

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Michelle Cristina Guerreiro dos Reis

**Caracterização da Resposta Imune Humoral em
Trabalhadores da Área da Saúde frente a Antígenos
Recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis*.**

Orientadora:

Prof^a.Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis

Co-orientador:

Prof.Dr. André Kipnis

Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO, 2007

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

Michelle Cristina Guerreiro dos Reis

**Caracterização da Resposta Imune Humoral em Trabalhadores da Área
da Saúde frente a Antígenos Recombinantes de *Mycobacterium
tuberculosis*.**

Orientadora:

Prof^ª.Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis

Co-orientador:

Prof.Dr. André Kipnis

Dissertação submetida ao
CPGMT/IPTSP/UFG como requisito
Parcial para obtenção do Título de
Mestre em Medicina Tropical na Área
de Concentração de Imunologia

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro do CNPq e FUNAPE-UFG.

Goiânia-GO, 2007

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

Reis, Michelle Cristina Guerreiro dos.

**R375c Caracterização da resposta imune humoral em
trabalhadores da**

**área da saúde frente a antígenos recombinantes de
*Mycobacterium***

***tuberculosis*. / Michelle Cristina Guerreiro dos Reis. –
2007.**

57 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis.

Co-Orientador: Dr. André Kipnis.

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
Goiás,**

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2007.

Bibliografia f 40-51.

**1. Tuberculose – Resposta imune humoral –
Trabalhadores**

**da saúde 2. *Mycobacterium tuberculosis* – Goiânia
(GO) –**

**Antígenos protéicos 3. Trabalhadores da saúde -
Anticorpos**

**I. Kipnis, Ana Paula Junqueira. II. Kipnis, André. III
Univer-**

**sidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia e Saúde
Pública.**

IV. Título.

CDU: 616-002.5

ABREVIATURAS

AG – Arabinogalactano

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BAAR – Bacilo Álcool Ácido Resistente

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

CD – Grupo de Diferenciação

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CR3 – Receptor do Complemento 3

DHT - Hipersensibilidade tardia

DO – densidade ótica

DOTS – Estratégia de Tratamento Direto Observado de curta duração

DP – desvio padrão

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FUNAPE – Fundação de Apoio à Pesquisa

HDT – Hospital de Doenças Tropicais

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN- γ – Interferon Gama

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

IL- Interleucina

iNOS – Óxido Nítrico Sintetase induzível

IUALTD – União Internacional contra Tuberculose e Doenças Pulmonares

kDa – Quilodalton

LAM – Lipoarabinomanana

LM- Lipomanana

MIP – Proteína Inflamatória de Macrófagos

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal

NO – Óxido Nítrico

OMS (WHO) – Organização Mundial de Saúde

PAS – Sal paramino-ácido do Ácido Salicílico

PBS – tampão de salina fosfato

PDIM – Pitioglicerol dimicosero sato

PGL – Glicolípídeo Fenólico

PIM – Manosídeo de Fosfatidilinositol

PPD – Derivado de Proteína Purificado

TAS – Trabalhadores da área da Saúde

TB – Tuberculose

Th – Linfócito T Auxiliar

TLR – receptor semelhante ao Toll

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

SL- Sulfolipídeos

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras.

Figura 1. Representação esquemática dos componentes da parede celular de *M. tuberculosis*.....08

Figura 2. Dosagem dos níveis de anticorpos séricos (IgM e IgG) dos trabalhadores da área da saúde contra antígenos recombinantes de *M. tuberculosis*.....28

Figura 3. Comparação entre as dosagens séricas de anticorpos (IgM e IgG) contra antígenos recombinantes de *M. tuberculosis* de trabalhadores da área da saúde vacinados e não vacinados com BCG.....30

Figura 4. Comparação entre a dosagem sérica de anticorpos (IgM e IgG) contra antígenos recombinantes de *M. tuberculosis* e os resultados das provas tuberculínicas (PT) de trabalhadores da área da saúde.....32

Tabelas.

Tabela 1. Características sócio-demográficas dos trabalhadores da área da saúde.....23

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Histórico.....	1
1.2. Epidemiologia da tuberculose.....	4
1.3. Agente Etiológico da tuberculose.....	6
1.4. Etiologia e Patogenia da tuberculose.....	9
1.5. Resposta Imune à Tuberculose.....	11
1.6. Sorodiagnóstico e os Antígenos de <i>M. tuberculosis</i>	16
1.7. Tuberculose Latente.....	19
1.8. Trabalhadores da Área da Saúde.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos Específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	23
4.1. Grupo de estudo.....	23
4.2. Antígenos Recombinantes.....	24
4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	26
4.4. Limiar de reatividade (cut off).....	26
4.5. Análise Estatística.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Resposta Imune Humoral dos trabalhadores da área da saúde.....	27
5.2. Influência da vacinação com BCG e do ambiente de trabalho na resposta imune humoral dos trabalhadores da área da saúde.....	29
5.3. Relação entre Resposta Imune Humoral e Celular.....	31
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÕES.....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

9. ANEXOS	52
9.1. Termo de consentimento livre e esclarecido para a pesquisa proposta e situação problema.....	52
9.2. Questionário padronizado para coleta de dados da pesquisa	54

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas do mundo e permanece até os dias atuais como um problema de saúde pública. Estima-se que um terço da população mundial está infectada. O Brasil é considerado área endêmica da TB e em 2005 apresentou taxa de incidência de 60 casos a cada 100.000 habitantes. Atualmente um dos principais desafios no controle da tuberculose é a identificação dos portadores latentes. Trabalhadores da área da saúde são expostos a um alto risco de infecção e por isso têm aumentadas as chances de se tornarem portadores latentes. Com intuito de elucidar o perfil sorológico de portadores latentes, avaliamos a resposta imune humoral de trabalhadores da área da saúde frente a antígenos recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis*, GLcB, Hsp₉₀ e MPT51, utilizando a técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA). Constatou-se que quase 70% dos trabalhadores da saúde apresentaram anticorpos contra tais antígenos. Nas dosagens de IgM apenas naquela contra o Hsp₉₀ os trabalhadores da saúde prova tuberculínica (PT) negativa apresentaram níveis de anticorpos superiores aos dos trabalhadores PT positiva. Nas dosagens de IgG trabalhadores PT negativa ou positiva apresentaram níveis semelhantes de anticorpos. Homens e mulheres apresentaram níveis similares de anticorpos (IgM ou IgG) contra os antígenos recombinantes. Os níveis de anticorpos de indivíduos BCG-vacinados e BCG-não-vacinados também foram semelhantes, bem como entre indivíduos de diferentes categorias profissionais, independentemente da classe da imunoglobulina testada. Não houve correlação entre nível de anticorpo (resposta humoral) e o resultado da prova tuberculínica dos trabalhadores da saúde (resposta celular). Os resultados deste trabalho permitem concluir que os trabalhadores da área da saúde reconhecem os antígenos protéicos recombinantes GLcB, Hsp₉₀ e MPT51 do *Mycobacterium tuberculosis* independentemente de reação à prova tuberculínica.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), one of the oldest disease in the world, is until our days a public health concern. It's believed that one third of the world's population is latently infected. Brazil is an endemic area for TB and its incidence in 2005 was about 60 cases per 100.000 inhabitants. One of the most important challenge in TB control is the identification of individuals who are latent infected. Health Care Workers (HCW) are at high risk of getting infected with *Mycobacterium tuberculosis* and because of that they had increased chances to became ill. The aim of this work was to elucidate the sorological profile of latent infected HCW through the antibody response against proteic recombinant antigens from *Mycobacterium tuberculosis*, GLcB, Hspx and MPT51. It was observed that almost 70% of HCW presented antibodies (IgM and IgG) against these antigens. When IgM was measured, the negative TST HCW showed higher antibodies's levels than the positive TST HCW. When IgG was measured, negative and positive TST HCW showed similar antibodies's levels. Men and women also showed similar antibodies's levels against those antigens. The antibodies's levels were also similar between BCG-vaccinated and BCG non-vaccinated HCW, the same occurs among the different professional categories. There isn't any relation between the antibody responses (humoral response) and TST results (cellular response). These results showed that the majority of the HCW presented antibodies against the proteic recombinant antigens GLcB, Hspx e MPT51 of *Mycobacterium tuberculosis* independent of the TST response.

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO

A tuberculose é uma das doenças infecciosas mais antigas do mundo. Estima-se que a bactéria progenitora do *Mycobacterium tuberculosis* surgiu há 3 milhões de anos e que ela possa ter infectado os ancestrais humanos já naquele tempo (Gutierrez et al. 2005). A migração dos primeiros hominídeos da África iniciou-se há cerca de 1,7 milhões de anos, distribuindo os primeiros habitantes pela terra, e estes provavelmente levaram consigo todos os seus indesejados hóspedes (Gibbons 2001). Há registros de deformações ósseas associadas à tuberculose, como a doença de Pott, em múmias egípcias de 5000 anos atrás (Cave 1939). Registros de resquícios de tuberculose na Índia e na China datam, respectivamente, cerca de 3300 e 2300 anos atrás. Na América do Sul também existem resquícios de deformidades ósseas sugestivas de tuberculose em múmias andinas (Daniel 2006).

Na Grécia antiga a tuberculose era conhecida como *phthisis* ou 'consumação'. Hipócrates, por volta de 460 A.C., registrou que esta doença atingiu os maiores contingentes populacionais de seu tempo e era quase sempre fatal. Naquela época a maioria dos autores acreditava que a doença era hereditária. Já Aristóteles (384-322 A.C.) a considerava contagiosa. Clarissimus Galen, médico de maior expressão após Hipócrates, definiu *phthisis* como a 'ulceração dos pulmões, peito ou garganta, acrescida de tosse, febre baixa e perda de peso' (Pease 1940).

A grande epidemia de tuberculose, que ficaria conhecida também como a 'praga branca', provavelmente iniciou-se nos primórdios do século XVII e persistiu cerca de duzentos anos. Os primeiros registros anatômicos e patológicos desta doença também ocorreram naquele século. O médico inglês, Richard Morton, confirmou a existência de tubérculos nos pulmões de indivíduos com tuberculose. Gaspard Laurent Bayle provou que os tubérculos eram a causa e não produtos da tuberculose. O nome 'tuberculose' foi utilizado pela primeira vez pelo médico e professor alemão

Johann Lukas Schönlein para descrever a ‘doença com tubérculos’ (Leão & Portaels 2007).

A tuberculose teve seu agente etiológico identificado em 1882 por Robert Koch. Influenciado pelo seu mentor Jacob Henle, Koch, além da identificação do bacilo tuberculóide, apresentou critérios para estabelecer a etiologia de doenças infecciosas. Estes estudos seriam mais tarde conhecidos como os ‘Postulados de Henle-Koch’, e foram publicados em 1890 (Daniel 2006). Também em 1890, Koch apresenta no Décimo Congresso de Medicina de Berlin a tuberculina, uma substância obtida a partir de extratos das culturas do bacilo tuberculóide com glicerol, que poderia ser utilizada no tratamento da tuberculose. O uso da tuberculina no tratamento demonstrou ser ineficaz, no entanto, provou ter valor para o diagnóstico da doença (Kaufmman & Schaible 2005).

O tratamento da tuberculose inicialmente baseou-se na administração de arsênio e ouro mas, eram muitos os efeitos adversos (Benedek 2004). Na metade de século XIX os doentes começaram a se recolher a sanatórios, onde além de descansar recebiam cuidados médicos, dietas ricas em proteínas, exercícios monitorados (Daniel 2006). Os sanatórios são considerados a primeira abordagem terapêutica contra a tuberculose.

Em 1895, a descoberta dos raios-X por Wilhelm Konrad Von Röntgen significou um grande avanço no diagnóstico e acompanhamento da doença. Em 1921, Albert Calmette e Camille Guérin iniciaram estudos clínicos com uma vacina desenvolvida por eles constituída pelo causador da tuberculose bovina, o *Mycobacterium bovis*, atenuado. A vacina ficou conhecida como BCG (bacilo Calmette-Guérin) e a partir de 1950 já era recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Andersen & Doherty 2005).

A partir de 1930, com a descoberta dos antibióticos, novas perspectivas para as doenças como a tuberculose surgiram, e a quimioterapia prometia ser um grande avanço no tratamento e cura de tais doenças. Em 1944, em New Jersey, Selman Waksman e Albert Shatz identificaram a estreptomicina (SM), simultaneamente, na Suécia, Jörgen Lehmann descrevia o sal para-amino-ácido do ácido salicílico (PAS). Estas duas substâncias se mostraram ativas no tratamento contra a tuberculose e,

em 1950 foram publicados estudos demonstrando que a combinação entre as duas era mais eficaz do que o uso delas em separado (Iseman 2002).

Novas drogas foram descobertas ao decorrer do tempo e novos esquemas terapêuticos introduzidos. A combinação de pelo menos três substâncias compõe o regime de tratamento em uso. Dentre as drogas de escolha estão a rifampicina, isoniazida, pirazinamida e o etambutol (Chan & Iseman 2002).

O sucesso do uso destas drogas, no final da década de 70 e início da década de 80, sugeriu que a tuberculose seria um problema controlável, uma doença perto de eliminação (Costa 1988). No entanto, houve um aumento no abandono do tratamento dando origem ao fenômeno da multi-resistência, no qual algumas cepas do bacilo conseguem neutralizar a ação de algumas drogas usadas no tratamento. Mais tarde uma epidemia emergente, a síndrome da imunodeficiência adquirida (em inglês AIDS – acquired immunodeficiency syndrome), também contribuiu para o aumento do número de casos de tuberculose (Leão & Portaels 2007).

A Organização Mundial da Saúde - OMS (ou do inglês World Health Organization - WHO), em 1993, chama a atenção internacional para o perigo representado pela tuberculose, e sugere o tratamento diretamente observado de curta duração (do inglês DOTS - Directly Observed Treatment Short Course) como estratégia de ação para controle da doença. As recomendações também incluíam o comprometimento dos governos, principalmente a garantia do suprimento dos medicamentos (WHO 1993). No Brasil as medidas sugeridas foram implantadas a partir de 1996. O Ministério da Saúde elaborou um plano emergencial para o controle da enfermidade através da implementação de atividades específicas em 230 municípios prioritários, nos quais se concentravam 75% dos casos estimados para o Brasil (Ruffino-Neto 2002).

Outras organizações, como a IUATLD (Internacional Union Against Tuberculosis and Lung Disease), se unem à WHO na luta contra a tuberculose e, na Assembléia Mundial de Saúde de 2000 reafirmam parceria e estabelecem novas metas, como a detecção de 70% dos novos casos e cura de 85% destes casos até o ano de 2005. Além disso, a redução da incidência, chegando a 50% dos níveis de 1990 e a eliminação

da doença como problema público de saúde até o ano de 2050 (incidência global de 1/ 1.000.000.000 habitantes) (WHO 2000).

Apesar do esforço global, a tuberculose persiste. O fenômeno da multi-resistência se agrava e se torna mais frequente, alcançado índices em torno de 10% dos casos novos identificados na Estônia, Letônia e partes da Rússia (Dye 2006).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que dois bilhões de pessoas no mundo estão infectadas com o *M. tuberculosis*. Isso significa que a cada três pessoas uma é portadora do bacilo e que em 2004 houve 8.9 milhões de casos novos no mundo. A África é a região com o mais alto índice de incidência, 356 por 100.000 habitantes por ano, no entanto, a maioria dos doentes de tuberculose vive nos países mais populosos da Ásia. Bangladesh, China, Índia, Indonésia e Paquistão, juntos, são responsáveis pela metade dos novos casos registrados no mundo. Apenas vinte e dois países são responsáveis por oitenta por cento dos novos casos. Um milhão e setecentas mil mortes foram registradas no ano de 2004, situando a tuberculose em sétimo lugar no ranking mundial das causas de morte (Dye et al. 1999)(Dye 2006).

A tuberculose também retarda o desenvolvimento sócio-econômico, 75% dos doentes estão em idade produtiva, entre 15-54 anos. Nos países em desenvolvimento se encontram 95% do total de casos e 99% das mortes (WHO 2006). Na maioria dos países e na maioria dos casos, os homens são mais atingidos pela doença do que as mulheres. Em regiões onde a transmissão é estável por muitos anos ou o aumento da doença é muito grande, a incidência se torna maior entre adultos jovens. Grupos de idosos são atingidos quando os casos de tuberculose são os de reativação de infecção latente (Borgdorff et al. 2000).

A tuberculose e a AIDS formam uma combinação letal, na qual a presença de uma acelera o desenvolvimento da outra. A co-infecção com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) constitui fator de risco para os pacientes com tuberculose, tanto na reativação de uma infecção latente quanto na rápida progressão de uma infecção recente. Dos 8,3 milhões de

casos novos de tuberculose registrados em 2000 no mundo, nove por cento (7-12%) são associados ao HIV e esta proporção aumenta na região africana e também em alguns países industrializados como os Estados Unidos (Cobbert et al. 2003).

O aumento global da doença também pode ser atribuído à proliferação de casos nos países do leste europeu, desde os anos 90, em função do declínio econômico e das precárias condições de saúde. A África sub-Saariana desde metade dos anos 80 vem também contribuindo para este aumento principalmente devido à epidemia de AIDS que assola aquela região. Porém, já existem registros da desaceleração da incidência em ambas as regiões (Dye 2006). A queda na incidência foi relativamente rápida na Europa Central e na América Latina (WHO 2006).

O Brasil é um país em desenvolvimento que faz parte do grupo dos vinte e dois países que detém 80% dos casos novos de tuberculose. Apesar da queda na taxa de incidência na América Latina e da cobertura do DOTS no país ter crescido, alcançando 68% no ano de 2005 (WHO 2005), a tuberculose ainda é um problema de saúde pública.

O Brasil tem uma das maiores taxas de incidência do mundo, e em 2005 chegou a 60 casos por 100.000 habitantes e a doença está distribuída por todo o país. No ano de 2005, as regiões Norte, Nordeste e Sudeste apresentaram as maiores taxas de incidência, 47,55, 48,67 e 45,25, respectivamente, enquanto as regiões Sul e Centro-Oeste apresentam as menores taxas, com 32,62 e 25,82, respectivamente (MS/SVS 2005).

De 2001 a 2004, a região Centro-Oeste apresentou queda na taxa de incidência da tuberculose. Goiás foi o único estado da região a acompanhar esta queda. No ano de 2005, a região Centro-Oeste apresentou ligeiro aumento na taxa de incidência, e Goiás foi responsável por 975 novos casos neste mesmo ano. A região metropolitana de Goiânia, capital do estado, foi responsável por 358 novos casos, apresentando taxa de incidência (19,15) superior a do estado (17,35) (MS/SVS 2005).

O governo brasileiro priorizou o controle da tuberculose e 70% dos casos novos já estão sendo identificados, no entanto, a meta estabelecida para cura destes casos novos (85%) não foi alcançada devido principalmente ao abandono do tratamento (Hijjar 2005).

1.3. AGENTE ETIOLÓGICO

O *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), agente causador da tuberculose, é uma micobactéria pertencente à ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacteriaceae*, família das *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium* (Aranaz et al. 1999). Pertence também ao chamado complexo *Mycobacterium tuberculosis*, constituído de sete espécies e subespécies que incluem o *M. canettii*, o *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e o *M. caprae*. Este complexo tem como característica marcante a pouquíssima variação genética inter-espécies, apresentando 99% de identidade nas sequências de nucleotídeos, contudo há poucas evidências de transmissão horizontal de genes entre os seus membros. Acredita-se que os constituintes do complexo *M. tuberculosis* são patógenos relativamente recentes que derivam de um ancestral comum (Ernest et al. 2007).

O *M. tuberculosis* é uma bactéria intracelular facultativa, em forma de bastonetes retos e finos, e por isso também chamados de bacilos, sem flagelos, que não formam esporos nem produzem toxinas. Apresentam longo período de replicação, de 16 a 20 horas e podem ser cultivados em meios de cultura como o Lowenstein-Jensen e Middlebrook (Crump et al. 2003).

Alguns gêneros, como *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Gordona* e *Rhodococcus*, possuem estrutura e componentes da parede celular similares aos do *Mycobacterium sp*, e por isso existem semelhanças entre os fenótipos, entretanto os ácidos micólicos presentes na parede celular do bacilo o distinguem das outras micobactérias (Rastogi & Sola 2007).

A característica mais marcante do bacilo é o seu envelope. Este envelope é formado pela membrana plasmática, parede celular e uma camada exterior. A membrana citoplasmática é composta por lipopolissacarídeos, que também estão presentes em outras bactérias do gênero e conferem proteção osmótica. Proteínas também compõem esta membrana e desempenham as mais diversas funções, como por exemplo a

de enzimas reguladoras do processo metabólico e da geração de energia (Rastogi & Sola 2007).

A membrana plasmática é envolta por uma complexa parede celular. A parede celular é a estrutura responsável pela proteção dos constituintes celulares e pelo suporte mecânico, conferindo ao bacilo a sua forma característica. Ela é composta por uma camada interna de peptideoglicano (PG), sutilmente diferente dos presentes nas demais micobactérias. Covalentemente ligados ao PG estão ramos de polissacarídeos, os arabinogalactanos (AG), cuja porção final é esterificada com ácidos graxos de alto peso molecular, os chamados ácidos micólicos. Esta estrutura é chamada de complexo micólico-arabinogalactano-peptideoglicano (em inglês mAGP complex - mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex) (Brennan 2003). Os arranjos dos ácidos micólicos são espécie-específicos, propriedade que permite a identificação de várias espécies de micobactérias por diferentes técnicas (Rastogi & Sola 2007).

A camada exterior à parede celular apresenta uma grande variedade de lipídeos livres: os pitioceros dimicoserosato (PDIM), glicolípido fenólico (PGL) e o sulfolípido (SL) e glicolípido de trealose. Atravessando todo o envelope, com uma extremidade ancorada na membrana plasmática, encontram-se alguns glicolípido como o fosfatidilinositol manisídeo (do inglês, phosphatidyl inositol mannosides – PIM), as lipomananas (LM) e as lipoarabinomananas (LAM). Estas últimas também são espécie-específicas (Brennan 2003). Intercaladas na parede celular existem algumas proteínas. Umas são residentes e outras se encontram em processo de secreção. Algumas destas proteínas são responsáveis pela manutenção da parede celular durante toda a vida do bacilo (Rastogi & Sola 2007).

A complexa parede celular do *M. tuberculosis* confere grande proteção ao bacilo, protegendo-o da ação de enzimas hidrolíticas e radicais tóxicos produzidos pelos macrófagos (Tiwari et al. 2004). O *Mycobacterium* sobrevive em tecidos com alta tensão de oxigênio, como o encontrado nos pulmões. O dióxido de carbono é essencial e pode ser obtido da atmosfera ou dos carbonatos/bicarbonatos, a temperatura ideal é a de 37°C e o pH neutro, exatamente o ambiente oferecido por animais de sangue quente (Rastogi & Sola 2007).

O bacilo consegue sobreviver a algumas condições adversas, como microambientes ácidos ou básicos, gerados pela interação com os mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como aos ácidos presentes no estômago. O *Mycobacterium tuberculosis* também suporta temperaturas muito baixas, sua viabilidade permanece mesmo após congelamento por longos períodos (de 2-4^oC a -70^oC), exigindo apenas um período de readaptação (Kim 1979). Ele consegue sobreviver a baixas concentrações de oxigênio, contando apenas com o suficiente para se adaptar a um metabolismo fermentador (Wayne & Lin 1982). Entretanto, o bacilo se mostra bastante sensível ao calor, luz do sol ou radiação ultravioleta (Hobday 1997).

Em 1998, Cole e colaboradores identificaram a completa sequência genômica da cepa H37Rv do *M. tuberculosis*, constituída de 3924 genes individuais, totalizando 4.411.529 pares de base (Cole et al. 1998). A elucidação completa do genoma permitiu a ampliação do conhecimento sobre os vários aspectos desta bactéria, como o seu crescimento lento, a natureza complexa da sua parede celular, a associação de certos genes à virulência e persistência, a aparente estabilidade do seu genoma, etc (Menéndez & Garcia 2007) o conhecimento do genoma do *M. tuberculosis* H37Rv, do *M. tuberculosis* CDC 1551 e do *M. bovis*, tornou possível o estudo das proteínas expressas por estes bacilos, sua estrutura e função (www.tuberculosistextbook.com/). Acredita-se que o *M. tuberculosis* produza cerca de 1.044 proteínas (Mawuenyega et al. 2005).

A análise das proteínas, a comparação com a expressão gênica nos diferentes estados fisiológicos permite a associação dos efeitos biológicos com a composição protéica (Jungblut et al. 1999). A identificação das proteínas expressas pelo *M. tuberculosis* em culturas *in vitro* (Samanich et al. 1998) contribuiu para a correlação de certas proteínas às fases da tuberculose (Demissie et al. 2006).

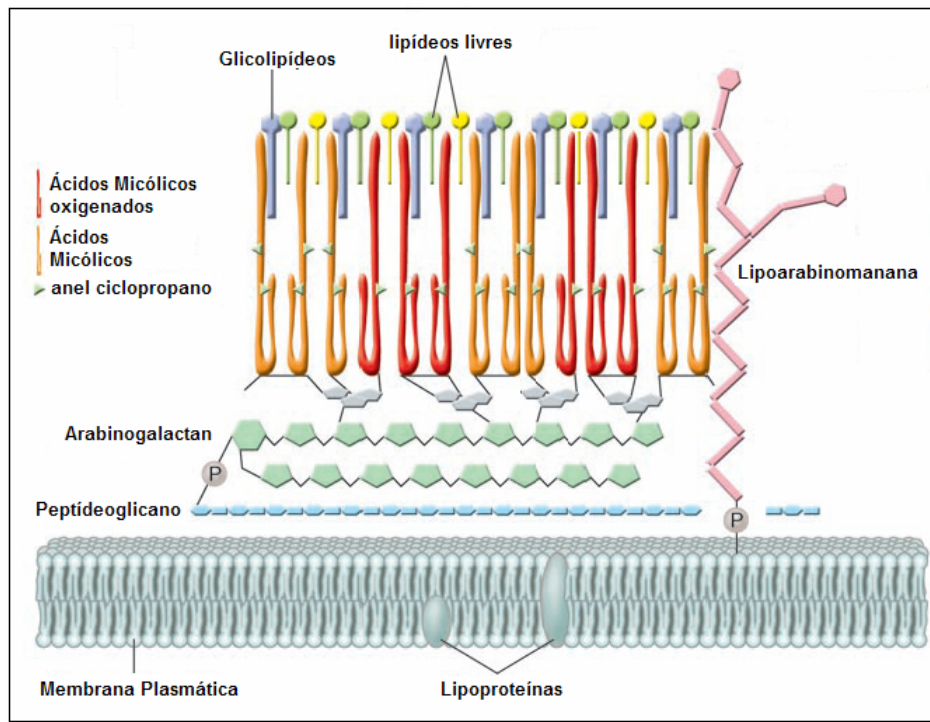


Figura 1. Componentes do envelope do *Mycobacterium tuberculosis* baseado em (Riley 2006).

1.4. ETIOLOGIA e PATOGENIA

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *M. tuberculosis*. A principal manifestação da doença se dá nos pulmões, todavia outros órgãos podem ser acometidos (Robbins et al. 1984). A transmissão ocorre por meio da inalação do bacilo contido em gotículas expelidas por indivíduos com a doença clinicamente ativa, através da fala, tosse ou espirro (Doherty & Anderesen 2005). O estabelecimento da doença 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).

Cerca de 25 a 50% dos indivíduos expostos ao contato com a tuberculose pulmonar ativa se tornarão portadores latentes do bacilo. Doze (12) horas ou mais de exposição constituem alto fator de risco, especialmente em ambientes fechados ou sem medidas de biossegurança, como prisões e hospitais. (Kritski & Melo 2007).

Os bacilos que conseguem ultrapassar as barreiras do trato respiratório superior e alcançar os alvéolos pulmonares são capturados pelos macrófagos residentes que iniciam o processo de eliminação. Citocinas pró-inflamatórias (como a interleucina 1- IL-1, a IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa – TNF- α) e quimiocinas (como a CCL2, CCL3, CCL7) são secretadas pelos macrófagos infectados e estimulam a migração de células sanguíneas para o sítio da infecção. Citocinas como a IL-12 estimulam a ação bactericida nos macrófagos e aceleram o recrutamento das células do sangue. Ela também induz a secreção de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ) responsáveis pelo controle imunológico da infecção pelo *M. tuberculosis* (Hsieh et al. 1993).

No decorrer do processo inflamatório os monócitos evoluem para células epitelióides e células gigantes multinucleadas e, conjuntamente com os linfócitos e os polimorfonucleares circundam os macrófagos infectados formando o granuloma (Andersen 1997). A principal citocina envolvida na formação do granuloma é o TNF- α , produzido pelos macrófagos, células dendríticas e linfócitos T em resposta ao *M. tuberculosis*. Esta citocina tem múltiplos papéis na resposta imunológica e na patologia da doença. Ao mesmo tempo em que limita a infecção aos pulmões, agindo como modulador da inflamação, o TNF- α pode causar grande lesão tecidual (Flynn & Chan 2001). Além disso, ele também é responsável por alguns dos sintomas da doença como febre e perda de peso (Moreira et al. 1993).

Em indivíduos mais susceptíveis o granuloma não é capaz de controlar a infecção e o recrutamento celular é mantido. A amplificação da resposta do hospedeiro leva a uma intensa inflamação, destruição tecidual, necrose caseosa e formação de lesões cavitárias. Essa é uma forma de reação de hipersensibilidade tardia (do inglês, delayed-type hypersensitivity – DTH) ao bacilo (Dannenberg 1994). Neste momento pode haver disseminação de bactérias viáveis para outros órgãos através da via hematogênica (Andersen 1997). As bactérias viáveis podem também cair nos brônquios, resultando na contínua eliminação de material infectante nas expectorações (escarro) (Spencer 1985), constituindo fonte de disseminação aérea da doença.

A maioria dos indivíduos consegue conter a infecção, permanecendo assintomáticos. As lesões são encapsuladas e deixam apenas uma cicatriz calcificada no local do granuloma. Entretanto, alguns bacilos conseguem sobreviver e se manter em estado quiescente por vários anos até que eventualmente o hospedeiro sofra algum tipo de imunodepressão e o ambiente se torne favorável à sua replicação (Smith & Wiegshauss 1989).

1.5. RESPOSTA IMUNE À TUBERCULOSE

O *M. tuberculosis* é um bacilo intracelular que desencadeia no hospedeiro uma ampla resposta imune. Inicialmente os bacilos que alcançam os pulmões são reconhecidos pelos macrófagos residentes, havendo evidências de que as células dendríticas e epitelióides alveolares também são capazes de reconhecê-los (Bermudez et al. 2002, Bhatt et al. 2004).

O reconhecimento acontece através de uma grande variedade de receptores, como os da fração Fc dos anticorpos, os TLR (do inglês Toll Like Receptors), principalmente o TLR2 e o TLR4, os receptores do sistema complemento, como o CR3, os receptores de manose, os receptores de proteína surfactante e o CD14 (Collins & Kaufmann 2001). A resposta a ser gerada dependerá de qual receptor interagir com o bacilo. A interação de receptores da fração Fc dos anticorpos com o bacilo 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 do complemento impede a geração de intermediários do oxigênio e a maturação do fagossoma que contém o bacilo, evitando a sua fusão com o lisossoma (Sturgill-Koszycki et al. 1996, Le Cabec et al. 2000)

Depois de reconhecida a bactéria é fagocitada pelo macrófago, formando o fagossoma. Em seguida ele adquire os marcadores de membrana Rab5 e EEA1, que permitem a sua fusão com as vesículas endossomais que contém hidrolases e, posteriormente, substituindo os anteriores, adquire os marcadores Rab7 e LAMP1 que dirigem a fusão com o lisossoma (Koul et al. 2004). Uma das enzimas envolvidas neste processo de maturação do

fagossoma é a TACO (do inglês, tryptophane aspartate-containing coat protein), que também está presente na membrana do fagossoma. O *M. tuberculosis* é capaz de reter esta proteína na membrana, impedindo a maturação deste fagossoma e conseqüentemente a sua fusão com o lisossoma (Ferrari et al. 1999).

As células dendríticas também passam por um processo de maturação após fagocitar o bacilo. Este processo envolve a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD40, B7.1 e B7.2), moléculas de adesão e receptores para quimiocinas, principalmente para o CCR7, que permite a migração desta célula para o linfonodo drenante mais próximo (Bhatt et al. 2004, Buettner et al. 2005). No linfonodo as células dendríticas apresentam os antígenos micobacterianos às células T CD4⁺ e CD8⁺ virgens, que se ativam, proliferam e migram de volta ao sítio da inflamação para exercerem suas funções efetoras (Tufariello et al. 2003).

No sítio da infecção, enquanto processam o bacilo, macrófagos e células dendríticas secretam citocinas e quimiocinas proinflamatórias, como o TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e MIP-1 que desencadeiam a migração de células sanguíneas para o sítio da infecção (Dannenberg 1993). Toda essa mobilização de células culminará no isolamento do macrófago infectado, levando à formação do granuloma, promovendo a interação entre as células imunes para a eliminação do bacilo, limitando a inflamação a um sítio específico e impedindo a disseminação do bacilo (Algood et al. 2005).

O granuloma é a lesão característica da tuberculose, e se constitui numa estrutura bem organizada, entretanto a natureza das células recrutadas e o relacionamento espacial entre elas ainda estão sendo esclarecidos (Gonzalez-Juarrero et al. 2001, Kaplan et al. 2003, Ulrichs et al. 2004). Estudos imunohistoquímicos em camundongos revelaram que as células 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 no centro do granuloma. Em humanos ocorre necrose caseosa central circundada por linfócitos T e macrófagos. As células mononucleares recrutadas se desenvolvem e formam células gigantes multinucleadas

também circundando este sítio. Polimorfonucleares como os neutrófilos também estão presentes. A característica comum às duas espécies é a formação de agregados de células B. Nos humanos esses agregados situam-se na periferia dos linfócitos T e macrófagos que envolvem a necrose, cercados por células T e por alguns macrófagos randomicamente distribuídos (Tsai et al. 2006).

O granuloma é o local de interações intensas e dinâmicas entre as células T, os macrófagos e as células dendríticas (Tsai et al. 2006). Os macrófagos e as células dendríticas processam o bacilo nos seus fagolisossomas e apresentam os peptídeos resultantes complexados às moléculas de histocompatibilidade principal (do inglês Major Histocompatibility Complex – MHC) de classe I e II às células T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente. Ao mesmo tempo secretam citocinas que atuam estimulando as células produtoras de IFN- γ , que por sua vez potencializam a ação microbicida dos macrófagos com a conseqüente destruição do bacilo (Flynn & Chan 2001).

A IL-12 é a principal citocina produzida por macrófagos e células dendríticas após a fagocitose do bacilo. Ela estimula as células T (CD4⁺ e CD8⁺) e NK a secretarem IFN- γ , principal indutor da produção de óxido nítrico (NO) e de reativos intermediários do oxigênio (do inglês, reactive nitrogen intermediates – RNI) através da ação da óxido nítrico sintase (do inglês, nitric oxide synthase - NOS2), responsáveis pela destruição do bacilo (Ding et al. 1988). Este perfil de citocinas (IL-12, IFN- γ) chamado de Th1 é o principal responsável pela resposta protetora à infecção com *M. tuberculosis* (Flynn & Chan 2001). Camundongos BALB/C que receberam IL-12 antes de serem desafiados com o *M. tuberculosis*, apresentaram carga bacteriana reduzida e aumento na sobrevida (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), sugerindo ser o padrão Th1 protetor também em humanos.

As células T CD4⁺ são as principais células envolvidas na ativação dos macrófagos, produzindo IFN- γ que age sobre estes macrófagos ativando-os e induzindo os mecanismos microbicidas. O IFN- γ juntamente com o TNF- α potencializam ainda mais a ação microbicida dos macrófagos (Kaufmann

2002). Experimentos com murinos depletados de células T CD4⁺ demonstram a importância destas células na resposta à infecção pelo *M. tuberculosis* (Muller et al. 1987). Pessoas com prova tuberculínica positiva (PT+), co-infectados com o HIV, apresentam chances aumentadas tanto de desenvolver quanto de reativar a tuberculose, quando os níveis de células T CD4⁺ se encontram baixos no sangue periférico (Selwyn et al. 1989). Em um modelo murino de tuberculose latente a depleção por anticorpos de células T CD4⁺ resultou na rápida reativação da doença, apesar da presença do IFN- γ e da enzima indutora da produção de óxido nítrico (do inglês inducible nitric oxide synthase - iNOS), sugerindo que estas células tenham um papel adicional na prevenção da reativação da tuberculose (Scanga et al. 2000). Na tuberculose humana algumas evidências experimentais sugerem que as células T CD4⁺ desempenham também uma ação citolítica na resposta imune no pulmão (Tan et al. 2000).

A célula T CD8⁺ é outra célula envolvida na resposta à infecção pelo *M. tuberculosis*. Células T CD8⁺ específicas para antígenos micobacterianos têm sido isoladas de hospedeiros infectados ou geradas por imunização (Lalvani et al. 1998). Camundongos deficientes em β_2 -microglobulina, proteína associada à molécula principal de histocompatibilidade (MHC), CD8 α e perforina são mais susceptíveis à infecção com o bacilo da tuberculose do que o tipo selvagem (Collins et al. 2001). Os mecanismos efetores das células T CD8⁺ são constituídos pela secreção de IFN- γ e TNF- α , e a ação citotóxica sobre a célula infectada através da liberação de grânulos contendo perforina, granzima e granulosa (Collins et al. 2001), ou induzindo apoptose pela via CD95-CD123 (Brookes et al. 2003).

Existe um tipo mais raro de célula T, a célula T $\gamma\delta$, também presente na resposta ao bacilo da tuberculose. Esta célula representa menos de 5% dos linfócitos do sangue periférico de camundongos e humanos (Janis et al. 1989). Alguns estudos têm sugerido que a célula T $\gamma\delta$ pode estar envolvida na primeira linha de defesa contra as proteínas micobacterianas de choque térmico ou ainda de ligantes não-peptídicos de baixo peso molecular (Andersen 1997). Outra provável explicação para o recrutamento destas células para o local da infecção micobacteriana é que elas direcionariam a

formação do granuloma, isso esclareceria o desaparecimento das células T $\gamma\delta$ da circulação sanguínea de pacientes com tuberculose (Collins et al. 2001).

Acredita-se que as células NK (do inglês natural killer) estão envolvidas na primeira linha de defesa contra a infecção com o *M. tuberculosis*. Estas células se mostraram aumentadas nos pulmões de camundongos C57BL/6 nos primeiros 21 dias após a infecção por aerossol com micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, estando também associados altos níveis de IFN- γ . Entretanto a depleção das células NK nestes camundongos não influenciou a diminuição da carga bacteriana, demonstrando que apesar da produção de IFN- γ não são essenciais para a resistência do hospedeiro (Junqueira-Kipnis et al. 2003).

As células B também estão presentes no sítio de infecção e participam da resposta imune (Tsai et al. 2006). Porém, as células B são ativadas principalmente no linfonodo drenante. A célula dendrítica madura chega ao linfonodo e prima células T, que podem ativar células B tanto pela secreção de IL-2, IL-4 e IL-5, quanto pelo contato intercelular direto (Clark et al. 1992). No contato célula B e T, a interação entre a molécula CD40 e CD40-Ligante, presente respectivamente nas células B e T, é fundamental para a completa ativação da célula B (Noelle et al. 1992). Após ativação a célula B entra em proliferação, e gera dois clones: um de células B de memória e outro de células B efetoras, que são as produtoras de anticorpos, chamadas de plasmócitos (McHeyzer-Williams et al. 2005). A detecção da presença de anticorpos contra antígenos micobacterianos é o método mais utilizado para testes de diagnóstico na tuberculose (Laal et al. 1997, Senol et al. 2007). Novos aspectos sobre a função da célula B, além da produção de anticorpos, também vêm sendo pesquisados, e um estudo revela uma possível contribuição desta célula no controle da progressão da inflamação e da carga bacteriana em camundongos desafiados com o *M. tuberculosis* (Maglione et al. 2007).

Apesar da resposta Th1 conseguir limitar a replicação do bacilo e a sua disseminação, ela ocasiona lesão tecidual. O sistema imune possui os seus mecanismos de supressão para controlar a imunopatologia gerada. A produção de citocinas antiinflamatórias, como a IL-4 e IL10 (Th2), em

resposta a antígenos persistentes como o *M. tuberculosis*, pode regular a resposta imune, reduzindo o dano tecidual, no entanto, o excesso dessas citocinas também podem resultar na falha do controle da infecção (Sharma & Bose 2001). A exacerbação da resposta gerada por qualquer um dos dois perfis, Th1 (IL-12, IFN- γ) ou Th2 (IL-4), pode causar doença, apesar de um regular o outro.

Uma nova população de células T CD4⁺ que podem estar envolvidas no processo de regulação da resposta imune vem sendo descrito. São as chamadas células T regulatórias (Treg) que apresentam o fenótipo CD4+CD25^{high}, representando cerca de 1-2% das células T CD4⁺ (Baecher-Allan et al. 2001). O fator de transcrição do gene que controle esta função regulatória, chamado de FoxP3 (do inglês, forkhead box p3), vem sendo usado como marcador para célula Treg, já que o CD25 é o marcador de ativação de todas as células T (Fontenot et al. 2005). O papel das células Treg na tuberculose vêm sendo estudado, e esta população de células parece estar aumentada em pacientes com a doença ativa, contribuindo para a supressão da resposta Th1 (Guyot-Revol et al. 2006).

1.6. SORODIAGNÓSTICO e os ANTÍGENOS do *M. tuberculosis*

O diagnóstico da tuberculose é baseado na detecção do bacilo em espécimes do trato respiratório inferior (tuberculose pulmonar) ou de outros sítios de infecção (tuberculose extrapulmonar). Embora vários métodos baseados em biologia molecular tenham sido desenvolvidos, os testes considerados padrão ouro para diagnóstico ainda são a baciloscopia (exame BAAR – bacilo álcool-ácido resistente) e a cultura em meio Löweinstein-Jensen do escarro de indivíduos sintomáticos (Waard & Robledo 2007).

Apesar do baixo custo e da rapidez do resultado, a baciloscopia apresenta larga amplitude na sensibilidade (30-80%), visto que alguns pacientes possuem baixa carga bacilar e conseqüentemente apresentam resultado negativo para este teste. Já a cultura se mostra mais sensível e específica e consegue detectar a presença do bacilo mesmo em pacientes

com baixa carga bacilar. Entretanto, este teste requer um tempo maior para a revelação do resultado (de 3 a 8 semanas) (Nelson et al. 1998).

A prova tuberculínica (PT) é uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da tuberculose. Este teste é feito através da avaliação da resposta imune mediada por células na forma de hipersensibilidade tardia em resposta à aplicação intradérmica de um derivado protéico purificado (do inglês purified protein derivative – PPD). A PT apresenta várias limitações: baixa especificidade em países onde há a vacinação com o BCG e a exposição a micobactérias ambientais; baixa sensibilidade em indivíduos em condições de imunodepressão (HIV positivos, tuberculose avançada, desnutridos); 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). Apesar destas limitações, a PT ainda é amplamente utilizada, principalmente no diagnóstico da tuberculose latente. O tratamento da tuberculose latente, baseada no resultado da prova tuberculínica, reduz em 60% o risco de ativação da doença (Pai et al. 2004).

Outros métodos imunológicos também são usados para inferir sobre a presença da infecção ou da doença. A imunocromatografia, o ELISA (do inglês, enzyme linked-absorbent immunoassay – ensaio imunoenzimático) e o Western blot são métodos baseados na resposta imune humoral dos indivíduos suspeitos (Daniel 1996, Gounder et al. 2002, Beck et al. 2005). Métodos baseados na resposta imune celular, como o QuantiFERON-TB, que avalia a produção de IFN- γ liberado pelas células T após estímulo com o PPD/antígenos purificados (ESAT-6 e CFP-10) (Mori et al. 2004), ou o teste ELISPOT (do inglês Enzyme-Linked ImmunoSPOT) que permite quantificar o número de células produtoras de citocinas ou de anticorpos após estímulo antigênico, também são utilizados (Sousa et al. 2000). Dentre estas técnicas, a do ELISA se sobressai principalmente em função da facilidade de execução do ensaio, que é relativamente simples e não requer aparelhos sofisticados, da boa especificidade e sensibilidade, e dos baixos custos.

Os avanços das técnicas moleculares, como o seqüenciamento genômico, a clonagem, e a expressão e purificação de proteínas, acelerou a

identificação de novos antígenos para testes sorológicos na tuberculose (Abebe et al. 2007). Dentre os mais estudados estão as proteínas do filtrado de cultura do *M. tuberculosis* (Sonnenberg & Belisle 1997, Samanich et al. 1998). As proteínas ESAT-6 (do inglês early secretory antigenic target 6) e CFP-10 (do inglês culture filtrate protein 10) que são codificadas pela região RD-1 (do inglês Region of Difference 1) de várias espécies do complexo *M. tuberculosis* exceto nos subtipos do *M. bovis*, são as proteínas mais largamente estudadas para teste de diagnóstico da tuberculose (Ravn et al. 2005, Goletti et al. 2006). Outras proteínas do filtrado de cultura foram identificadas e o seu uso em teste para diagnóstico também foi proposto, dentre elas estão a Hspx (do inglês heat shock protein- proteína de choque térmico), também chamada de α -cristalina, a malato sintase (GLcB), também chamada Mtb 81 e a MPT-51, também conhecida como FbpC1.

A Hspx (Rv2031c) é uma proteína reguladora citosólica, específica do complexo *M. tuberculosis*, e essencial para a sobrevivência do bacilo em condições hostis no hospedeiro (Wayne 1994). Esta proteína é indetectável durante o crescimento exponencial do bacilo mas é encontrada em altas concentrações durante a fase estacionária (latente) (Demissie et al. 2006), bem como em situações de estresse, onde há privação de oxigênio, nutrientes, baixo pH e acúmulo de radicais livres (Abebe et al. 2007). Alguns estudos revelam que a Hspx também pode funcionar como uma chaperonina auxiliando na manutenção da conformação final de proteínas recém formadas (Qamra et al. 2005). Bactérias depletadas do gene Acr que codifica a proteína Hspx não conseguem crescer dentro dos macrófagos (Yuan et al. 1996). A Hspx tem sido usada na detecção de anticorpos no soro de pacientes com tuberculose isoladamente ou associada a outras proteínas como a 38kDa (Beck et al. 2005, Senol et al. 2007). Usando testes de ELISA, Raja et al(2002) mostraram sensibilidades de 62%, 52% e 11% e especificidades de 100%, 97% e 95% nas dosagem de IgG, IgA e IgM em crianças com baciloscopia e cultura positivas para tuberculose.

A malato sintase ou GLcB (Rv 1837c), também chamada de Mtb81, é uma proteína de 80-88 kDa, homóloga a GLcB das bactérias *Corynebacterium glutamicum* e da *Escherichia coli*, que atua como enzima na via da síntese do glicose-oxalato, catalisando a assimilação de carbono

como fonte de energia para o bacilo (Smith et al. 2002). Recentemente a GLcB também tem sido associada à ligação do bacilo à laminina e a fibronectina das células epiteliais do pulmão através do seu domínio C terminal (Kinhikar et al. 2006). Pacientes com tuberculose apresentam forte resposta humoral à GLcB (Laal et al. 1997). Em estudos realizados com soro de pacientes com tuberculose pulmonar e co-infectados com o HIV de Uganda e da África do Sul, 92% (25/27) dos co-infectados apresentaram anticorpos contra a GLcB, enquanto 56% (38/67) dos pacientes somente com tuberculose se mostraram responsivos (Samanich et al. 2000). Vários estudos têm sugerido que esta proteína é imunodominante em pacientes HIV-negativos e TB positivos e em pacientes TB-HIV co-infectados, e que nestes últimos, anticorpos contra a GLcB estão presentes meses antes da manifestação clínica da doença (Samanich et al. 2000, Singh et al. 2005).

A MPT51 é uma proteína de 27 kDa, codificada pelo gene FbpC1 adjacente ao gene FbpA que codifica as proteínas do complexo antígeno 85 (Ag 85 A,B e C). Apesar da proximidade dos genes, que sugere um evento de duplicação de evolução recente, há diferenças estruturais entre a MPT-51 e as demais proteínas do complexo 85, refletidas na sua função biológica na parede celular do bacilo que ainda necessita de esclarecimentos (Ramalingam et al. 2004). Em seu estudo Wilson e colaboradores caracterizaram a MPT51 como uma proteína pertencente à classe das $\alpha\beta$ hidrolases não-catalíticas, com função de ligação ao tecido do hospedeiro através da fibronectina (Wilson et al. 2004). Em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) esta proteína tem alcançado índices de sensibilidade e especificidade de 71% e 95% respectivamente (Ramalingam et al. 2004). Em um teste de ELISA, dosando-se os anticorpos contra a MPT51 e a GLcB, 90% dos pacientes com tuberculose co-infectados com HIV reconheceram estas duas proteínas durante a fase subclínica da doença (Singh et al. 2005).

Um dos atuais desafios no controle da tuberculose é o diagnóstico da infecção na fase latente, na qual o indivíduo infectado é assintomático. Testes utilizando a quantificação do IFN- γ produzido por células T em resposta a antígenos micobacterianos vêm sendo propostos, e kits comerciais baseados nessa técnica já estão disponíveis. Entretanto, estes

testes são de alto custo e sua sensibilidade em áreas endêmicas da tuberculose é muitas vezes inferior a PT (Pai et al. 2004). Vários imunoensaios utilizando proteínas recombinantes do *M. tuberculosis* vêm sendo descritos para diagnóstico da tuberculose latente (Davidow et al. 2005, Demissie et al. 2006).

1.7. TUBERCULOSE LATENTE

O *M. tuberculosis* é um patógeno capaz de causar tanto a doença ativa quanto infecção latente. Na maioria dos casos o sistema imune é capaz de controlar a infecção e apenas 10% dos infectados desenvolvem a doença (Sudre et al. 1992). Alguns fatores podem contribuir para o desenvolvimento da doença, como a infecção por HIV, desnutrição, tratamento prolongado com corticóides e abuso de álcool e drogas (Flynn & Chan 2005). Mesmo após o controle da infecção primária alguns bacilos podem se manter viáveis, num estado de dormência ou de replicação muito lenta pelo resto da vida do hospedeiro. O termo latência já foi alvo de muita discussão, e o consenso atual é de que não há dormência e sim um estado de persistência sem replicação ou de replicação muito lenta (Orme 2001). O termo latente se refere então ao estado onde o indivíduo infectado permanece clinicamente assintomático. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectado pelo *M. tuberculosis*, e em áreas endêmicas da doença muitos casos novos decorrem da reativação do bacilo em indivíduos com infecção latente (Parrish et al. 1998).

Acredita-se que as condições que levem o bacilo a um estado latente são aquelas onde haja baixa concentração de oxigênio e de nutrientes e produção local de TNF- α e óxido nítrico (NO), como as encontradas no granuloma crônico (Parrish et al. 1998). Em um modelo experimental de infecção latente, o bacilo é capaz de infectar as células epiteliais do pulmão e, como estas não são células fagocitárias profissionais não conseguem destruí-lo bem como apresentá-lo via MHC II, e então o bacilo permanece dentro delas (Arriaga et al. 2002).

Para que a infecção latente se estabeleça é necessário que o bacilo se proteja das defesas do hospedeiro. É o que se denomina mecanismo de

evasão. Apesar da resposta imune do hospedeiro, o *M. tuberculosis* consegue impedir a acidificação do endossoma e a sua fusão com o lisossoma (Stewart et al. 2005), regulando negativamente a expressão de MHC de classe II (Noss et al. 2000), estimulando a secreção de citocinas imunodepressoras como a IL-10 ou TGF- β (Hirsch et al. 1994, Rojas et al. 1999).

De uma maneira mais simplista a tuberculose latente pode ser vista como o equilíbrio entre o hospedeiro e o *M. tuberculosis*. Em resposta à infecção, a maioria dos indivíduos desenvolve uma ampla resposta imune, culminando na formação do granuloma que aparentemente contem o bacilo. O hospedeiro evita o desenvolvimento da doença e o bacilo a sua eliminação (Flynn & Chan 2001).

1.8. TRABALHADORES DA ÁREA DA SAÚDE

Os países em desenvolvimento são responsáveis por 90% dos casos de tuberculose no mundo, e em consequência da limitação dos recursos financeiros o controle da doença baseia-se na detecção e tratamento dos casos novos. Muitas vezes até as medidas de baixo custo na prevenção da transmissão nos locais de atendimento são raramente implementadas (Joshi et al. 2006).

Os trabalhadores da área da saúde (TAS) constituem um grupo exposto a um alto risco de contaminação e adoecimento. Na era pré-quimioterápica para a tuberculose, o risco anual de infecção de TAS era de aproximadamente 80%. Apesar deste risco ter diminuído com o desenvolvimento da poliquimioterapia, estima-se que 1 a 10% dos TAS que atuam em instituições que registrem 200 casos de tuberculose por ano se tornarão infectados (Tam & Leung 2006).

Um estudo sobre a infecção latente da tuberculose entre TAS de países em desenvolvimento revelou que há uma grande variabilidade entre os países quanto a prevalência da infecção latente em estudantes de medicina e enfermagem (2 a 40%), porém, as estimativas individuais se correlacionavam com os índices de incidência da doença de cada país. Considerando todas as classes de trabalhadores, a prevalência da infecção

latente foi associada à idade a aos anos trabalhados na área da saúde, chegando a triplicar nos indivíduos que tinham mais de dez anos de trabalho. A prevalência entre enfermeiros foi maior do que nos outros profissionais (Joshi et al. 2006).

No Brasil, uma avaliação feita em hospitais de três capitais, Rio de Janeiro, São Paulo e Belo Horizonte, revelou altos índices de positividade (63%) e conversão (10.7/1000 p-m) na prova tuberculínica entre os trabalhadores, apesar destes índices oscilarem entre os hospitais. A positividade na PT foi maior no hospital que servia a maior população urbana, com maior incidência de indivíduos HIV positivos. Os índices de conversão na PT foram duas vezes maiores nos hospitais que não tinham medidas de controle de infecção do que os que possuíam alguma medida. Maiores índices de conversão entre enfermeiros também foram observados, sugerindo maior risco ocupacional nesta classe (Roth et al. 2005).

Um estudo realizado com trabalhadores da saúde num hospital universitário em Lima, no Peru, 63% dos participantes apresentou prova tuberculínica positiva, e 36 indivíduos desenvolveram tuberculose pulmonar (Alonso-Echanove et al. 2001). Num estudo realizado com enfermeiros de um hospital de referência em Goiânia o índice de positividade na PT foi de 69.5% e entre os participantes dois indivíduos desenvolveram tuberculose extra-pulmonar (Lopes et al. 2007).

A incidência da tuberculose entre os profissionais da área da saúde reflete as condições a que estes indivíduos estão expostos, revelando a necessidade do acompanhamento anual da saúde destes profissionais bem como de melhoria nas medidas preventivas de biossegurança, buscando a interrupção do ciclo de transmissão nosocomial da tuberculose.

2. JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma doença mundial que atinge especialmente os países em desenvolvimento como o Brasil. Indivíduos mais expostos ao risco de infecção pelo *M .tuberculosis*, como os trabalhadores da área da saúde, podem figurar entre os portadores de infecção latente, os quais não apresentam sintomatologia, podendo funcionar como 'reservatório' da

doença. Goiás apresenta grande número de novos casos, e um estudo realizado num hospital de referência no tratamento da tuberculose revela que 69.5% dos seus enfermeiros apresentam prova tuberculínica positiva (Lopes et al. 2007).

Ainda são escassos na literatura estudos sobre o perfil imunológico (celular e humoral) de trabalhadores da saúde portadores ou não de infecção latente pelo *M. tuberculosis*, e a obtenção destes dados vem adquirindo importância, principalmente para o esclarecimento do estado imunológico desta fase da doença. Com o intuito de contribuir para o esclarecimento deste problema o presente trabalho mostra o perfil de anticorpos dos trabalhadores da área da saúde de um hospital de referência para tuberculose frente a alguns antígenos recombinantes do *M. tuberculosis*, utilizando como técnica o ensaio imunoenzimático (ELISA).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Detectar, através do ensaio imunoenzimático (ELISA), a presença de anticorpos das classes IgM e IgG contra antígenos recombinantes GLcB, Hspx e MPT51 do *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2. Objetivos Específicos:

- Quantificar os níveis séricos de anticorpos (IgM e IgG) nos trabalhadores da área da saúde;
- Verificar se há influência da vacinação com BCG e do ambiente de trabalho nos níveis de anticorpos encontrados;
- Correlacionar os níveis de anticorpos encontrados nas reações de ELISA com os resultados da prova tuberculínica destes trabalhadores da área da saúde;

4. METODOLOGIA

4.1. Grupo de estudo: trabalhadores da área da saúde (TAS)

Os TAS participantes deste estudo foram recrutados no Hospital Anuar Auad (Hospital de Doenças Tropicais - HDT) de Goiânia, durante o período de junho de 2001 a junho de 2004. Duzentos e noventa e nove (299) trabalhadores aceitaram participar deste estudo. Os critérios de inclusão foram: jornada de trabalho de pelo menos vinte horas semanais, qualquer sexo ou raça, idade acima de 18 anos, ausência de histórico de doenças crônicas, ou gravidez, teste de HIV negativo, BCG vacinados ou não. Amostras de soro foram coletadas e armazenadas a -20°C até o momento da realização dos ensaios. O termo de consentimento livre e esclarecido foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do referido hospital e assinado por todos os participantes.

Trabalhadores da área da saúde (TAS) – enfermeiros e técnicos em enfermagem, médicos, nutricionistas, cozinheiras, faxineiras, funcionários da administração, laboratoristas, farmacêuticos - do Hospital HDT foram convidados a participar deste estudo. Todos os trabalhadores, que aceitaram participar e assinaram o termo de consentimento, foram submetidos à prova tuberculínica (PT), realizada no próprio HDTAA segundo a técnica de Mantoux (2U de PPD Rt 23), e classificados em PT positiva ou negativa. Do total de duzentos e noventa e nove (299) indivíduos participantes, 122 foram classificados como PT positiva (induração cutânea ≥ 10 mm de diâmetro) e 177 como PT negativa (induração cutânea < 10 mm de diâmetro). A maioria dos participantes era constituída por mulheres, com média de idade de 48 anos, vacinadas com BCG (65,5%) e com tempo médio de onze (11) anos de serviço na área da saúde. No momento da inclusão dos indivíduos na pesquisa todos estavam saudáveis. Os dados demográficos dos 299 participantes estão contidos na Tabela 1.

Tabela 1. Características sócio-demográficas dos trabalhadores da área da saúde do Hospital HDTAA de Goiânia.

	Total de participantes (299)	Idade (média/anos)	Vacinação BCG	Tempo de serviço na saúde (média/anos)
Homens	41	38,29	30/41	7,65
Mulheres	258	48,46	169/258	11,34

4.2. Antígenos Recombinantes

Mediante convênio de colaboração (NO1-AI-75320) entre a Universidade Federal de Goiás (UFG) e a Universidade do Estado do Colorado (CSU) dos Estados Unidos, os plasmídeos dos antígenos proteicos recombinantes GLcB (Rv1837c), Hsp_x (Rv2031c) e MPT51 (Rv3803c) do *M. tuberculosis* foram cedidos.

Os plasmídeos foram introduzidos em células de *E.coli* BL-21 (DE3) por eletroporação. As *E.coli* transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina (20 mg/ml) e cloranfenicol (10mg/ml) e incubadas por dezoito (18) horas em estufa a 37°C para crescimento. O crescimento neste meio refletiu o sucesso na incorporação do plasmídeo. As células transformadas foram então repicadas em 500 ml de caldo LB acrescido de ampicilina e cloranfenicol, usando as mesmas concentrações anteriores, e incubadas em shaker a 37°C. Quando atingiu-se a densidade ótica de 0,6 (OD₆₀₀) foi acrescentado 50 µl de isopropil-D- tiogalactopiranosida (IPTG) 100 mM, para indução da expressão das proteínas, e incubado por mais 4 horas no shaker a 37°C. As células induzidas foram colhidas por centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O pellet da cultura foi armazenado em freezer a -80°C até o momento da purificação. Esta primeira etapa foi realizada no Laboratório de Bacteriologia Molecular do IPTSP/UFG.

O pellet contendo as proteínas recombinantes foi ressuspenso em tampão contendo 50 mM Tris pH 8,0, 150mM NaCl e imidazol 5mM até adquirir aparência homogênea. As células foram submetidas a duas passagens no French press Cell rating (aparelho de lise mecânica por pressão negativa) a uma pressão de 2000 psi, obtendo-se um lisado límpido. A solução lisada foi centrifugada 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante, onde se encontravam as proteínas, filtrado em membrana milipore 0.40µm. Em seguida a solução filtrada foi introduzida num sistema conectado a uma coluna de níquel sefarose (ÄKTA prime, GEHeathCare) num fluxo de 5ml/min. Neste sistema a solução lisada é levada até a coluna, onde as proteínas se ligam através da sua cauda de histidina. Faz-se a

lavagem do sistema para retirada dos restos celulares e para que a densidade ótica atinja o padrão basal. Procede-se à eluição da proteína com uma solução de 50mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl e 250 mM imidazol). As frações da eluição são coletadas e analisadas em SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida a 12%. As frações contendo as proteínas são dialisadas com a solução de Tris 10mM pH 8,8, NaCl 20mM, a 4°C overnight sob leve agitação. A concentração das proteínas foi determinada através do Método de Bradford, pela comparação com uma curva padrão de albumina (Protein Assay Kit II – BioAgency). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan.

4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O antígeno protéico recombinante foi diluído em tampão 0,015M carbonato-bicarbonato pH 9,6 a 2,5µg/ml e distribuído (50µl/poço) em placas de poliestireno (NUNC) com 96 poços e incubados a 4°C overnight para adsorção. Em seguida fez-se o bloqueio da reação distribuindo-se nos poços (100 µl) PBS pH 7,3 + leite desnatado 1%, incubando-se as placas por 2 horas a 37°C. Os soros foram diluídos em PBS+ leite desnatado 0,05 %, a 1/10 para IgM, e a 1/100 para IgG, e em seguida distribuídos nos poços (50 µl) e incubados por 2 horas a 37°C. Os anticorpos de cabra anti-IgM e anti-IgG humanos marcados com peroxidase (Bio-Rad) foram diluídos em PBS pH 7,3 + leite desnatado 0,05%, a 1/3000 para IgM e a 1/15000 para IgG, e distribuídos (50µl) nos poços e incubados por 1 hora a 37°C. O volume de 50µl do substrato-cromógeno (ortofenilenodiamina – OPD - 5mg/ml+ peróxido de oxigênio 30 volumes+tampão citrato-fosfato pH 5,0-5,2) foi adicionado à placa e esta foi deixada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 minutos. Em seguida adicionou-se ácido sulfúrico 4N (50 µl) para finalizar a reação. Procede-se à leitura em espectrofotômetro para ELISA (Thermo Systems Multiskan) utilizando o filtro de 492nm. Entre as etapas de bloqueio, adição do soro e adição do conjugado, as placas foram lavadas seis vezes com PBS+tween 20 a 0,05%.

4.4. Limiar de reatividade (cut off): Consideramos leituras representativas da presença do anticorpo aquelas iguais ou superiores a dez vezes o valor da média dos controles do substrato (brancos) da reação (= 0.250).

4.5. Análise Estatística

A comparação entre as variâncias das densidades óticas (DO) e os respectivos desvios padrões (DP) obtidos nos diferentes grupos foi realizada por ANOVA, testes não paramétricos de Mann Whitney e Kruskal Wallis. Para resultados significativamente diferentes foi considerado $p < 0,05$. O teste *t* foi usado para avaliação da diferença entre as médias. Os dados foram analisados com a ajuda dos programas GraphPad Prism 4 (2002) e Excel 2007. Estes programas também foram usados na construção dos gráficos.

5. RESULTADOS

5.1. Resposta Imune Humoral dos Trabalhadores da Área da Saúde (TAS)

A maioria dos TAS apresentou anticorpos contra os antígenos recombinantes do *M. tuberculosis*. Diante do antígeno GLcB, 99% dos TAS apresentaram anticorpos da classe IgM, ou seja, dos 299 participantes 296 obtiveram leituras no ELISA (iguais ou superiores a 0.250) que refletiram a presença dos anticorpos. Dentre os TAS que apresentaram anticorpos contra GLcB, 59,5% eram PT negativa e 40,5% eram PT positiva. Frente ao mesmo antígeno, 92,7% dos TAS (277/299) apresentaram anticorpos da classe IgG, e destes 58,8% eram PT negativa e 41,2% eram PT positiva. Os TAS PT negativa e os TAS PT positiva, apresentaram níveis semelhantes de anticorpos, tanto nas dosagens da imunoglobulina de classe IgM quanto nas de classe IgG contra o GLcB (Fig. 1a e 1b).

Em relação ao antígeno Hsp α , 97% dos TAS (290/299) apresentaram anticorpos da classe IgM. Dentre estes 58,8% eram PT negativa e 41,2% eram PT positiva. Os TAS PT negativa apresentaram níveis de anticorpos IgM/Hsp α superiores aos dos TAS PT positiva, configurando uma diferença

estatística significativa entre os níveis de anticorpos destes dois grupos (Fig. 1c). Trinta e quatro e meio (34,5%) por cento dos TAS (103/299) apresentaram anticorpos da classe IgG frente ao Hspx, dos quais 63.5% eram PT negativa e 36,5% eram PT positiva. Os níveis de anticorpos se mostraram similares entre os dois grupos (Fig. 1d).

Para o antígeno MPT51, apenas 1,2% dos TAS (3/299) apresentaram anticorpos da classe IgM, sendo todos eles PT negativa (Fig. 1e). Nos TAS PT positiva não foi detectada a presença de anticorpos IgM contra o MPT51. Aproximadamente, 77% dos TAS (229/299) apresentaram anticorpos da classe IgG contra o MPT51, sendo 57,7% PT negativa e 42.3% PT positiva (Fig. 1f). Os indivíduos PT negativa e os indivíduos PT positiva apresentaram níveis de anticorpos IgG/MPT51 semelhantes entre si.

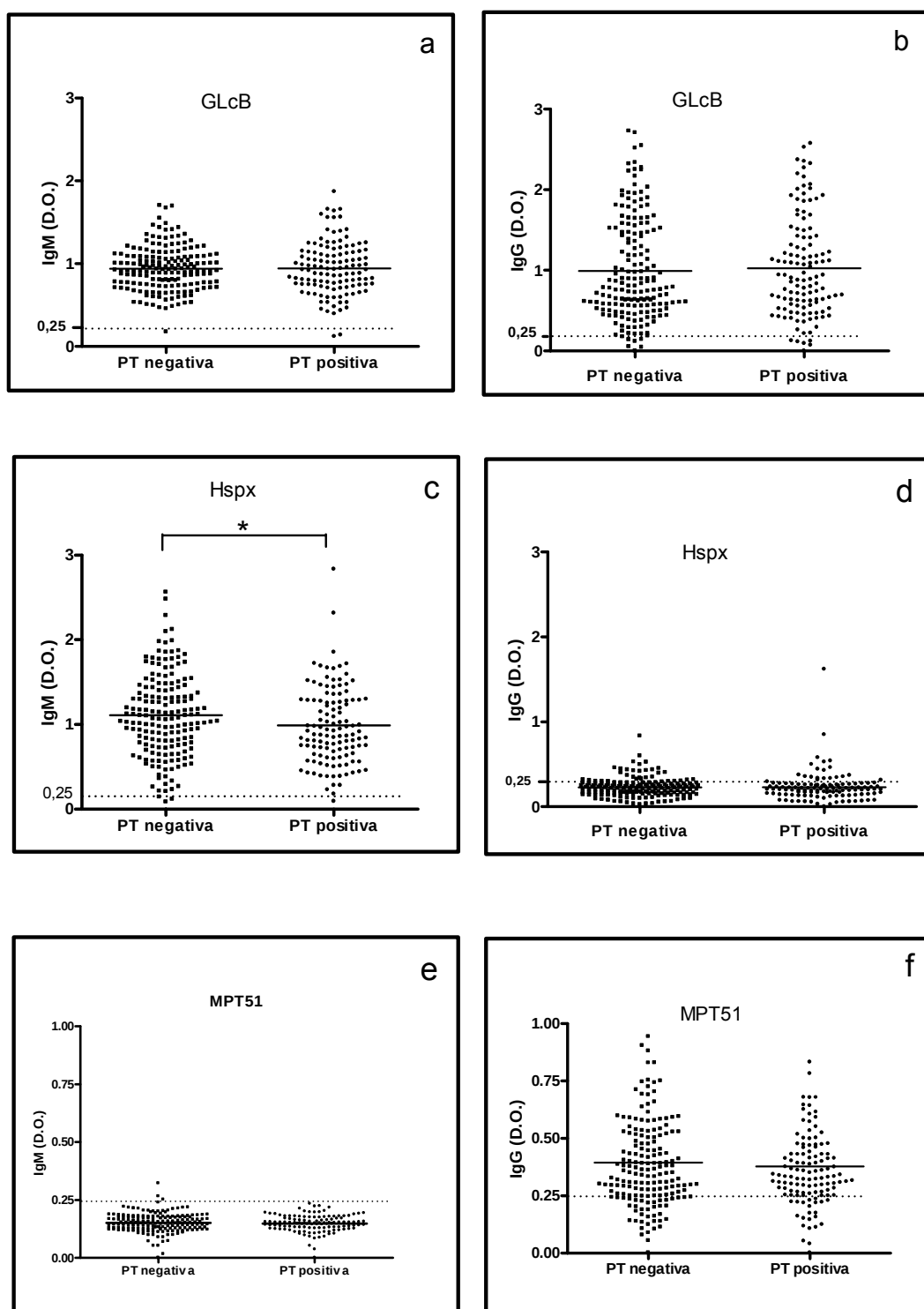


Figura 2. Dosagens de anticorpos (IgM e IgG) contra antígenos recombinantes do *M.tuberculosis* (GLcB, Hspx e MPT51) dos 299 trabalhadores da área da saúde do Hospital HDTAA em Goiânia. Os trabalhadores da área da saúde foram agrupados de acordo com o resultado da prova tuberculínica (positiva ou negativa). As linhas horizontais contínuas representam a média das densidades óticas. A linha pontilhada indica o limiar de reatividade (cut off=0.250).

5.2. Influência da vacinação com BCG e do Ambiente de trabalho na Resposta Humoral dos trabalhadores da área da saúde

Aproximadamente, sessenta e sete por cento dos TAS (199/299) foram vacinados com o BCG. O status vacinal foi informado pelo próprio indivíduo. Para avaliar a influência desta vacina na produção de anticorpos, comparamos os níveis encontrados nos indivíduos vacinados com os encontrados nos não-vacinados, dentre aqueles que apresentaram anticorpos contra os antígenos recombinantes. Os níveis de anticorpos foram semelhantes entre os dois grupos, independentemente da classe da imunoglobulina ou do antígeno testados. A figura 3 mostra os níveis de anticorpos (densidades óticas) dos TAS, vacinados ou não com o BCG, frente aos antígenos recombinantes GLcB, Hspx e MPT51 do *M. tuberculosis*.

Avaliamos também se o ambiente de trabalho a que foram expostos os trabalhadores das diferentes categorias tiveram algum efeito sob a produção de anticorpos. Os níveis de anticorpos encontrados também se mostraram similares entre médicos, enfermeiros, técnicos em enfermagem, nutricionistas, cozinheiras, faxineiras, funcionários da administração, laboratoristas e farmacêuticos (dados não mostrados).

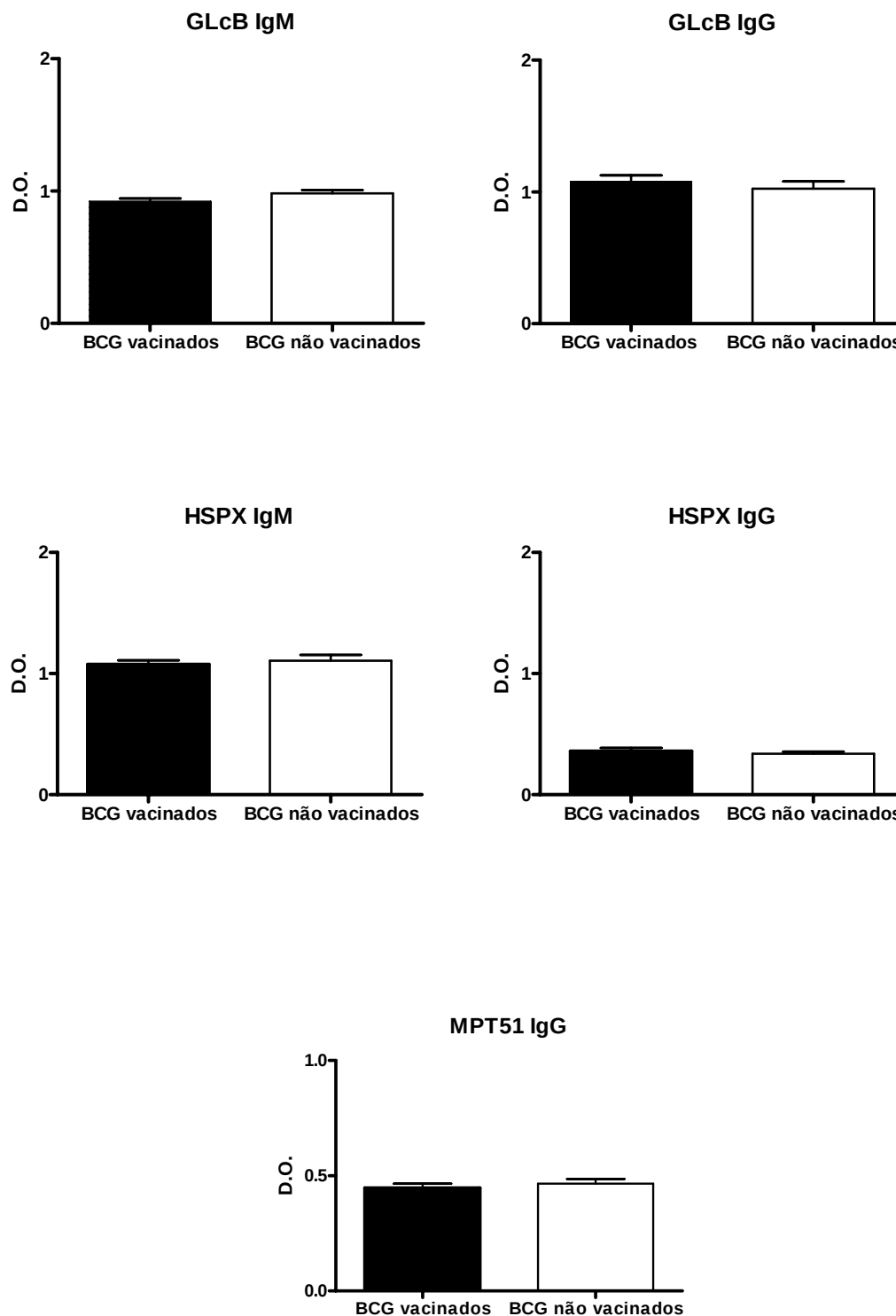


Figura 3. Comparação dos níveis de anticorpos (IgM e IgG) contra os antígenos recombinantes do *M.tuberculosis* de TAS BCG vacinados e de TAS BCG não-vacinados. A comparação foi feita apenas entre indivíduos que apresentaram anticorpos contra os antígenos recombinantes (cut off=0.250). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nas dosagens de IgM ou IgG contra os antígenos recombinantes. Na dosagem de IgM: contra o GLcB, 178 indivíduos eram BCG vacinados e 118 BCG não vacinados; contra o Hspx, 174 indivíduos eram BCG vacinados e 116 BCG não vacinados. Na dosagem de IgG: contra o GLcB, 170 indivíduos eram BCG vacinados e 107 BCG não

vacinados; contra o Hspx, 57 indivíduos eram BCG vacinados e 46 BCG não vacinados; e contra o MPT51, 144 indivíduos eram BCG vacinados e 85 BCG não vacinados.

5.3. Relação entre Resposta Imune Humoral e a Celular

Dentre os TAS que apresentaram anticorpos, comparamos os resultados da prova tuberculínica com os níveis de anticorpos contra os antígenos recombinantes (figura 4) com o intuito de avaliar se haveria algum tipo de correlação, positiva ou negativa, entre as respostas imunes celular e humoral, respectivamente. Os níveis de anticorpos se mostraram bastante heterogêneos tanto para TAS PT positiva quanto para TAS PT negativa. Indivíduos destes dois grupos apresentaram tanto leituras correspondentes a baixos níveis ($0,250 < b.n. < 0,750$) quanto leituras correspondentes a altos níveis de anticorpos ($\geq 0,750$). Estes resultados sugerem que nenhuma correlação, nem positiva nem negativa, existia entre o resultado da PT e a dosagem de anticorpos contra os antígenos recombinantes do *M. tuberculosis* dos trabalhadores da saúde.

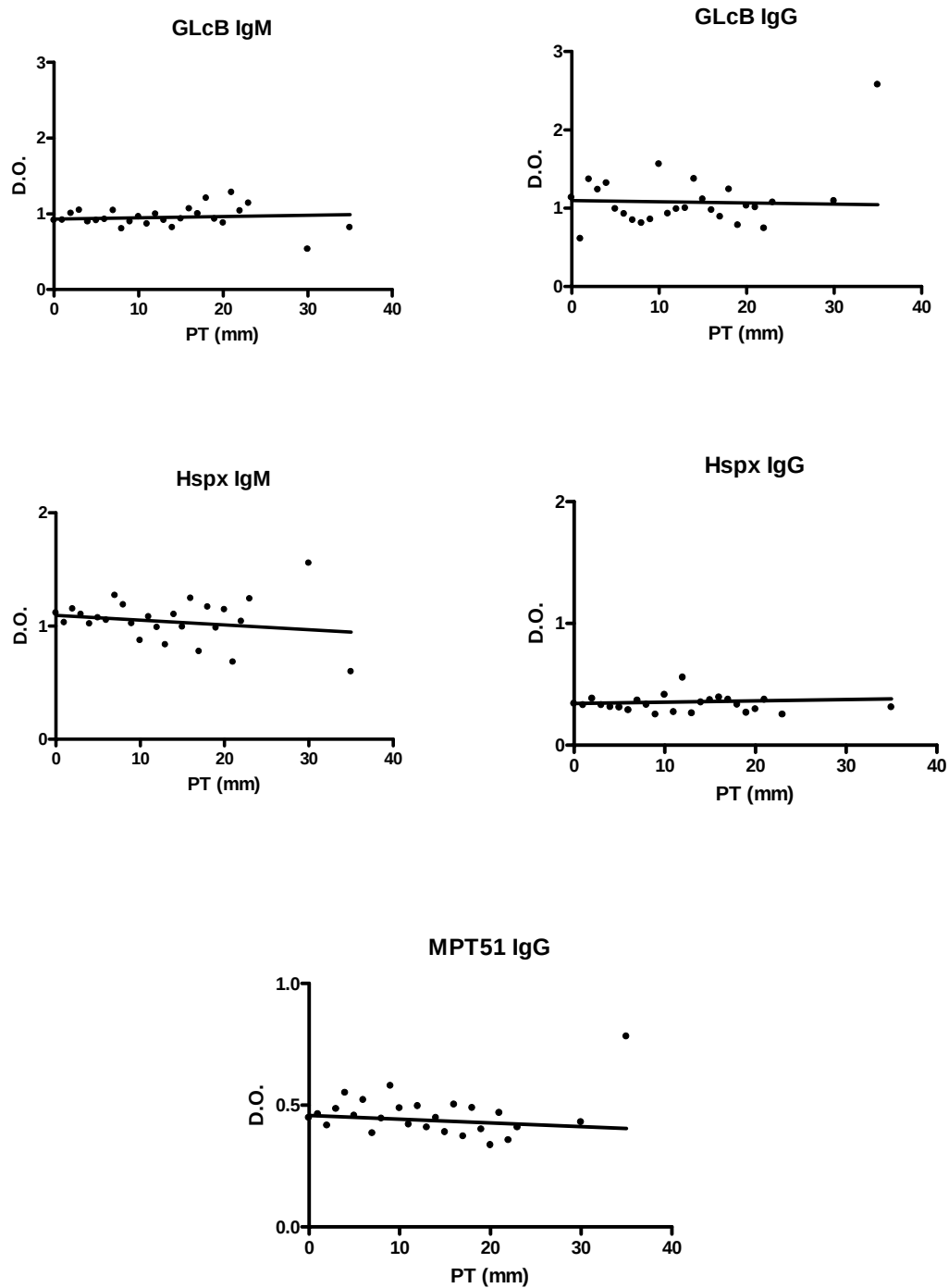


Figura 4. Comparação entre o nível de anticorpo (D.O.) e o resultado da prova tuberculínica (em mm) dos TAS que apresentaram anticorpos aos antígenos protéicos recombinantes do *M. tuberculosis*. Não houve nenhum tipo de relação entre os parâmetros comparados. Cada ponto no gráfico representa a média das densidades óticas referentes a um resultado da PT, por exemplo, todos os indivíduos cujo diâmetro obtido na PT foi igual a zero tem a média das densidades óticas representada por apenas um ponto. Para a IgM/GLcB 296 indivíduos apresentaram anticorpos; para IgG/GLcB 277 indivíduos apresentaram anticorpos; para IgM/Hspx 290 indivíduos apresentaram anticorpos; para IgG/Hspx 103 indivíduos apresentaram anticorpos e para IgG/MPT51 229 indivíduos apresentaram anticorpos.

6. DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhadores da área da saúde apresentou anticorpos frente aos antígenos recombinantes GLcB, Hspx e MPT51 do *M. tuberculosis*. Os TAS PT negativa constituíram maioria entre os indivíduos que apresentaram anticorpos contra os antígenos recombinantes. Os níveis de anticorpos encontrados foram bastante similares entre trabalhadores PT negativa e PT positiva nas dosagens de IgM e IgG contra o GLcB. Nas dosagens de IgG contra o Hspx e o MPT51, os trabalhadores PT negativa e PT positiva também apresentaram níveis de anticorpos similares entre si. Na dosagem de IgM frente ao Hspx, os TAS PT negativa apresentaram níveis de anticorpos superiores aos dos TAS PT positiva. Apenas 3 indivíduos PT negativa apresentaram IgM contra o MPT51. Os níveis de anticorpos foram semelhantes entre TAS BCG vacinados e TAS BCG não-vacinados. Os níveis de anticorpos (IgM/IgG) contra os antígenos recombinantes encontrados nos trabalhadores pertencentes à diferentes categorias profissionais também se mostraram semelhantes entre si.

A presença de anticorpos contra antígenos (recombinantes) do *M. tuberculosis* em indivíduos saudáveis pode ser reflexo: da área em que habitam, região endêmica da tuberculose (WHO, 1993), do contato com micobactérias ambientais que podem expressar antígenos homólogos aos do *M. tuberculosis* (Vaerewijck et al. 2005) influenciando o repertório imunológico destes indivíduos, mas principalmente, da repetida exposição ao agente causador da doença, representado pelo tipo do ambiente de trabalho – hospital de referência no tratamento da tuberculose.

A maioria dos indivíduos que apresentaram anticorpos contra os antígenos recombinantes eram PT negativa, isso pode ter acontecido em decorrência da pouca sensibilidade/especificidade do PPD, que se constitui num pool de proteínas das bactérias do complexo *M. tuberculosis* e de algumas bactérias não-tuberculosas (Pai et al. 2004) ou ainda devido ao fato de alguns indivíduos não reagirem a este purificado (Fietta et al. 2003).

A comparação entre os trabalhadores BCG vacinados e BCG não-vacinados revelou que estes dois grupos apresentaram níveis semelhantes

de anticorpos sugerindo que esta vacina não teve nenhuma influência sobre estes níveis. Estes resultados corroboram com estudos que sugerem que o BCG protege mais eficazmente crianças contra as manifestações primárias da tuberculose (Sterne et al. 1998) e que em adultos a abrangência de sua proteção varia de 0 a 80% (Fine 1995).

O Hsp_x é uma chaperonina envolvida no mecanismo de manutenção da parede celular do bacilo e é uma das primeiras proteínas a serem produzidas pelo bacilo (Hu et al. 2006). O GLcB é uma enzima utilizada na assimilação do carbono na via dos ácidos tricarboxílicos (Smith et al. 2002), via alternativa requisitada quando o bacilo se encontra em condições adversas. O MPT51 é uma proteína envolvida no mecanismo de adesão do bacilo às células do hospedeiro, através da ligação com a fibronectina (Wilson et al. 2004). O bacilo que alcança os alvéolos pulmonares necessita de uma fonte de energia que o mantenha intacto para infectar os macrófagos alveolares, há então a produção de proteínas (GLcB, Hsp_x e MPT51) que exerçam estas funções.

A escolha destes antígenos baseou-se principalmente no fato de suas funções serem diferentes e eles estarem presentes na etapa imediatamente posterior à entrada do bacilo no organismo hospedeiro. A presença da Hsp_x e de anticorpos contra ela vêm sendo associadas à fase de infecção latente (Hu & Coates 1999, Demissie et al. 2006). Já a presença de anticorpos contra o GLcB e o MPT51 vêm sendo associada tanto à tuberculose ativa em indivíduos HIV negativos (Achkar et al. 2006), quanto à tuberculose subclínica em indivíduos HIV positivos co-infectados com tuberculose (Singh et al. 2005).

A dosagem dos anticorpos foi feita pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Existem técnicas mais avançadas, com maior especificidade e sensibilidade, como o QuantiFERON-TB, no entanto, o seu custo é muito alto e o seu desempenho em área endêmicas da tuberculose se equipara à prova tuberculínica (Pai et al. 2004). Técnicas de baixo custo, fácil execução e com boa especificidade e sensibilidade como o ELISA se enquadram melhor ao perfil dos países em desenvolvimento como o Brasil.

A IgM contra o GLcB e o Hsp_x encontrada nos trabalhadores pode refletir a presença destas proteínas nestes indivíduos, sugerindo também

que eles foram infectados pelo *M. tuberculosis*. A ausência de IgM contra o MPT51 pode sugerir que esta proteína tenha sido produzida muito precocemente e imunoglobulinas IgM produzidas já tenham sido consumidas, restando apenas as imunoglobulinas geradas pelas células de memória (IgG). O fato de considerarmos os indivíduos portadores de infecção latente baseando-nos nas dosagens de IgM contra os antígenos recombinantes do *M. tuberculosis* e não na PT se deve à pouca especificidade conferida a este teste em função do purificado protéico utilizado ser constituído por um pool de proteínas que muitas vezes não conseguem estimular a resposta imune do indivíduo testado.

Além de detectar a presença das proteínas antigênicas, a IgM pode ter contribuído para a eliminação do bacilo através dos mecanismos de opsonização, ativação do complemento e citotoxicidade mediada por anticorpo (Janeway et al. 2001). A IgM pode ainda ter desempenhado um papel pró-inflamatório, aumentando a resposta imune inata e celular, ajudando no processo de eliminação do patógeno (Casadevall & Pirofski 2003). David e colaboradores sugerem que em humanos a resposta humoral na tuberculose subclínica inicialmente é feita por imunoglobulinas específicas da classe IgM (David et al. 1992).

A presença de IgG contra os antígenos recombinantes nos trabalhadores pode ter ocorrido em consequência da repetida exposição ao contato com o bacilo da tuberculose. As células dendríticas destes trabalhadores podem ter sido capazes de estimular diretamente a produção de IgG pelas células B através da ligação CD40 e CD40 ligante (Pinchuk et al. 1996). A produção IgG também pode ter decorrido do estímulo de citocinas, como a IL-2, a IL-4, a IL-6 e o IFN- γ , secretadas pelas células T CD4⁺ dos trabalhadores (Dembech et al. 1992). Acredita-se que a manutenção de altos níveis de IgG muito após a infecção pode proteger o indivíduo de infecções subseqüentes através da neutralização dos novos inóculos, podendo funcionar também como um agente anti-inflamatório, reduzindo o dano tecidual causado pelo estímulo contínuo da célula previamente ativada (Casadevall & Pirofski 2003). Além disso, componentes da resposta inata, como células NK e células T $\gamma\delta$ podem ter sido ativadas e

estimuladas a produzir IFN- γ (Haregewoin et al. 1989), contribuindo tanto para a indução da produção de IgG (Dembech et al. 1992) quanto para a potencialização da ação microbicida dos macrófagos alveolares e a eliminação do bacilo (Kaufmann 2002).

Apesar da resposta Th1 não estimular a produção de anticorpos, alguma das citocinas supressoras desta resposta, como a IL-4, podem em pequenas proporções estimular a produção deles (King & Nutman 1993). Em um contexto onde a resposta Th1 é eficiente, baixos níveis de anticorpos seriam suficientes para garantir a proteção. Em murinos a mudança da classe IgM para os outros subtipos é dependente de diferentes citocinas, por exemplo, o IFN- γ produzido pelas células Th1 induz a produção de IgG2a e IgG3 (Finkelman et al. 1988). Em humanos a regulação da mudança de classe com base na ação da citocinas ainda precisa ser esclarecida. No entanto, existem estudos mostrando que apesar de não haver correlação entre citocina e isotipo de imunoglobulina, clones de células T CD4⁺ são capazes de induzir a produção de subclasses de IgG através da secreção de citocinas (Dembech et al. 1992).

Apesar de desempenhar papéis relacionados à proteção os anticorpos também podem contribuir para a patogênese. O *M. tuberculosis* se aproveita da ativação do complemento mediada pela IgM e usa este mecanismo para penetrar nos macrófagos pulmonares (Hirsh et al. 1994, Hetland et al. 1998). O contínuo estímulo pró-inflamatório exercido pela IgM pode aumentar o dano tecidual gerado pela inflamação (Casadevall & Pirofski 2003). A IgG também tem a capacidade de promover a captura do antígeno através dos receptores para Fc, caminho que pode ser usado pelo bacilo para entrar nos macrófagos (Heller et al. 1999). Além disso, anticorpos opsonizantes (IgG1) têm sido relacionados à regulação positiva de citocinas próinflamatórias (TNF- α e IL-6) que induzem à caquexia em indivíduos com tuberculose avançada (Hussain et al. 2001).

A resposta imune constitui-se de mecanismos muito complexos e abrangentes, e apesar da subdivisão (didática) dos seus mecanismos em celular e humoral sabe-se que ambas podem coexistir num mesmo contexto. Consideramos a PT representativa da resposta imune celular pelo

fato dela basear-se na medição da resposta imune mediada por células (células T de memória) na forma de hipersensibilidade tardia ao purificado protéico (Pai et al. 2004). Com isto em mente, questionamos se as respostas imunes celular e humoral dos TAS poderiam se correlacionar de alguma maneira. A comparação entre o resultado da PT e os níveis de anticorpos dos TAS mostraram uma grande heterogeneidade, revelando que nenhum tipo de correlação existia entre estes dois parâmetros. Talvez isso se deva ao fato de que os antígenos utilizados para estímulo de cada resposta foram diferentes, o PPD usado na resposta imune celular, e os antígenos proteicos recombinantes GLcB, Hspx e MPT51 na resposta imune humoral.

Um estudo feito em 2006, sobre a tuberculose em trabalhadores da saúde de países com recursos financeiros limitados, mostrou a associação entre o local de trabalho, a categoria ocupacional e o risco de infecção da tuberculose (Joshi et al. 2006). Os trabalhadores que mantiveram contato com o paciente estavam sujeitos a um maior risco de infecção do que os trabalhadores da área administrativa, apesar da heterogeneidade do risco entre as categorias. O nosso estudo não avaliou o risco de infecção entre as categorias, mas acreditamos que ele acompanhe a tendência deste estudo, ou seja, quanto mais tempo em contato com o paciente maior o risco de infecção sofrido pelo trabalhador. Entretanto, em nosso estudo isto não teve reflexo na produção de anticorpos dos trabalhadores, já que os níveis de imunoglobulinas encontrados foram semelhantes entre administradores, enfermeiros, médicos, técnicos e auxiliares de enfermagem, cozinheiras, faxineiras, etc (dados não mostrados).

Dentre os funcionários do Hospital Anuar Auad (HDTAA) participantes deste estudo, 40.8% foram considerados PT positiva (induração ≥ 10 mm) e 59.2% considerados indivíduos PT negativa (induração < 10 mm). A maioria dos indivíduos, independente do status da prova tuberculínica, apresentou anticorpos contra os antígenos proteicos recombinantes do *M. tuberculosis* e, tendo isso em vista, pode-se sugerir que estes trabalhadores sejam 'portadores de infecção latente' do bacilo.

Alguns pesquisadores acreditam que o termo latente não é o mais apropriado, pois muito da fisiologia do bacilo, e do que realmente ocorre in vivo, é desconhecido. Conceitualmente, 'estado de persistência sem replicação' se aproximaria mais do que acredita-se acontecer in vivo (Orme 2001). Vários estudos tentam reproduzir in vitro as condições de estresse (hipóxia, baixo pH, alta concentração de reativos do nitrogênio, etc) que permitam elucidar se o *M. tuberculosis* entra em 'latência' nestas condições ou se ele consegue diminuir o seu metabolismo de uma maneira que oculte a sua presença (Wayne 1976), (Wayne & Lin 1982).

Este estudo apresentou algumas limitações. Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados retrospectivamente usando soros congelados. Sabe-se que o descongelar de amostras sorológicas pode gerar alguma desnaturação dos anticorpos presentes, no entanto as amostras dos TAS foram descongeladas apenas no momento da realização dos ensaios para minimizar os danos que por ventura houvessem.

Apesar de todo o conhecimento em imunologia, ainda permanece intrigante o fato de a maioria dos indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* não adoecerem. Racionaliza-se que isto aconteça em função das diferenças interindividuais, da genética do bacilo e das interações entre hospedeiro e bacilo. Neste estudo, apesar das diferenças interindividuais, mais de sessenta por cento dos participantes apresentou anticorpos (IgM ou IgG) contra os antígenos recombinantes do *M. tuberculosis*, entretanto os mecanismos pelos quais estes anticorpos contribuíram (ou não) para a manutenção da homeostasia nestes trabalhadores não foram ainda confirmados.

Considerando que: a) indivíduos saudáveis infectados (portadores latentes) apresentam anticorpos nesta fase inicial, b) que o *M. tuberculosis* adquiriu a habilidade de persistir no hospedeiro, induzindo uma resposta Th1 suficiente para controlar a sua replicação sem resultar na sua completa eliminação, e c) que pacientes com tuberculose pulmonar apresentaram níveis de anticorpos inferiores (dados não mostrados) aos dos indivíduos latentes, talvez o acompanhamento sorológico de tais indivíduos revele uma progressiva diminuição na produção dos anticorpos. A sorologia associada

às outras ferramentas (Raios-X e baciloscopia) permitiria o diagnóstico e tratamento precoce destes indivíduos, interrompendo o ciclo de transmissão/disseminação da doença.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- os trabalhadores da área da saúde apresentam anticorpos contra os antígenos GLcB, Hsp₆₀ e MPT51 do *M. tuberculosis*, demonstrando uma grande heterogeneidade entre os indivíduos, independentemente do status da prova tuberculínica de cada um;
- A produção de anticorpos dos trabalhadores não sofreu influência nem da vacinação com BCG, nem do ambiente de trabalho ao qual cada categoria foi exposta;
- Não houve nenhum tipo de correlação entre o resultado da prova tuberculínica (resposta imune celular) e os níveis de anticorpos contra os antígenos recombinantes (resposta imune humoral) dos trabalhadores da saúde.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abebe F, Holm-Hansen C, Wilker HG, and Bjune G 2007. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol* Vols. 66:176-191.

Achkar JM, Dong Y, Holzman RS, Belisle J, Kourbeti IS, Sherpa T, Condos R, Rom WN and Laal S 2006. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase- and MPT51-based serodiagnostic assay as an adjunct to rapid identification of pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* Vols. 13(1): 1291-93.

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

Algood HMS, Lin PL and Flynn JL 2005. Tumor Necrosis Factor and Chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infec Dis* Vols. 41: S189-93.

Alonso-Echanove J, Granich RM, Laszlo A, Chu G, Borja N, Blas R, Olortegi A, Binkin NJ, Jarvis WR 2001. Occupational transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to health care workers in a university hospital in Lima, Peru. *Clin Infec Dis* Vols. 33 (5): 589-96.

Andersen P & Doherty TM 2005. The success and failure of BCG: implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature* Vols. 3: 656-62.

Andersen P 1997. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* Vols. 45: 115-131.

Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, 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 Bacterio.* Vols. 49 Pt 3:1263-73.

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* Vols. 142: 1-16.

Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook, GAW, Hernandez-Pando R 2002. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculosis infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* Vols. 128: 229-37.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA 2001. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* Vols. 167:1245-53.

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* Vols. 4 (587-96).

Benedek TG 2004. The history of gold therapy for tuberculosis. *JHMAS* Vols. 50; 1:50-89.

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* Vols. 70: 140-46.

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

Borgdorff MV, Nagelkerke NJ, Dye C, Nunn P 2000. Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore sex differences in case detection. *Int J Tuberc Lung Dis* Vols. 4: 123-32.

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

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* Vols. 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* Vol. 174: 4203.

Casadevall A & Pirofski LA 2003. Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends Immunol* Vols. 24: 474-78.

Cave, AJE 1939. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt. *Br J Tuberc* Vols. 33: 142-52.

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

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

Corbbet EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* Vols. 163 (9): 1009-21.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Chucher C, Haris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* Vols. 393: 537-44.

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

Costa DC 1988. Comentários sobre a tendência secular da tuberculose. *Caderno de Saúde Pública, RJ, FIOCRUZ.* Vols. 4(4): 398-406.

Crump JA, Tanner DC, Mirrett S, McKnight CM, Reller LB 2003. Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB and ISOLATOR 10 Systems for detection of mycobacteremia. *J Clin Microbiol* Vols. 41: 1987-90.

Daniel TM 1996. Immunodiagnosis of tuberculosis. *W.N.Rom and S.M. Garay (ed), Tuberculosis. Little, Brown & Co., Boston, Mass.* Vols. p. 223-231.

Daniel TM 2006. The history of tuberculosis. *Respir Med.* Vols. 100: 1862-70.

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

Dannenberg AM 1994. Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiology.* Vols. 191(4-5): 461-73.

David HL, Papa F, Cruaud P, Berlie HC, Maroja MF, Salem JI, Costa MF 1992. Relationships between titers of Abs immunoreacting against glycolipids antigens from *M. leprae* and *M. tuberculosis*, the Mitsuda and Mantoux reactions, and bacterial loads: implications in the pathogenesis, epidemiology and serodiagnosis of leprosy and tuberculosis. *Int Lepr Other Mycobact Dis.* Vols. 60(2): 208-24.

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.* Vols. 73(10): 6846-51.

Del Portillo P, Reyes A, Salazar L, Menéndez MDC, Garcia MJ 2007. Genomics and proteomics. (www.tuberculosis textbook.com) Cap. 4 pg.113-156.

Dembech C, Quinti I, Cimignoli E, Albi N, Terezini A, Gerli R, Galandrini R, Grignani F, Velardi A 1992. Human T helper clones induce IgG production in a subclass-specific fashion. *Cell Immunol.* Vols. 139: 306-17.

Demissie A, Leyten EM, Abebe M, Wassie L, Aseffa A, Abate G, Fletcher H, Owiafe P, Hill PC, Brookes R, Rook G, Zumba A, Arend SM, Klein M, Ottenhoff TH, Andersen P, Doherty TM, the VACSEL Study Group 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol.* Vols. 13(2): 170-186.

Ding AH, Nathan C, Stuehr D 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol.* Vols. 141: 2407-12.

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

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

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

Ernst JD, Trevejo-Nuñez G, Banaiee N 2007. Genomics and the evolution, pathogenesis and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest*. Vols. 117: 1738-45.

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

Fietta A, Meloni F, Cascina A, Morosini M, Marena C, Troupioti P, Mangiarotti P, Casali L 2003. Comparison of a whole-blood interferon-gamma assay and tuberculin skin testing in patients with active tuberculosis and individuals at high or low risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Infect Control*. Vols. 31: 347-53.

Fine PE 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*. Vols. 346: 1339-45.

Finkelmann FD, Katona LM, Mosmann TR, Coffman RL 1988. INF-gamma regulates the isotypes of Ig secreted in vivo humoral immune responses. *J Immunol*. Vols. 140: 1022-27.

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

Flynn JL & Chan J 2001. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and Immunity*. Vols. 69(7): 4195-4201.

Flynn JL & Chan J 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol*. Vols. 19: 93-129.

Flynn JL & Chan J 2005. What's good for the host is good for the bug. *TRENDS Microbiol*. Vols. 13(3): 98-102.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. Vols. 22: 329-41.

Gibbons A 2001. Modern men trace ancestry to African migrants. *Science*. Vols. 292: 1051-2.

Goletti D, Carrara S, Vincenti D, Saltini C, Rizzi EB, Schininà V, Ippolito G, Amicosante M, Girardi E 2006. Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study. *Clin Microbiol Infect*. Vols. 12: 544-50.

Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marieta P, Brooks JV, Orme IM 2001. Temporal and spacial arrangement of lymphocytes within lung

granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. Vols. 69: 1722-28.

Gounder C, De Queiroz Mello FC, Conde MB, Bishai WR, Kritski AL, Chaisson RE, Dorman SE 2002. Field evaluation of a rapid immunochromatographic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol*. Vols. 40: 1989-93.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vicent V 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. Vol. 1: e5.

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*. Vols. 173: 803-10.

Haregewoin A, Soman G, HomRC, Finberg RW 1989. Human gamma-delta T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature (London)*. Vols. 340: 309-12.

Heller T, Gessner JE, Schmidt RE, Klos A, Bautsch W, Köhl J 1999. Cutting Edge: Fc receptor type I for IgG on macrophages and complement mediate the inflammatory response in immune complex peritonitis. *J Immunol*. Vols. 162: 5657-61.

Hetland G, Wiker HG, Hogasen K, Hamasur B, Svenson SB, Harboe M 1998. Involvement of anti-lipoarabinomannan antibodies in classical complement activation in tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. Vols. 5(2): 211-18.

Hijjar MA 2005. Tuberculosis: an ongoing challenge. *Cad Saude Publica*. Vol. 21:349;348.

Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z 1994a. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta1. *J. Infect. Dis*. Vols. 170: 1229-37.

Hobday RA 1997. Sunlight therapy and solar architecture. *Med Hist*. Vols. 41: 455-72.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM 1993. Development of Th1 CD4+ cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. Vols. 260: 547-49.

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*. 1999, Vols. 181: 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*. Vols. 74: 861-8.

Hussain R, Shiratsuchi H, Phillips M, Ellner J, Wallis RS 2001. Opsonizing antibodies (IgG1) up-regulate monocyte proinflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNF-a) and IL-6 but not anti-inflammatory cytokine IL-10 in

mycobacterial antigen-stimulated monocytes: implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol*. Vols. 123: 210-18.

Iseman MD 2002. Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur Respir J*. Vols. 20; Suppl.36: 87-92.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Sholmchik MJ 2001. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease . *Garland Publishing, New York*. 2001.

Janis EM, Kaufmann SHE, Schwartz RH, Pardoll DM 1989. Activation of gamma-delta T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. Vols. 244: 713-6.

Joshi R, Reingold AL, Menzies D, Pai M 2006. Tuberculosis among health-care workers in low- and middle-income countries: a systematic review. *PloS Medicine*. Vols. 3(12): 2376-91.

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

Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, Hadala P, Lamer S, Hagens K, Kaufmann SH 1999. Comparative proteome analysis from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Molecular Microbiology*. Vols. 33(6): 1103-1117.

Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Deifenbach A, Raulet DH, Turner J, Orme IM 2003. NK cells respond to pulmonary infection to *Mycobacterium tuberculosis* , but play a minimal role in protection. *J Immunol*. Vols. 171: 6039-45.

Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, Mathema B, Ramaswamy SV, Walther G, Steyn LM, Barry CE 3rd, Bekker LG 2003. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun*. Vols. 71: 7099-7108.

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

Kaufmann SH & Schaible UE 2005. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol*. Vols. 13: 469-75.

Kim TH 1979. Preservation of mycobacteria at -70 degree °C: survival of unfrozen suspensions in transit . *Tubercle*. Vols. 60: 37-43.

King CL & Nutman TB 1993. IgE and IgG subclass regulation by IL-4 and INF-gamma in human helminth infections. *J Immunol*. Vols. 151: 458-65.

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*. Vols. 60: 999-1013.

Koul A, Herget T, Kleb B, Ulrich A 2004. Interplay between Mycobacteria and host signalling pathways. *Nature*. Vols. 2: 189-202.

Kritski A & Fiuza de Melo FA 2007. Tuberculosis in adults. (www.tuberculosisistextbook.com) Cap.15 pg. 487-523.

Laal S, Samanich KM, Sonnenberg MG, Belisle JT, O'Leary J, Simberkoff MS, Zolla-Pazner S 1997. Surrogate marker of preclinical tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: antibodies to an 88-kDa secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. Vols. 176: 133-43.

Lalvani A, Brookes R, Wilkinson R, Malin , Pathan A, Andersen P, Dockrell H, Pasvol G, Hill A 1998. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*. Vols. 95: 270-5.

Leão SC & Portaels F 2007. History. (www.tuberculosisistextbook.com) Cap.1, pg.25-51.

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*. Vols. 68: 4736-45.

Lopes LKO, Teles SA, Souza ACS, Rabahi MF, Tipple AF 2007. Tuberculosis risk among nursing professionals from central Brazil. (*in process*) *American Journal of Infect Control*. 2007.

Maglione PJ, Xu J, Chan J 2007. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2007.

Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, Belisle JT, Chen J, Bradbury EM, Bradbury AR, Chen X 2005. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profile. *Mol Biol Cell*. Vols. 16: 396-404.

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

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Kaplan G 1993. Thalidomide exerts its inhibitory effect on tumor necrosis factor by enhancing mRNA degradation. *Exp Med*. Vols. 177: 1675-80.

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*. Vols. 170: 59-64.

MS/SVS 2005. Ministério da Saúde. Datasus:Informações em saúde; acesso em julho de 2007. <http://tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm>. 2005.

Muller I, Cobbod S, Waldmann II, Kaufmann SHE 1987. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective *in vivo* depletion of L3T4+ and Lyl2+ T cells. *Infect Immunol.*, Vols. 55: 2037-41.

Nelson SM, Deike MA, Carwright CP 1998. Value of examining multiple sputum specimes in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* Vols. 36: 467-69.

Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A 1992. CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation . *Immunol. Today.* Vols. 13: 431-36.

Noss EH, CV Harding, Boom WH 2000. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages. *Cell Immunol.* 2000, Vols. 201: 63-74.

Orme, IM 2001. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). *Int J Tuberc Lung Dis.* Vols. 7: 589-93.

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

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

Pease AS 1940. Some remarks on the diagnosis and treatment of tuberculosis in antiquity. *Isis.* Vols. 31: 380-93.

Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, Pinchuk GV, Norsen JP, Clark EA 1996. Functional CD40 ligand (CD40L) expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J Immunol.* 1996, Vols. 158:120-26.

Qamra R, Mande SC, Coates AR, Henderson B 2005. The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Elsevier.* Vols. 85: 385-394.

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

Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, Kok-Jensen A, Andersen P, Weldingh K 2005. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* Vols. 12: 491-96.

Riley LW 2006. Of mice, man and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Invest.* Vols. 116: 1475-78.

Robbins SL, Angell M, Kumar V 1984. Basic Pathology. *W.B. Saunders Company.* Third edition, Vols. 1 (13): 458-65.

Rojas M, Olivier M, Gross P, Barrera LF, Garcia LF 1999. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J. Immunol.* Vols. 162: 6122-31.

Rastogi N & Sola C 2007. Molecular evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. (www.tuberculosis textbook.com) Cap.2 pg. 53-91

Roth VR, Garret DO, Laserson KF, Starling CE, Kristski AL, Medeiros EA, Binkin N, Jarvis WR 2005. A multicenter evaluation of tuberculosis skin test positivity and conversion among health care workers in Brazilian hospitals. *Int J Tuberc Lung Dis.* Vols. 12 :1335-42.

Ruffino-Neto A 2002. Tuberculosis: the neglected calamity. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* Vols. 35(1): 51-58.

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.*, Vols. 178: 1534-8.

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

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

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.* Vols. 320: 545-50.

Senol G, Erer OF, Yalcin YA, Coskun M, Gunduz AT, Bicmen C, Ertas M, Ozkan SA 2007. Humoral immune response against 38-kDa and 16 kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. *Eur Respir J.* Vols. 1 (143-8).

Sharma S & Bose M 2001. Role of cytokines in immune response to pulmonary tuberculosis. *Asian Pac J Allergy Immunol.* Vols. 19(3): 213-19.

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.* Vols. 2 (354-8).

Smith CV, Huang CC, Miczak A, Russel DG, Sacchettini JC, Honer zu Bentrup K 2002. Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* Vols. 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.* Vols. 65: 4515-24.

Sousa AO, Wagnier A, Poinsignon Y, Simmone N, Gerber F, Laverne F, Herrmann JL, Lagrange PH 2000. Kinetics of circulating antibodies immune complexes and specific antibody-secreting cells in tuberculosis patients during 6 months of antimicrobial therapy. *Tuber Lung Dis.* Vols. 80: 27-33.

Spencer H 1985. Pathology of the lung. *Pergamon Press.* Vol. 1.

Sterne JA, Rodrigues LC, Guedes IN 1998. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int J Tuberc Lung Dis.* Vols. 2: 200-207.

Stewart GR, Patel J, Robertson BD, Rae A, Young BD 2005. Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathogens.* Vols. 1(3):269-77.

Sturgill-Koszycki S, Schauble UE, Russel DG 1996. Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J.* Vols. 15: 6960-8.

Sudre P, ten Dam G, Kochi A 1992. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull WHO.* Vols. 70: 149-59 .

Tam CM & Leung CC 2006. Occupational tuberculosis: a review of the literature and the local situation. *Hong Kong Med J.* Vols. 12(6): 448-55.

Tan JS, Canaday DH, Boom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rich EA 2000. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of macrophages to lysis. *J Immunol.* Vols. 159: 290-7.

Tiwari RP, Tiwari D, Sanjay KG, Chandra R and Prakash SB 2004. Glycolipids of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv are potential serological markers for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* Vols. 12: 465-73.

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.* , Vols. 8(2): 218-232.

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

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.* Vols. 204: 217-228.

Vaerewijck MJM, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F 2005. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews.* Vols. 29: 911-34.

Waard JH & Robledo J 2007. Conventional Diagnosis Methods. (www.tuberculosis-textbook.com) Cap. 12 pg. 401-424.

Wayne LG 1976. Dynamics of submerged growth of *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and microaerophilic conditions. *Am Rev Respir Dis*. Vols. 4: 807-11.

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

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

WHO World Health Organization 1993. Resolution WHA44.8: Tuberculosis control programme. *WHO*. 3rd, 1993, Vol. III.

WHO World Health Organization 2000. World Health Organization. Resolution WHA53.1. Stop Tuberculosis Initiative. In Fifty-third World Health Assembly. *WHO*. 2000, Vols. Annex 1-2.

WHO World Health Organization 2005. www.who.int/tb/countryprofile. acesso em agosto 2006.

WHO World Health Organization 2006. Global tuberculosis control: surveillance, planning and financing. Publication WHO/HTM/TB. *WHO*. 2006, Vol. 362

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*. Vols. 2: 519-30.

Yuan Y, Crane DD, Barry CE 3rd 1996. Stationary phase-associated protein in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the micobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol*. Vols. 178: 4484-92.

9. ANEXOS

9.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A PESQUISA PROPOSTA E SITUAÇÃO-PROBLEMA

O programa de Controle da Tuberculose e a Comissão de Controle e Infecção Hospitalar do HDTAA estão conduzindo uma pesquisa sobre a transmissão de tuberculose intra-hospitalar e a possibilidade de diagnóstico de infecção por tuberculose através de teste sorológico.

A tuberculose é uma infecção pulmonar comum em pessoas que vêm sendo atendidas nesses Hospitais, nos últimos anos. A transmissão da tuberculose pode ser levada nos Hospitais, dependendo do ambiente de trabalho e do tipo de paciente atendido.

Para determinar minha elegibilidade para este estudo devo estar, no momento, atuando como profissional de saúde nos diversos locais pelo menos nos últimos seis meses no HDTAA.

Se eu necessitar de assistência médica, RX do tórax e testes sanguíneos, eles serão os mesmos usados rotineiramente nos pacientes que recebem tratamento para TB nesta instituição.

1. Procedimentos

Se eu concordar em participar deste estudo:

Eu responderei a um formulário padronizado que investigará aspectos inerentes ao meu perfil sócio-econômico, classificará o tipo, grau e tempo de convívio que venho tendo com o paciente, e.g.: silicose, insuficiência renal crônica, gastrectomia. Além disso, ele analisará o consumo de bebidas alcoólicas, uso de drogas e/ou tóxicos, hábitos sexuais, e transfusão sanguínea prévia.

Seu eu quiser, eu poderei fornecer 5 ml de sangue coletado no meu antebraço, na face anterior, com agulha e seringa descartável, antecedido por anti-sepsia local. O sangue será utilizado para avaliar a presença de anticorpos para o vírus da AIDS e também para ser analisado por novos testes diagnósticos para a tuberculose. O resultado do teste anti-HIV me será fornecido 7 a 15 dias após a coleta com orientação apropriada. O resultado do teste para tuberculose no soro, nem meu médico assistente e eu teremos acesso, pois ainda não estão em fase de avaliação e portanto os resultados não podem ser usados na rotina.

2. Tempo

Os procedimentos demorarão no máximo 1 hora.

3. Local do Estudo

Estes procedimentos serão realizados nas dependências do HDTAA.

Riscos/Desconfortos

Algumas das questões que constam do formulário podem ser inapropriadas e produzir sentimentos indesejáveis, mas caso eu ache necessário eu poderei interromper a entrevista a qualquer momento.

Tratamento e compensação por danos.

Se eu tiver algum problema de saúde em decorrência deste estudo, o tratamento e o custo deste tratamento será totalmente coberto pelo hospital no qual iniciei este estudo.

Alternativas

Se eu decidir não participar deste estudo, ou interromper a qualquer momento, o tratamento médico ou atuação de rotina na minha área de trabalho não será prejudicado o HDTAA.

Custos para os entrevistados

Eu não pagarei nenhuma quantia em dinheiro para a participação neste estudo ou para os tratamentos que eu porventura necessite. Os custos de exames laboratoriais, radiológicos, testes de pele e de escarro serão cobertos pelo estudo.

Confidenciabilidade dos dados

A participação em projetos de pesquisa pode resultar em perda de privacidade, entretanto procedimentos serão tomados pelos responsáveis por este estudo, no intuito de proteger a

confidenciabilidade das informações que eu forneça. As informações serão codificadas e mantidas num local reservado o tempo todo. Somente o Dr. Marcelo Fouad Rabahi terá acesso às informações e formulários. Após o término deste estudo as informações serão transcritas dos formulários para arquivos no computador e estes serão destruídos. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida.

CONSENTIMENTO

Se eu solicitar, receberei cópia deste consentimento para mantê-lo comigo.

Eu consinto em que meu endereço e telefone sejam anotados numa folha separada, para facilitar contato comigo quando necessário. Como já foi esclarecido anteriormente, toda informação pessoal será mantida em sigilo.

Nos próximos dias, se tiver qualquer dúvida sobre sua participação neste estudo, favor telefone para 249-3122, Dr. Marcelo Fouad Rabahi.

Assinatura do voluntário

nome completo

Assinatura de entrevistador

nome do entrevistador

Data ____/____/____

9.2. QUESTIONÁRIO PADRONIZADO PARA COLETA DE DADOS DA PESQUISA

Formulário I: Registro

1. Nome: _____

1.1. Endereço: Rua: _____ nº _____

- 1.2. Bairro: _____
- 1.3. Município: _____
2. Data de nascimento _____ (mês) _____ (ano)
3. Data de admissão no hospital _____ (mês) _____ (ano)
4. Efetivo () contrato ()
5. Gênero: Masculino () Feminino ()
6. Grau de escolaridade:
- () 1º grau incompleto () 2º grau incompleto () 3º grau incompleto
- () Pós-graduação () 1º grau completo () 2º grau completo
- () 3º grau completo
7. Há quanto tempo trabalha como profissional da saúde? [] [] [] meses
8. Qual a sua função? _____ Setor? _____
9. Trabalha ou já trabalhou em outra instituição de saúde? Sim () Não ()
- 9.1. Se afirmativo, qual? _____
- 9.2. Trabalhou em outro setor nos últimos 6 meses? _____
- Qual? _____
10. Quantas pessoas, incluindo você, moram na sua casa?
- () 1-3 () 4-6 () mais de 6
11. Em sua casa, há alguém que:
- Está tossindo por mais de 3 semanas? () Sim () Não
- Está tossindo com sangue nas últimas 3 semanas? () Sim () Não
- Tomou medicamento para tuberculose no passado? () Sim () Não
- 11.1. Se afirmativo, há quanto tempo atrás? () < 1 ano () > 1 ano
12. Você já teve contato com alguém com tuberculose no pulmão?
- () Sim () Não
- (Se a resposta para esta pergunta for negativa, pule para a pergunta 13)
- 12.1. Favor especificar: () amigo, parente, ou pessoa na comunidade
- () paciente ou colega de trabalho no hospital
- 12.2. Quando foi que você teve seu último contato com alguém com tuberculose nos pulmões?
- () < 1 ano () 1-2 anos () > 2 anos
13. Você fuma?
- () jamais fumou () fumante
- () ignorado () ex-fumante
14. Nos últimos 6 meses, você apresentou algum dos sinais e/ou sintomas abaixo?
- Tosse por mais de três semanas () Sim () Não
- Tosse com sangue () Sim () Não
- Sudorese noturna excessiva () Sim () Não
- Perda de 5 Kg ou mais sem fazer dieta () Sim () Não
- Febre diária () Sim () Não
15. Você já recebeu vacina BCG? () Sim () Não
- 15.1. Há quanto tempo? () ≤ 1 ano () 1-2 anos () > 2 anos e < 5 () ≥ 5 anos
16. Um médico lhe disse que você estava com tuberculose? () Sim () Não
- Não aplicar PPD se a resposta para esta pergunta for positiva
- 16.1. Em que ano isso aconteceu? [] [] [] [] []
- 16.2. Se sim, você já tomou medicamentos para tuberculose?
- () Sim () Não () Ignorado
17. Você já realizou prova tuberculínica (PPD)? () Sim () Não
- 17.1. Quando foi realizado o último PPD? [] [] / [] [] [] [] []

17.2. Resultado:

☐ Não reator ☐ Fraco reator ☐ Forte reator ☐ Ignorado

17.3. Ocorreu ulceração ao PPD?

☐ Sim ☐ Não

Não aplicar PPD se a resposta para esta pergunta for positiva para os itens 17.1, 17.2 e 17.3

18. Neste Hospital, o que costuma ser feito quando um paciente com tuberculose nos pulmões é internado?

É admitido na enfermaria com isolamento respiratório ☐

É admitido em enfermaria sem isolamento respiratório ☐

É admitido em quarto privado com isolamento respiratório ☐

É admitido em quarto privado sem isolamento respiratório ☐

19. A tuberculose pode ser transmitida de que forma?

Compartilhando pratos e utensílios ☐ Sim ☐ Não

Através do ar contaminado, respirando o ar do mesmo local que um paciente com tuberculose nos pulmões ☐ Sim ☐ Não

Através de um aperto de mão ☐ Sim ☐ Não

Através de assentos de banheiro ☐ Sim ☐ Não

20. Quais das condições seguintes podem aumentar o risco de contrair a tuberculose?

20.1. Nutrição ☐ S ☐ N ☐ Não sei

20.2. Infecção pelo HIV ☐ S ☐ N ☐ Não sei

20.3. Uso de droga IV ☐ S ☐ N ☐ Não sei

20.4. Câncer ☐ S ☐ N ☐ Não sei

20.5. Obesidade ☐ S ☐ N ☐ Não sei

20.6. Diabetes Mellitus ☐ S ☐ N ☐ Não sei

20.7. Outras doenças nos pulmões ☐ S ☐ N ☐ Não sei

21. Cite três sintomas que são freqüentes em pacientes com tuberculose pulmonar ativa:

_____ , _____ , _____

22. Em relação ao atendimento de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, você concorda ou discorda das declarações abaixo:

22.a. é importante descobrir rapidamente um paciente com tuberculose pulmonar ativa na admissão para diminuir a disseminação de tuberculose para outras pessoas no hospital.

Concordo ☐ Não concordo nem discordo ☐ Discordo ☐

22.b. Eu acho que tenho risco de me infectar com o bacilo da tuberculose porque sou profissional de saúde

Concordo ☐ Não concordo nem discordo ☐ Discordo ☐

22.c. Sempre que posso, evito contato com pacientes que tenham diagnóstico confirmado de tuberculose pulmonar ativa, pois tenho medo de ficar infectado

Concordo ☐ Não concordo nem discordo ☐ Discordo ☐

23. Acha que a disseminação da tuberculose é um problema sério neste hospital?

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

24. Se sim, neste hospital, você acha que algumas medidas deveriam ser tomadas pela direção para controlar a disseminação da tuberculose?

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

25. Você acha que precisa de treinamento adicional para lidar com pacientes de tuberculose?

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

26. Você acha que a vacina BCG protege contra a infecção pelo bacilo da tuberculose?

Muito ☐ ☐ Um pouco ☐ Não protege ☐ Não sei

27. Se você for vacinado com o BCG nos próximos meses, você acha que as medidas de proteção ainda continuarão a ser necessárias para impedir a transmissão de tuberculose neste hospital?

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

28. Como você avalia sua preocupação com os seguintes problemas neste hospital?

a) Transmissão da tuberculose pulmonar de um paciente para outro
Muito preocupado (a)(☐) Preocupado (a)(☐) Nada preocupado (a)(☐)

b) Transmissão da tuberculose pulmonar de pacientes para profissionais de saúde
Muito preocupado (a)(☐) Preocupado (a)(☐) Nada preocupado (a)(☐)

c) Transmissão da tuberculose pulmonar de casos suspeitos para outros
Muito preocupado (a)(☐) Preocupado (a)(☐) Nada preocupado (a)(☐)

29. Você gostaria de mais informações sobre tuberculose? (☐) Sim (☐) Não

30. Na sua opinião, das frases abaixo, o que você considera como verdade:

a) Todo indivíduo infectado com bactérias de tuberculose terá doença de tuberculose (☐)

b) Podem ser infectadas as pessoas com bactérias de tuberculose e podem não ter doença de tuberculose (☐)

c) Tuberculose pode ser curada com medicamento (☐)

d) Tuberculose não pode ser prevenida (☐)

Formulário II: Prova tuberculínica

1. Nome: _____

2. Cicatriz de BCG presente? (☐) Sim (☐) Não

PPD 1 Leitor: _____

3. Data da aplicação: _____ (dia) _____ (mês) _____ (ano)

4. Data da leitura : _____ (dia) _____ (mês) _____ (ano)

5. Presença de bolha? (☐) Sim (☐) Não

6. Resultado da leitura _____ mm de induração

Aplicar segundo PPD se o tamanho da induração for menor que 10 mm

PPD 2 Leitor: _____

7. Data da aplicação: _____ (dia) _____ (mês) _____ (ano)

8. Data da leitura : _____ (dia) _____ (mês) _____ (ano)

9. Presença de bolha? (☐) Sim (☐) Não

10. Resultado da leitura _____ mm de induração