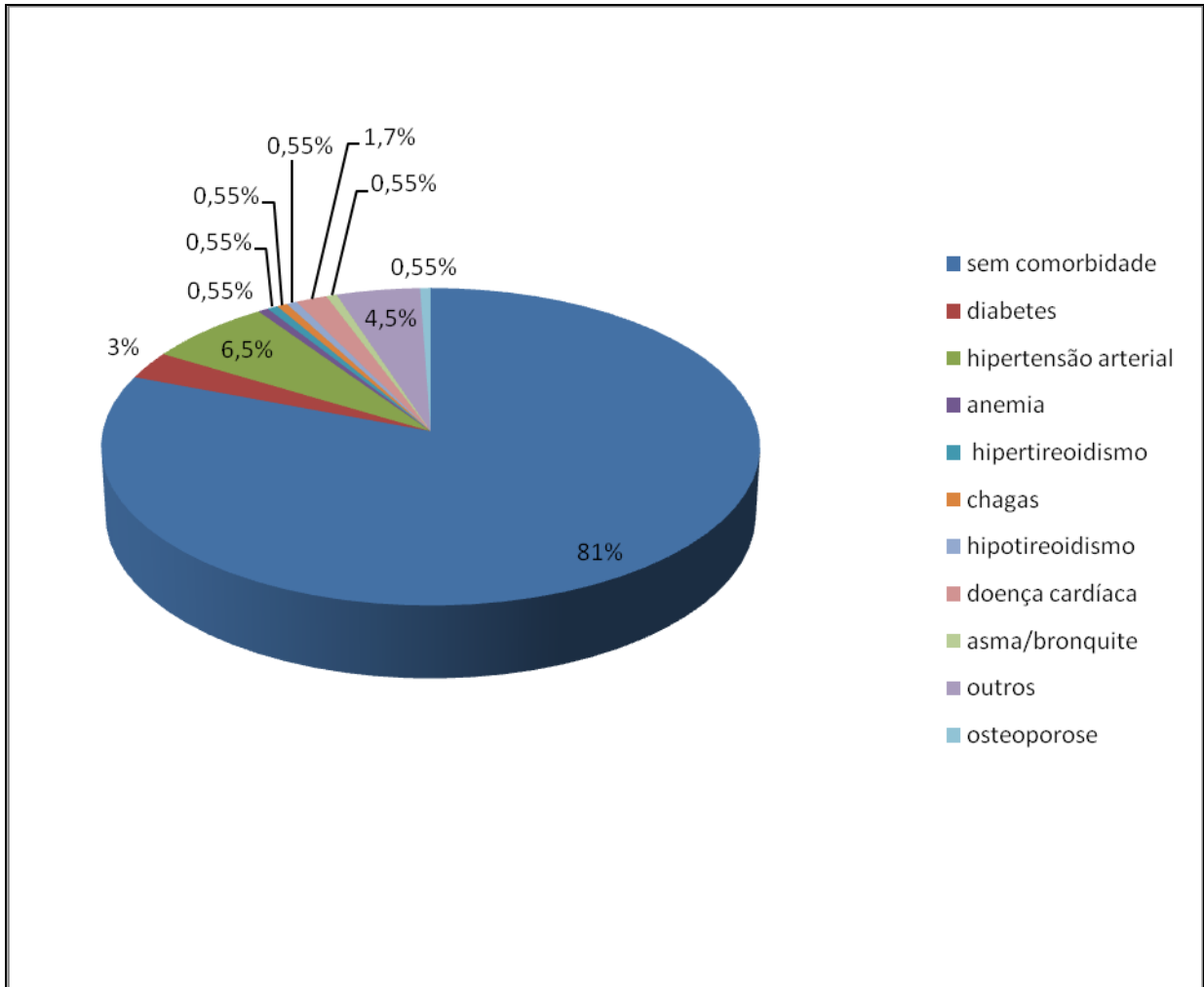
11.3. Distribuição dos contatos por intervalo de idade.



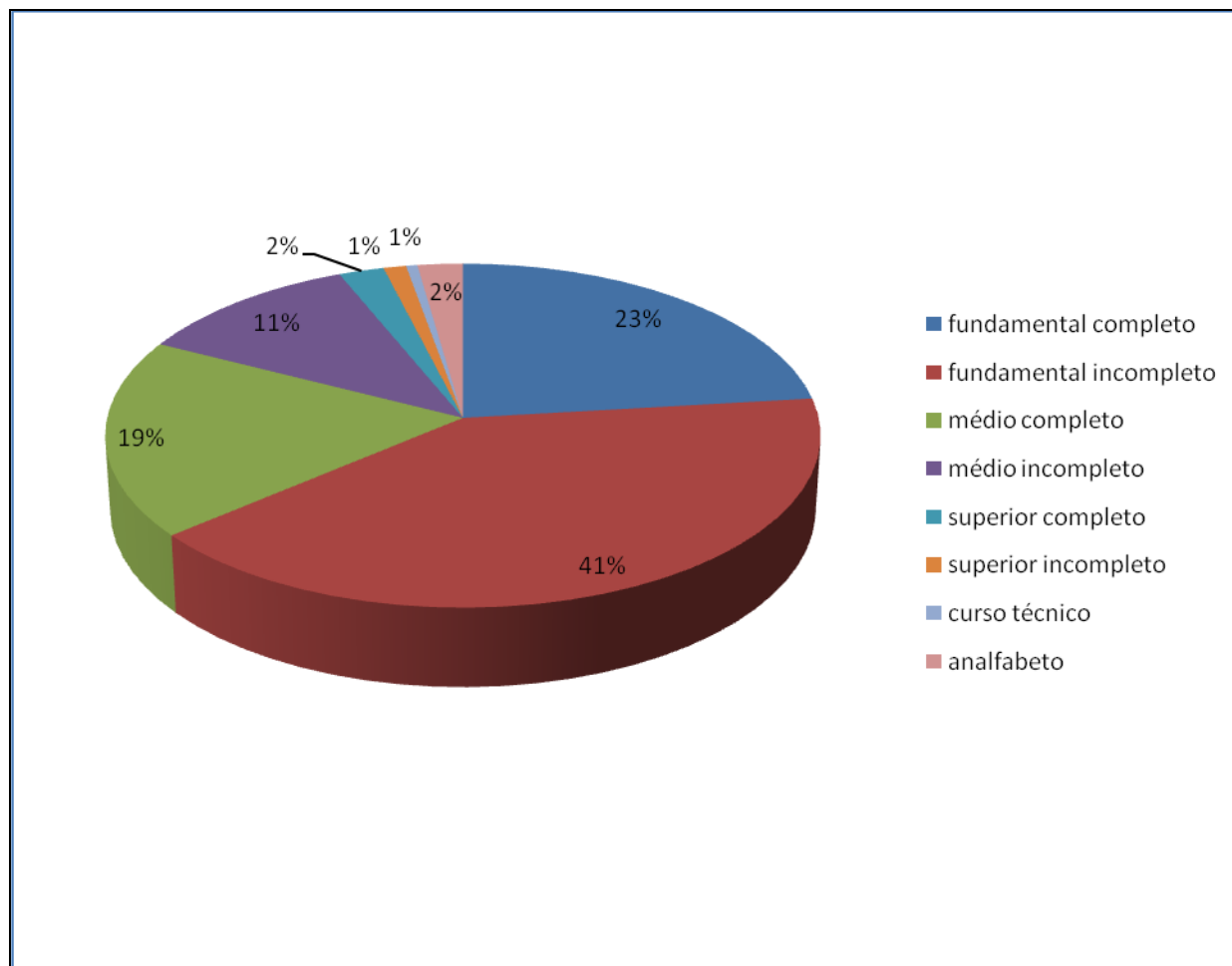
11.4. Distribuição dos contatos por grau de parentesco.



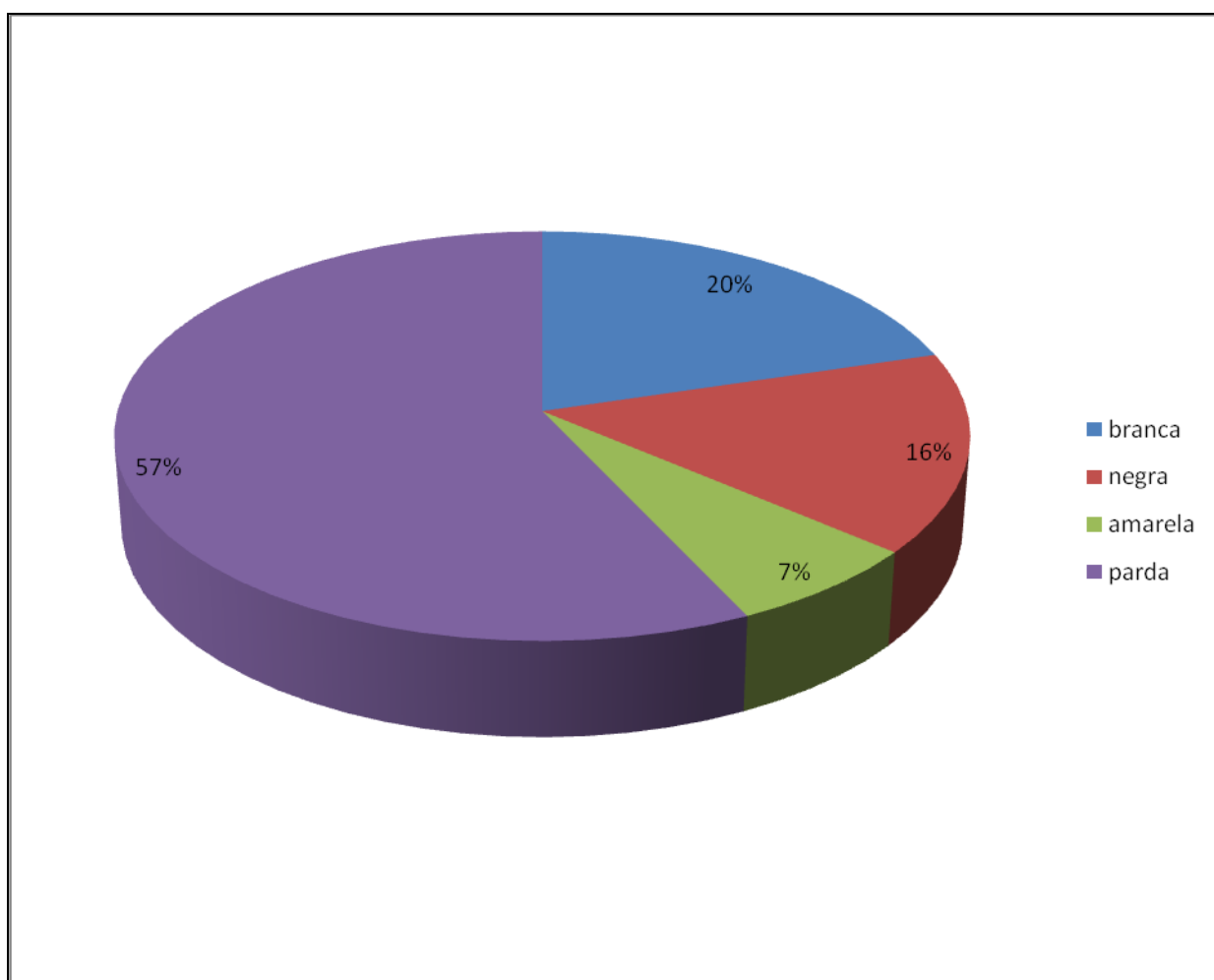
11.5. Distribuição dos contatos por comorbidades.



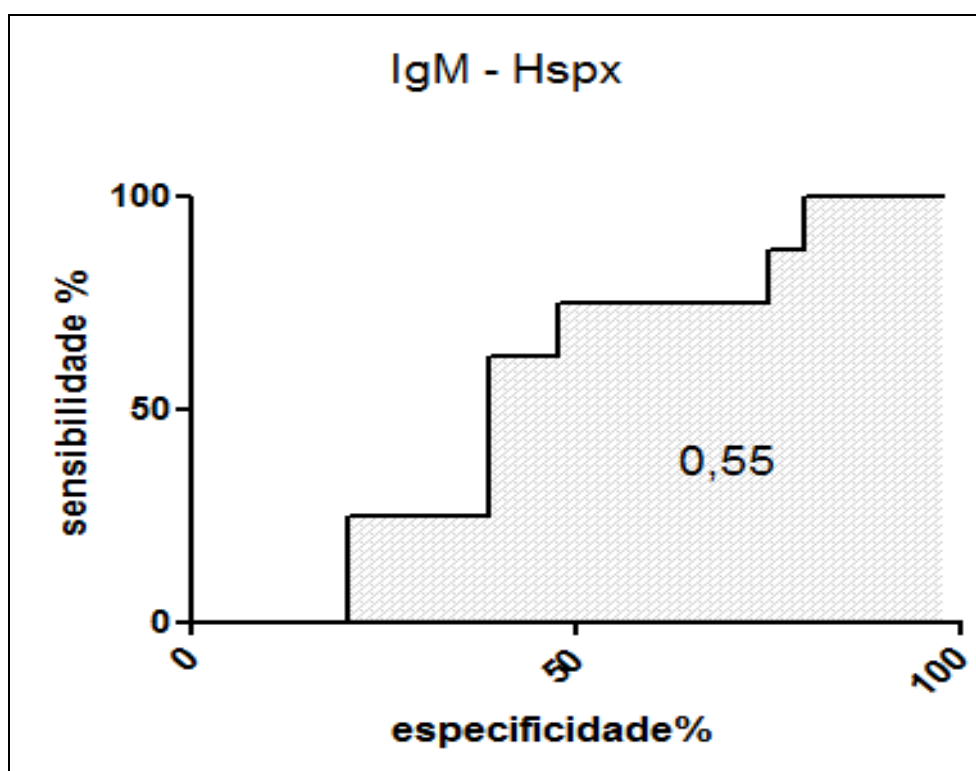
11.6. Distribuição dos contatos por grau de instrução.



11.7. Distribuição dos contatos por cor.



11.8. Representação gráfica da acurácia do ELISA-Hsp α IgM.



11.9. Representação gráfica da acurácia do ELISA-Hsp α IgG.

