

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

**Cristina de Melo Cardoso Almeida**

**Reconhecimento dos Antígenos Recombinantes MPT-51 e  
GlcB do *Mycobacterium tuberculosis* por Anticorpos Séricos  
de Indivíduos com Tuberculose Ativa.**

**Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Junqueira Kipnis**

**Dissertação de Mestrado**

**Goiânia-GO, 2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



## Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:** [ x ] Dissertação

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor(a):	CRISTINA DE MELO CARDOSO ALMEIDA		
CPF:	349090281-53	E-mail:	mcacristina@hotmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [ x ] Sim [ ] Não			
Vínculo Empregatício do autor	SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DE GOIÁS		
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	BRASIL	UF:	GO
		CNPJ:	
Título:	<b>RECONHECIMENTO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES MPT-51 E GLCB DO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> POR ANTICORPOS SÉRICOS DE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE ATIVA</b>		
Palavras-chave:	ANTÍGENO, ANTICORPO, TUBERCULOSE, ELISA, RESPOSTA IMUNE HUMORAL, MPT-51, GLCB		
Título em outra língua:	<b>HUMORAL IMMUNE RESPONSES OF TUBERCULOSIS PATIENTS IN BRAZIL INDICATE RECOGNITION OF <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MPT-51 AND GLCB</b>		
Palavras-chave em outra língua:	ANTIGEN, ANTIBODY, TUBERCULOSIS, ELISA, HUMORAL IMMUNE RESPONSE, MPT-51, GLCB		
Área de concentração:	IMUNOLOGIA		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	23/02/2007		
Programa de Pós-Graduação:	MEDICINA TROPICAL		
Orientador(a):	DRA ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS		
CPF:	370146921-00	E-mail:	ana.kipnis@pq.cnpq.br
Co-orientador(a):			
CPF:		E-mail:	

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup> [ x ] total

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação. O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e dissertações submetidas para fins de sua disponibilização, receberão procedimento de disponibilização que permitirá cópia e extração de conteúdo, permitindo a utilização em formato Acrobat.

Data: 06/ 12 /2007.

Assinatura do(a) autor(a)

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

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

**Cristina de Melo Cardoso Almeida**

**Reconhecimento dos Antígenos Recombinantes MPT-51 e  
GlcB do *Mycobacterium tuberculosis* por Anticorpos Séricos  
de Indivíduos com Tuberculose Ativa.**

**Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Junqueira Kipnis**

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

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

Goiânia-GO, 2007

Autorizo a reprodução parcial desse trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

**Almeida, Cristina de Melo Cardoso.**

**A447r Reconhecimento dos Antígenos Recombinantes MPT-51 e GlcB do *Mycobacterium tuberculosis* por Anticorpos Séricos de Indivíduos com Tuberculose Ativa / Cristina de Melo Cardoso Almeida. - Goiânia, 2007.**

**105f. : il., figs., tabs., qds.**

**Orientadora: Ana Paula Junqueira Kipnis.**

**Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2007.**

**Bibliografia : f.72-89.**

**Inclui listas de abreviaturas, figuras, tabelas e quadros. Anexos.**

**1. Tuberculose - Diagnóstico 2. Teste imunoenzimático (ELISA) 3. *Mycobacterium tuberculosis* 4. Antígenos (GlcB) 5. Antígenos (MPT-51) 6. Anticorpos - Resposta humoral I. Kipnis, Ana Paula Junqueira II. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública III. Título.**

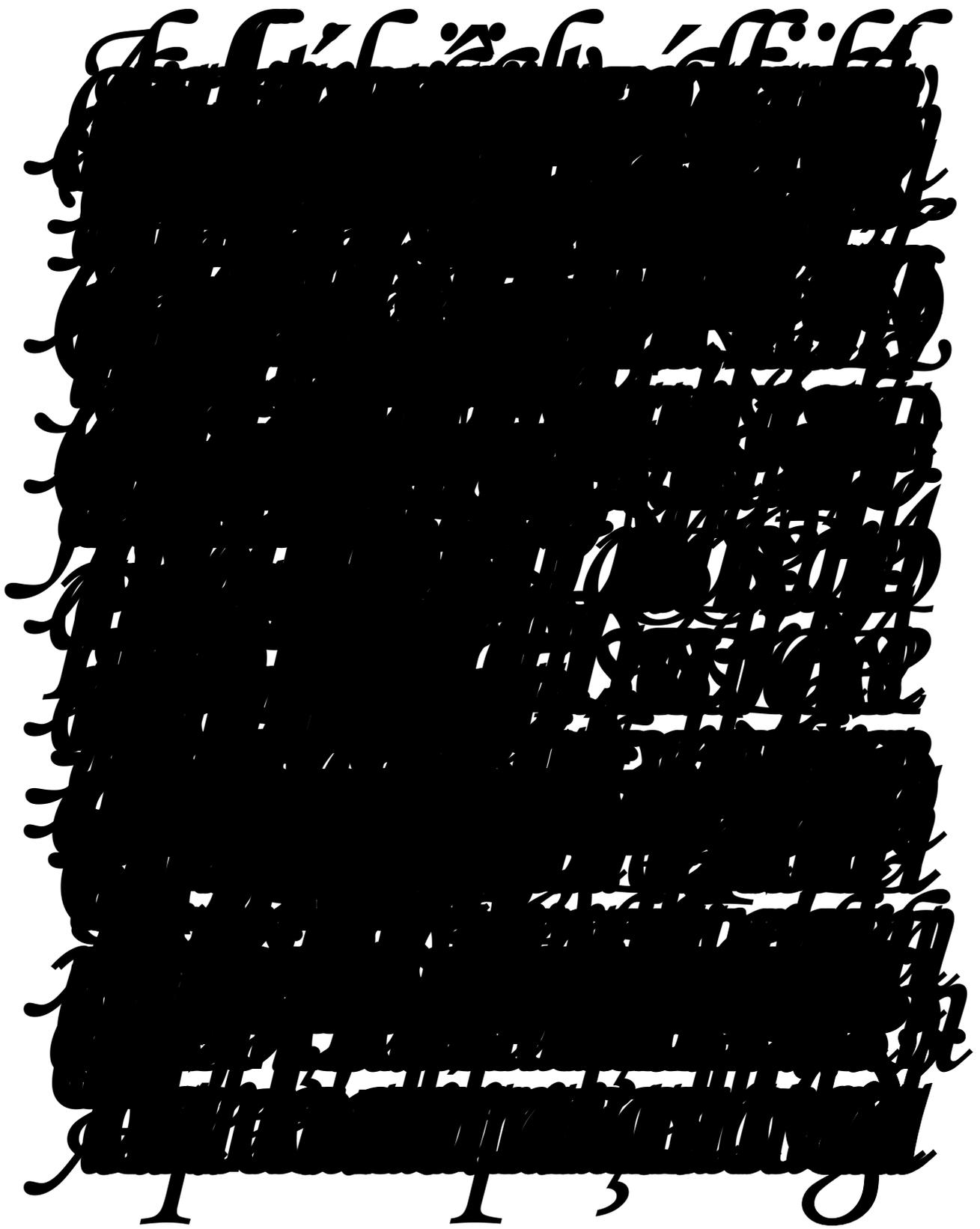
**CDU : 616-002.5**

*Confie no Senhor de todo o  
coração e não  
Se apóie na sua própria  
inteligência.  
Lembre-se de Deus em tudo o que  
fizer e  
Ele lhe mostrará o caminho  
certo.  
Provérbios 3:5 e 6.*



ACTA DE CUMPLIMIENTO

[The remainder of the page is obscured by dense, illegible black scribbles.]



## ABREVIATURAS

Ag- Antígeno	IgM- Imunoglobulina M
AM- Arabinomanana	IgG- Imunoglobulina G
APC- Célula Apresentadora de Antígeno	IL- Interleucina
BAAR- Bacilo Álcool Ácido Resistente	iNOS- Óxido Nítrico Sintetase induzível
BCG- Bacilo de Calmette-Guérin	kDa - Quilodalton
Célula NK- Célula Matadora Natural	LAM- Lipoarabinomanana
CFP- Proteína do Filtrado de Cultura	LM- Lipomanana
CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	MIP-1- Proteína 1 Inflamatória de Macrófagos
CR- Receptor de Complemento	MHC- Complexo de Histocompatibilidade Principal
CTL- Linfócito T Citotóxico	NO- Óxido Nítrico
DC- Célula Dendrítica	OMS ou WHO- Organização Mundial da Saúde
DNA- Ácido Desoxirribonucléico	PAMPS- Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
DO- Densidade Ótica	PBS- Tampão de Salina-Fosfato
DOTS- estratégia de Tratamento Diretamente Observado de Curta Duração	PIMs- Manosídeo de Fosfatidilinositol
DP- Desvio Padrão	PNCT- Programa Nacional de Controle da Tuberculose
FUNAPE- Fundação de Apoio à Pesquisa	PPD- Derivado de Proteína Purificada
FUNASA- Fundação Nacional de Saúde	PRR- Receptor de Reconhecimento de Padrões
HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana	SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HR- Isoniazida e Rifampicina	SNC- Sistema Nervoso Central
HRZ- Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida	TB- Tuberculose
IFN- $\gamma$ - Interferon Gama	TGF- Fator de Crescimento Tumoral
IgA- Imunoglobulina A	Th- Linfócito T Auxiliar
	TLR- Receptor Semelhante ao Toll
	TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral Alfa

## LISTA DE FIGURAS

### Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática dos componentes da parede celular do *M. tuberculosis*.....09
- Figura 2.** Determinação dos níveis séricos de IgM anti-MPT-51 de pacientes com tuberculose ativa.....43
- Figura 3.** Determinação dos níveis séricos de IgM anti-GlcB de pacientes com tuberculose ativa.....45
- Figura 4.** Determinação dos níveis séricos de IgG anti-MPT-51 de pacientes com tuberculose ativa.....47
- Figura 5.** Determinação dos níveis séricos de IgG anti-GlcB de pacientes com tuberculose ativa.....49
- Figura 6.** Detecção dos níveis séricos de IgM anti-MPT-51 dos pacientes com tuberculose pulmonar antes e após o tratamento.....51
- Figura 7.** Detecção dos níveis séricos de IgG anti-MPT-51 dos pacientes com tuberculose pulmonar antes e após o tratamento.....53
- Figura 8.** Detecção dos níveis séricos de IgM anti-GlcB dos pacientes com tuberculose pulmonar antes e após o tratamento.....55
- Figura 9.** Detecção dos níveis séricos de IgG anti-GlcB dos pacientes com tuberculose pulmonar antes e após a tratamento.....57

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### Tabelas

**Tabela 1.** Dados para validação dos ensaios de ELISA.....37

**Tabela 2.** Dados clínicos e epidemiológicos da população em estudo.....41

**Tabela 3.** Sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste para detecção de IgM anti- MPT-51.....42

### Quadros

**Quadro 1.** Sensibilidade e especificidade dos testes ELISA e Imunocromatografia usados em pesquisa.....26

**Quadro 2.** Sensibilidade e especificidade dos testes ELISPOT e Quantiferon-RD1 usados em pesquisa.....27

**Quadro 3.** Esquemas de tratamento padronizados pelo Ministério da Saúde, com base na forma clínica e história de tratamento anterior.....29

**Quadro 4.** Interpretação dos resultados do teste tuberculínico.....40

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. História. ....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Epidemiologia. ....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Etiologia e Patogenia. ....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Agente Etiológico.....</b>	<b>7</b>
<i>1.4.1. Principais Proteínas do M. tuberculosis. ....</i>	<i>9</i>
<b>1.5. Resposta Imune ao M. tuberculosis. ....</b>	<b>14</b>
<i>1.5.1. Resposta Inata. ....</i>	<i>14</i>
<i>1.5.2. Resposta Celular. ....</i>	<i>17</i>
<i>1.5.3. Resposta Humoral. ....</i>	<i>19</i>
<i>1.5.4. Principais Citocinas Envolvidas na Resposta Imune à Tuberculose. ....</i>	<i>20</i>
<b>1.6. Diagnóstico da Tuberculose. ....</b>	<b>22</b>
<i>1.6.1. Testes Diagnósticos em Uso.....</i>	<i>22</i>
<i>1.6.2. Testes Sorológicos Usados em Pesquisa para Diagnóstico. ....</i>	<i>23</i>
<b>1.7. Tratamento. ....</b>	<b>27</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Objetivo Geral. ....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos. ....</b>	<b>31</b>
<b>4. METODOLOGIA. ....</b>	<b>32</b>

<b>4.1. População em Estudo.</b> .....	<b>32</b>
<i>4.1.1. Pacientes com Tuberculose Ativa.</i> .....	<b>32</b>
<i>4.1.2. Controles Saudáveis.</i> .....	<b>33</b>
<i>4.1.3. Pacientes com Hanseníase.</i> .....	<b>33</b>
<b>4.2. Coleta de Dados Clínicos e Epidemiológicos.</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3. Coleta das Amostras.</b> .....	<b>34</b>
<b>4.4. Antígenos Recombinantes.</b> .....	<b>34</b>
<b>4.5. Anticorpos (conjugados)</b> .....	<b>35</b>
<b>4.6. Ensaio Imuno Enzimático (ELISA).</b> .....	<b>35</b>
<i>4.6.1. ELISA Indireto para Detecção de IgG Sérica.</i> .....	<b>35</b>
<i>4.6.2. ELISA Indireto para Detecção de IgM Sérica.</i> .....	<b>36</b>
<b>4.7. Validação do Ensaio ELISA na Detecção de Anticorpos Específicos aos Antígenos Recombinantes MPT-51 e GlcB.</b> .....	<b>37</b>
<b>4.8. Análise Estatística.</b> .....	<b>38</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>5.1. Dados Clínicos e Epidemiológicos da População em Estudo.</b> .....	<b>39</b>
<b>5.2. Reconhecimento do Antígeno Recombinante MPT-51 por Anticorpos IgM Séricos dos Pacientes com Tuberculose Ativa pelo Ensaio de ELISA.</b> .....	<b>42</b>
<b>5.3. Reconhecimento do Antígeno Recombinante GlcB por Anticorpos IgM Séricos dos Pacientes com Tuberculose Ativa pelo Ensaio ELISA.</b> .....	<b>44</b>
<b>5.4. Reconhecimento do Antígeno Recombinante MPT-51 por Anticorpos IgG Séricos dos Pacientes com Tuberculose Ativa pelo Ensaio ELISA.</b> .....	<b>46</b>
<b>5.5. Reconhecimento do Antígeno Recombinante GlcB por Anticorpos IgG Séricos dos Pacientes com Tuberculose Ativa pelo Ensaio ELISA.</b> .....	<b>48</b>
<b>5.6. Cinética dos Anticorpos IgM Séricos anti-MPT-51 de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Antes e Após o Tratamento.</b> .....	<b>50</b>
<b>5.7. Cinética dos Anticorpos IgG Séricos anti-MPT-51 de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Antes e Após o Tratamento.</b> .....	<b>52</b>

<b>5.8. Cinética dos Anticorpos IgM Séricos anti-GlcB de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Antes e Após o Tratamento. ....</b>	<b>54</b>
<b>5.9. Cinética dos Anticorpos IgG Séricos anti-GlcB de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Antes e Após o Tratamento. ....</b>	<b>56</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÕES. ....</b>	<b>64</b>
<b>8. REFERÊNCIAS. ....</b>	<b>65</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>83</b>
<b>9.1. Anexo 1. Termo de Consentimento dos Voluntários. ....</b>	<b>83</b>
<i>9.1.1. Controles Saudáveis.....</i>	<i>83</i>
<i>9.1.2. Pacientes com Tuberculose.....</i>	<i>84</i>
<i>9.1.3. Pacientes com Hanseníase.....</i>	<i>85</i>
<b>9.2. Anexo 2. Questionário Aplicado aos Voluntários.....</b>	<b>86</b>
<i>9.2.1. Controles Saudáveis.....</i>	<i>86</i>
<i>9.2.2. Pacientes com Tuberculose.....</i>	<i>87</i>
<i>9.2.3. Pacientes com Hanseníase.....</i>	<i>88</i>
<b>9.3. Anexo 3. Documentos Referentes a Aprovação do Projeto de Pesquisa.....</b>	<b>89</b>
<i>9.3.1. Parecer da Diretoria do IPTSP.....</i>	<i>89</i>
<i>9.3.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa- UFGO.....</i>	<i>90</i>
<i>9.3.3. Parecer do SUS e Secretaria de Ciências e Tecnologia do Estado de Goiás.....</i>	<i>92</i>
<b>9.4. Anexo 4. Documentos Referentes à Parceria entre a Universidade e as Unidades de Saúde. ....</b>	<b>94</b>

## RESUMO

A tuberculose (TB) causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, resulta em mais de dois milhões de óbitos anualmente. Segundo dados da OMS cerca de 30% da população mundial está infectada com o bacilo e 5% desses infectados desenvolvem a doença ativa. O Brasil juntamente com outros 21 países albergam 80% de todos os casos de TB no mundo. Devido às falhas existentes nos diagnósticos atuais, muitos estudos tentam descobrir antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* que podem ser usados no ensaio ELISA, um teste de baixo custo. Esse teste seria de grande valia na identificação da tuberculose, principalmente em países em desenvolvimento, endêmicos também para outras micobactérias como *M. leprae*, causador da hanseníase. Várias pesquisas têm identificado componentes do bacilo, como as proteínas secretadas pelas micobactérias em cultura, sob condições de estresse nutricional, mimetizando a situação vivida pelo bacilo no meio intracelular. Dessas proteínas são selecionadas aquelas imunodominantes que podem ser usadas como marcadores da doença. O objetivo desse trabalho foi avaliar o reconhecimento de duas dessas proteínas: os antígenos recombinantes MPT-51 e GlcB do *M. tuberculosis*, por anticorpos séricos da classe IgM e IgG de pacientes com tuberculose ativa, pelo método imunoenzimático indireto (ELISA). Foram adotados como critério de inclusão aqueles indivíduos de qualquer grupo que fossem HIV negativos, sem doenças crônicas ou uso de medicamentos imunossupressores e mulheres não gestantes. Quarenta e nove pacientes com tuberculose ativa foram selecionados e comparados com os grupos: controles saudáveis PPD não reatores e pacientes hansenianos portadores da forma Virchoviana, pareados por sexo e idade. Os pacientes com TB ( $0,810 \pm 0,319$ ) mostraram maiores concentrações de IgM anti-MPT-51 que os seus respectivos controles: pacientes com hanseníase ( $0,454 \pm 0,195$ ) e controles saudáveis ( $0,448 \pm 0,162$ ), com diferença estatística,  $p=0,001$  e  $p<0,001$  respectivamente. Os ensaios de ELISA nas dosagens de IgM e IgG anti-MPT-51 mostraram especificidade de 96,9% e 98,0% e sensibilidade 67,3% e 4,1% respectivamente. Para o antígeno GlcB, os ensaios de ELISA na dosagem de IgM e IgG mostraram especificidade de 95,9% e 99% e sensibilidade 8,2% e 18,2%. Onze

pacientes com TB foram monitorados durante o tratamento, com realização de dosagens dos níveis de anticorpos IgM e IgG específicos ao rMPT-51 e rGlcB antes e após a terapia. Os níveis de anticorpos IgM e IgG anti-MPT-51 antes e após a terapia não sofreram alterações significativas. Entretanto, os níveis de IgG anti-GlcB diminuíram após a terapia ( $p < 0,01$ ). Nossos resultados sugerem que o rMPT-51 pode ser usado como marcador da tuberculose, quando mensuradas as concentrações de IgM específicos, pois foram capazes de discriminar pacientes TB, de controles e hansenianos. Apesar do ELISA ter demonstrado baixa sensibilidade quando o antígeno rGlcB foi utilizado, os níveis séricos dos anticorpos da classe IgG diminuíram após o tratamento da tuberculose ( $p < 0,01$ ) sugerindo que essa técnica poderia ser utilizada para o acompanhamento da terapêutica.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) caused by the *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for more than 2 million deaths annually in the world. Although one third of the world population carries the bacilli, only 5% of the infected people develop active disease. 80% of TB cases are concentrated among 21 countries and Brazil is one of them. Due to the flaws existent inherent to the TB diagnostic, many works try to discover TB antigens to be used on an ELISA assay to detect active TB in underdeveloped countries, endemic for other mycobacterias such as leprosy (L). Several researches are identifying bacilli proteins obtained under nutritional culture stress, in order to mimic the intracellular milieu. It has been selected the immunodominant ones as a disease marker. The objective of this work was to characterize the humoral immune response among TB patients to rMPT-51 and rGlcB using an ELISA indirect test. It was included voluntaries that were HIV negative and the ones without pregnancy, chronic disease or under immunosuppressant treatment. Serum IgM and IgG against MPT-51 and GlcB recombinant antigen from 49 patients with active tuberculosis were measured by indirect ELISA, paired by sex and age with: healthy PPD negative individuals (controls) and lepromatous leprosy patients (LL). Patients with TB ( $0.810 \pm 0.319$ ) showed higher levels of IgM against rMPT-51 than both LL individuals ( $0.454 \pm 0.195$ ) and control ( $0.448 \pm 0.162$ ) with statistical significant,  $p=0.001$  and  $p<0.001$ ) respectively. These test showed 96.9% specificity and 67.3% sensitivity. Conversely, tuberculosis, controls, and LL individuals showed lower of MPT-51 IgG levels, which could not be distinguished among the groups. rGlcB antigen was able to distinguished TB patients from controls for IgM levels (specificity, 95.9 % and sensitivity, 8.2% ) and IgG levels (specificity, 99% and sensitivity, 18.2%). In order to evaluate the profiles of IgM and IgG against rMPT-51 and rGlcB before and after chemotherapy, the sera from 11 patients was collected and paired according to the treatment status (before or after). IgM and IgG against MPT-51 remained with the same profile levels before and after the treatment. The levels of serum IgG against rGlcB clearly diminished after the chemotherapy ( $p<0.01$ ). Our results suggest that serum IgM levels against recombinant MPT-51

could to be useful to distinguish between active TB, controls and LL individuals. In addition, after TB treatment the IgG response to rGlcB diminished suggesting that it could be used to follow up of the TB treatment.

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO.

### 1.1. História.

Estudo realizado em tecidos moles e ossos de múmias egípcias, datadas de 2050 anos a.C. têm demonstrado evidências da tuberculose em populações históricas e fornecido informações sobre a evolução do seu agente etiológico (Zink et al. 2003). Salo et al. (1994) relatam estudos em tecidos do pulmão de múmias (com 1000 anos de idade), encontradas no Peru, onde foi identificado DNA do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Konomi et al. (2002) identificaram DNA de várias espécies de micobactérias, incluindo o *M. tuberculosis* em tecidos da área genital de múmias datadas de 140 a 1200 d.C., encontradas nos Andes, América do Sul.

Muitas micobactérias são encontradas no solo e na água e acredita-se que algumas espécies, através de mutações, passaram a infectar animais. Com a evolução, essas bactérias passaram a sobreviver em mamíferos, sugerindo que alguma delas poderia ter sido precursora do *M. bovis*. Com a domesticação do gado, ocorrido entre 10.000 e 25.000 anos atrás, a tuberculose tornou-se mais freqüente no homem e por isso criou-se uma hipótese de que houve a passagem do patógeno desse animal para o homem, sugerindo que o *M. bovis* seria o precursor do *M. tuberculosis* (Stead 1997). Contudo, após a identificação de DNA e mapeamento gênico de várias espécies de micobactérias, essa teoria foi desconsiderada (Brosch et al. 2002). A maioria das espécies foi agrupada em dois complexos: o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por micobactérias distintas entre si, mas que possuem semelhanças genotípicas, causadoras de doença humana e animal como *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* (Jungblut et al. 1999, Brosch et al. 2002); e o complexo *Mycobacterium não tuberculosis*, composto por espécies diferentes ou variantes da mesma espécie de micobactérias, mas que normalmente não acometem o homem, também denominadas atípicas.



No século 20, a taxa de mortalidade devido à tuberculose começou a diminuir gradativamente pelo uso da vacina BCG (do francês *Bacilo Calmette-Guérin*), produzida pela primeira vez em 1920, por Calmette e Guérin em Paris, administrada em recém-nascidos e crianças saudáveis (Starke 2004, Andersen & Doherty 2005) e pela consolidação do uso dos antibióticos, como terapêutica eficaz para o tratamento da tuberculose.

Entretanto, em meados de 1980 houve um aumento do número de casos novos, sendo responsável por isso, o desenvolvimento de cepas de micobactérias multi-drogas resistentes (Pablos-Mendez et al. 1998), associado ao vírus HIV (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), agente etiológico de uma doença (SIDA) caracterizada pela redução do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos indivíduos infectados, que causa imunossupressão e aumento da susceptibilidade à tuberculose e a outras doenças crônicas (Dye et al. 1999, Serbina et al. 2001).

Atualmente, a tuberculose continua sendo uma doença infecciosa grave, com incidência alta, resultando em muitos óbitos no mundo todo. Várias pesquisas são realizadas na tentativa de conhecer melhor os mecanismos de transmissão do bacilo e a resposta protetora do hospedeiro, com a finalidade de desenvolver novas estratégias de controle dessa doença.

## **1.2. Epidemiologia.**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência de tuberculose pulmonar é de cerca de 9 milhões de casos novos e ocorrência de mais de dois milhões de mortes por ano (Frieden et al. 2003, Harries & Dye 2006). Desde 1993 a OMS declarou a tuberculose uma prioridade mundial. Atualmente, há duas metas a serem alcançadas, que consistem na identificação de 70% dos casos novos e na cura de pelo menos 85% dos pacientes. Faz parte das estratégias recomendadas para atingir essas metas, a estratégia DOTS (do inglês *Directly Observed Treatment Short Course*) que consiste na implementação do tratamento diretamente

supervisionado de curta duração ao paciente. A estratégia DOTS depende do compromisso do governo e apoio financeiro, na criação de programas para o controle da tuberculose: incluindo busca ativa de casos novos (investigação de todo paciente sintomático respiratório, recebido na unidade de saúde e de contatos dos doentes com TB); padronização do tratamento dos pacientes com diagnóstico de TB; implantação de sistema de distribuição dos medicamentos com monitoramento e supervisão (visitas regulares do paciente à unidade de saúde ou do agente de saúde ao paciente, na sua residência, pelo menos nos dois primeiros meses para avaliação do tratamento). Ainda como expansão do DOTS, a comunidade precisa ter fácil acesso ao diagnóstico e tratamento, além de uma atenção especial direcionada aos pacientes imunossuprimidos (HIV positivos) e aqueles infectados com bacilos multi-drogas resistentes (World Health Organization 2006). Essas medidas visam a redução da mortalidade, da prevalência e incidência da tuberculose (Gupta et al. 2004, Dye et al. 2005).

Em 2006, a OMS lançou outro desafio na tentativa de controlar a tuberculose. Trata-se de um plano global a ser cumprido entre 2006 e 2015, reforçando medidas já traçadas. Faz parte desse novo plano: direcionar atenção especial aos principais grupos de risco para a tuberculose (imunossuprimidos, indivíduos de baixo poder sócio-econômico, que vivem em aglomerados como prisões, asilos, refugiados e usuários de drogas); identificar cepas do *M. tuberculosis* multi-drogas resistentes; discriminar as barreiras que impedem o acesso da população aos serviços de atendimento à saúde; estabelecer estratégias para melhoria no atendimento e expansão do DOTS; incentivar a pesquisa, através de convênios do governo com instituições como as universidades e serviços de saúde. Para 2015 a meta é que haja uma redução em 50% dos índices de prevalência e mortalidade, comparados com os índices registrados em 1990. Para 2050 a meta é que a tuberculose deixe de ser um problema de saúde mundial (com incidência anual <1 caso/1 milhão de habitantes) (Squire et al. 2006, World Health Organization 2006).

Nas Américas, o Brasil e o México detêm 50% dos casos de tuberculose (Chowell et al. 2005). O Brasil está entre os 22 países que concentram 80% de todos

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

os casos no mundo. Em 2002, foram notificados 97.875 casos, sendo 81.034 casos novos, com cerca de 5000 mortes causadas por todas as formas clínicas da tuberculose (pulmonar e extra-pulmonar). A maior taxa de incidência tem ocorrido no Estado do Rio de Janeiro, sendo o sexo masculino o mais atingido, na proporção de dois para um. Algumas populações, como as indígenas, as carcerárias e os sem-teto apresentam incidência muito maior que a população em geral (Hijjar 2005).

No Brasil, o governo priorizou o controle da tuberculose seguindo as recomendações da OMS. O Ministério da Saúde criou um Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), garantindo acesso gratuito da população ao tratamento dessa doença. Somente em 1999 foi oficializada a implantação da estratégia DOTS em nosso país, ficando estabelecido que na primeira fase do tratamento, nos dois primeiros meses, faz-se um mínimo de três consultas semanais e na segunda fase, últimos quatro meses, uma consulta semanal. A baciloscopia no escarro é feita em pelo menos duas amostras, realizado periodicamente durante o tratamento. A meta de identificação de 70% dos casos novos já foi atingida, enquanto a cura em 85% dos indivíduos em tratamento tem sido difícil de atingir, devido aos casos de interrupção da quimioterapia (12% de abandono) e à multi-droga resistência dos bacilos (Hijjar 2005, Dye et al. 2005).

Em Goiás, existem dois municípios prioritários para o PNCT: Goiânia e Aparecida de Goiânia. Somente nessas duas cidades, em 2003, foram registrados 1099 casos novos de tuberculose, que representa 92,3% dos casos no Estado. O percentual de cura desses casos foi abaixo da meta nacional (somente 70% se curaram). Segundo o Ministério da Saúde, mais de 71,03% da população do estado vivem em municípios com prevalência superior a cinco casos/10 mil habitantes, enquanto a taxa ideal deveria ser menor que 1 caso/10 mil habitantes (Ministério da Saúde 2002, 2005).

### 1.3. Etiologia e Patogenia.

A tuberculose é uma doença infecciosa grave, causada pelo *M. tuberculosis* (bacilo de Koch), podendo acometer todos os órgãos, mas em especial os pulmões. As principais manifestações da doença são: tosse produtiva com mais de 15 dias, hemoptise, febre vespertina baixa, suor noturno, dor no tórax e perda de peso (Marais et al. 2005).

Cerca de 70% dos doentes adultos com a forma pulmonar são bacilíferos, ou seja, apresentam carga bacteriana nas expectorações (escarro). Esses indivíduos constituem a fonte habitual de disseminação da tuberculose, pois eliminam bacilos viáveis para o meio aéreo. A transmissão ocorre de pessoa a pessoa, pela inalação de gotículas, perdigotos, que contêm os bacilos, expelidos pelos doentes através da fala, tosse e espirro. As gotículas maiores se depositam rapidamente, enquanto as mais leves, medindo de 1 a 5 µm de diâmetro, permanecem em suspensão no ar (núcleos de Wells) e podem alcançar os bronquíolos e alvéolos (Riley et al. 1995). Estima-se que durante um ano, cada doente poderá infectar em média 10 a 15 pessoas. Apenas 5-10% das pessoas infectadas, desenvolverão a doença ativa (Medlar 1955, Bloom & Murray 1992). Essa casuística de o indivíduo infectado vir a desenvolver doença, envolve múltiplos fatores, desde condições sócio-econômicas, tempo e frequência de exposições e fonte infectante (carga bacteriana), assim como a virulência do bacilo e fatores genéticos (Heldal et al. 2003).

A maioria das pessoas infectadas desenvolve resposta imune protetora contra a micobactéria. O *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo que replica dentro dos macrófagos e de células fagocitárias (Schlesinger 1996a). Acredita-se que dentro de células mononucleares, os bacilos entram em estado de dormência, latência (estado metabolicamente inerte do microorganismo). Sobrevivem sem se dividir por vários anos ou tendo um baixo crescimento, podendo reativar, ao encontrar condições favoráveis (Tufariello et al. 2003). Wayne & Hayes (1996) cultivando *M. tuberculosis* (H37Rv), propõe um modelo de que o estado de latência do bacilo esteja relacionado com a redução do oxigênio no meio, embora haja estudo contraditório,

Mestrado - UFGO. 2007.

sobre a influência do oxigênio na infecção pulmonar humana (Tsai et al. 2006). A sobrevivência dos bacilos dentro dos macrófagos, possivelmente envolve metabolismo ativo dessas bactérias. Portanto, afirmar que os bacilos encontram-se latentes pode ser um termo incorreto. Assim, Orme (2001) critica o termo “latência”, pois ainda não foi possível reproduzir esse estado do bacilo *in vitro*.

Após a infecção dos macrófagos, podem surgir dois tipos de lesões: uma lesão exsudativa com reação inflamatória aguda, contendo leucócitos circundando os bacilos. Essa lesão pode ser observada no parênquima pulmonar, sendo semelhante a uma pneumonia bacteriana, que resulta em infecção primária ou primo-infecção. Em 90% dos casos, a lesão cicatriza e todo exsudato é absorvido (Bloom & Murray 1992, Tufariello et al. 2003). O outro tipo de lesão envolve a progressão da primo-infecção, desenvolvendo tuberculose ativa, com formação de necrose do tecido. Essa evolução é caracterizada por uma inflamação granulomatosa com três zonas: uma central de células gigantes multinucleadas contendo os bacilos, uma média de células epitelióides, usualmente dispostas de modo radial e uma periférica de fibroblastos, células mononucleares (Gonzalez-Juarrero et al. 2003, Tsai et al. 2006) e linfócitos T e B dispersos. Em geral, essas reações apresentam necrose caseosa central e são denominadas tubérculos. Os granulomas parecem ter papel importante para conter a expansão local e sistêmica do foco bacteriano. No entanto, sugere-se que o rompimento desses tubérculos cause o esvaziamento do seu conteúdo formando uma cavidade no brônquio o que facilita a sua disseminação. Posteriormente, ocorre cicatrização por tecido fibroso ou calcificação (Cosma et al. 2003, Tsai et al. 2006, Lin et al. 2006). A tuberculose secundária, quando o indivíduo adquire a doença ativa muitos anos após a primo-infecção, pode ocorrer por reativação do bacilo ou por origem exógena a partir de uma nova contaminação embora pareça ser menos freqüente (Chiang & Riley 2005).

A disseminação para outros órgãos parece ocorrer por extensão direta, através de canais linfáticos e da corrente sanguínea. Na primo-infecção, os bacilos da tuberculose podem propagar-se a partir dos brônquios, via sistema linfático, para os linfonodos regionais, ou pela corrente sanguínea. No caso da reativação, a

disseminação pode se dar pela corrente sanguínea podendo resultar em lesão miliar (Gonzalez et al. 2003, Musellim et al. 2005).

As formas extrapulmonares mais comuns são pleural, linfadenite, do SNC, ganglionar, miliar, óssea, geniturinária, meningoencefálica, ocular, pericárdica, da pele, da laringe, gastro intestinal, hepatobiliar, da mama, peritoneal e da glândula endócrina (Gonzalez et al. 2003, Golden & Vikram 2005).

#### **1.4. Agente Etiológico.**

As micobactérias pertencem à ordem dos *Actinomycetales*, subordem *Corynebacteriaceae*, família das *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. A família das *Mycobacteriaceae* compreende cerca de 100 espécies diferentes, a maioria saprófitas de vida livre (Aranaz et al. 1999). Várias cepas do *M. tuberculosis* estão sendo seqüenciadas. Em 1998 foi publicado o genoma completo da cepa de referência H37Rv (ATCC 27294) do *M. tuberculosis* (Cole et al. 1998).

Os bastonetes do *M. tuberculosis* se caracterizam por serem retos e finos, por não formarem esporos, nem flagelos e por não produzirem toxinas. Medem de 1 a 4 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de diâmetro. Possuem longo período de geração (16 a 20 horas) dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio. Podem ainda, *in vitro*, serem cultivados em meios de cultura enriquecidos, sólidos ou líquidos, como Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H10 ou 7H11 (Crump et al. 2003, Adler et al. 2005).

O envelope do *M. tuberculosis* é constituído por três componentes: membrana plasmática, cápsula e parede celular. Um conjunto de componentes ligados a esse esqueleto forma a cápsula, constituída por polissacarídeos, proteínas e lipídeos (Brennan & Nikaido 1995, Daffe & Draper 1998). A parede celular do *M. tuberculosis* é basicamente constituída por um complexo de ácidos micólicos, arabinogalactanas e peptidoglicano (do inglês *Mycolyl ArabinoGalactan Peptidoglican*, mAGP); glicolipídeos como a lipoarabinomanana (LAM), ancorada à

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

---

---

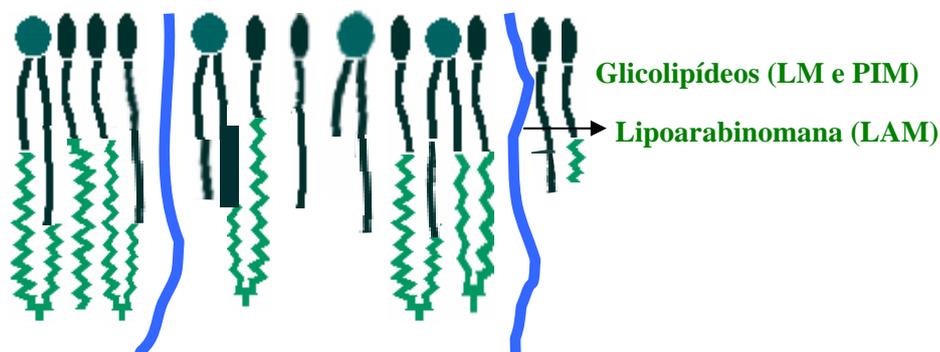
---

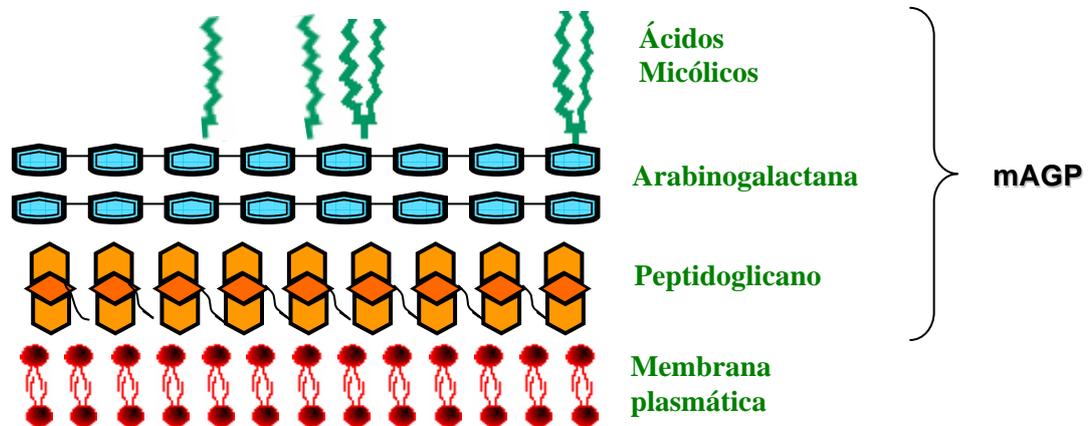
Mestrado - UFGO. 2007.

membrana plasmática; lipomanana (LM) que parece ser o precursor de LAM; e fosfatidilinositol manosídeo (do inglês *Phosphatidyl Inositol Mannosides*, PIMs), como mostra a **Figura 1** (McNeil et al. 1990, Daffe & Draper 1998, Mikusova et al. 2000). A parede celular confere à micobactéria resistência à desidratação e proteção à ação de agentes químicos, mas ela é facilmente destruída por agentes físicos como calor e radiação ultravioleta (Hobday 1997).

O *M. tuberculosis* possui a habilidade de formar cordões serpentiniformes, quando cultivado em meio líquido. Isso se deve a presença de glicolídeos, conhecidos como fatores de corda, como o dimicolato de trealose, responsáveis por manter a integridade da parede. Dificilmente coram-se pelo método de Gram devido às características da sua parede celular, embora sejam considerados como Gram positivos. O complexo mAGP constitui uma barreira periférica hidrofóbica, que durante a coloração por Ziehl-Nielsen retém a fucsina. Os ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa) parecem ser o suporte molecular da álcool-ácido resistência.

Essas estruturas da parede celular, encontradas somente em patógenos microbianos, são denominadas padrões moleculares associados ao patógeno (do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs), que interagem com os receptores de reconhecimento de patógenos (do inglês *Pathogen Recognition Receptors*, PRRs), expressos em macrófagos e outras células fagocitárias. Assim, por exemplo, durante a resposta protetora no hospedeiro, os ácidos micólicos da parede do *M. tuberculosis* favorecem a formação do granuloma, enquanto os glicolipídeos (LAM) são responsáveis pela indução da necrose caseosa e parece ter um papel importante na virulência das diferentes espécies de micobactérias (Briken et al. 2004). O fator corda também parece estar envolvido na virulência do bacilo, uma vez que, a administração dessa molécula em coelhos induziu tanto no pulmão como no fígado formação do granuloma (Hamasaki et al. 2000).





**Figura 1. Representação esquemática dos componentes da parede celular do *M. tuberculosis*.** Estrutura da parede celular do *M. tuberculosis* composta por um complexo de ácidos micólicos, arabinogalactanas e peptidoglicano (mAGP), glicolipídeos (LM e PIMs) e LAM ancorados à membrana plasmática.

#### **1.4.1. Principais Proteínas do *M. tuberculosis*.**

Após o sequenciamento gênico do *M. tuberculosis*, tem sido possível investigar proteínas que podem estar envolvidas na patogenicidade, virulência ou mecanismos de evasão do bacilo. Até o momento, um grande número dessas proteínas foi identificado, sendo que muitas delas têm funções conhecidas (Camus et al. 2002). Destacaremos algumas que são largamente estudadas: CFPs (do inglês *Culture Filtrate Proteins*) são proteínas do filtrado de cultura do *M. tuberculosis* e acredita-se que contenham em torno de 200 proteínas diferentes (Sable et al. 2005b). Essas proteínas são secretadas pelo bacilo e parecem ter uma grande capacidade de estimular a resposta do hospedeiro. São amplamente usadas em pesquisas como componentes para novas vacinas protetoras da tuberculose e em sorodiagnósticos como marcadores da doença (Bahk et al. 2004, Sable et al. 2005c). Devido ao fato do *M. tuberculosis* ter longo período de geração, e pelo risco do manuseio do bacilo, foram desenvolvidas técnicas de clonagem para obtenção de proteínas recombinantes. Dentre essas proteínas, está a CFP 10 (Rv3874), uma proteína de 10-

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

kDa e o ESAT-6 (Rv3875) com peso molecular de 6-kDa, (do inglês *Early Secretory Antigenic Target 6*), caracterizado por Sorensen et al. (1995). Ambas as proteínas são codificadas na região RD-1 do gene (do inglês *Regions of Difference 1*) de várias espécies do complexo *M. tuberculosis*, exceto nos subtipos do *M. bovis* BCG (Sorensen et al. 1995, Mahairas et al. 1996, Berthet et al. 1998). Um trabalho utilizando a cepa H37Rv do *M. tuberculosis*, correlaciona essa região com a virulência do bacilo, pois ao ser deletada, há uma atenuação da virulência. Isso pode ser observado *in vitro*, em macrófagos humanos infectados com a cepa H37Rv deletada na região RD1, que foi bem menos virulenta, muito semelhante ao *M. bovis* BCG. Esses resultados foram confirmados em modelo animal, com camundongos C57BL/6 (Lewis et al. 2003). Além disso, parece que estas proteínas são imunodominantes durante a resposta imune à infecção. O trabalho de Junqueira-Kipnis et al. (2006) mostra que camundongos nocautes em IFN- $\gamma$  e infectados com *M. tuberculosis*, com deleção gênica na região RD1 (*M. tuberculosis* mutante) apresentam crescimento bacteriano mais lento e ausência de necrose tecidual. Enquanto no mesmo modelo animal infectado com o *M. tuberculosis* original apresenta uma reação granulomatosa com necrose, sugerindo que as proteínas codificadas na região RD1 estão envolvidas no processo de citólise no pulmão desses camundongos. Quando se reconstitui a região RD1 no *M. tuberculosis* mutante a habilidade de causar necrose também é restaurada. Tan et al. (2006) confirmando esses resultados, demonstraram *in vitro* que a inativação de genes que codificam ESAT-6 e CFP-10 resulta em baixo crescimento da micobactéria dentro de macrófagos. Eles isolaram um mutante do *M. marinum*, deficiente na secreção de ESAT-6 e CFP-10 e infectaram macrófagos de camundongos. Posteriormente analisaram a maturação do fagossomo nesses macrófagos e verificaram que enquanto o *M. marinum* original reside em um meio pouco acidificado, não lisossomal, o mutante foi encontrado em compartimento acidificado, sugerindo que essas duas proteínas podem ter um papel na prevenção da fusão do fagolisossomo, um mecanismo de escape da micobactéria para continuar sobrevivendo dentro dos fagócitos.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

Os antígenos ESAT-6 e CFP-10 são também usados em estudos de testes diagnósticos, como o Quantiferon RD1 (QFN-RD1) ou QFN-Gold que utilizam sangue total (Dogra et al. 2006). O princípio do método é detectar o IFN- $\gamma$  produzido por linfócitos T específicos a esses dois antígenos (Ravn et al. 2005, Mazurek et al. 2005, Taggart et al. 2006). Outro método é o ELISPOT- IFN- $\gamma$ , cujo princípio é contar as células que foram induzidas pelo ESAT-6 e CFP-10 a produzirem IFN- $\gamma$  (Goletti et al. 2006, Codecasa et al. 2006) (**Quadro 2**).

O antígeno HspX (Rv2031c), (do inglês *Heat shock protein*) é codificado na região gênica *Acr*. É uma proteína do choque térmico, com peso molecular de 16-kDa, também conhecida como proteína  $\alpha$ -cristalina. Yuan et al. (1998) observaram a produção de HspX pelo *M. tuberculosis* em modelo experimental usando macrófagos infectados, demonstrando que micobactérias deficientes do gene *Acr* possuem uma redução no seu crescimento dentro desses macrófagos. Outro trabalho também mostra que a produção de HspX é aumentada quando a bactéria está em estágio “estacionário” de crescimento, quando há condições desfavoráveis para a replicação (hipoxia e diminuição de nutrientes), como na fase latente, sugerindo que essa proteína atue nos mecanismos de adaptação e sobrevivência dos bacilos (Mayuri et al. 2002). O HspX tem ação também de chaperonina, auxiliando na conformação final das proteínas (Qamra et al. 2005). Na infecção humana, esse antígeno é encontrado na fase latente, desencadeando tanto resposta celular como humoral (Demissie et al. 2006). Assim, é usado como marcador de fase latente e crônica da tuberculose em pesquisa de testes diagnósticos.

O GlcB (Rv1837c) é um antígeno protéico codificado pelo gen *GlcB* (também denominado *aceB*) do *M. tuberculosis* e *M. leprae*. É uma enzima malato sintetase G (MSG), monomérica de 80-kDa, homóloga a malato sintetase (AceB) da bactéria *Corynebacterium glutamicum* e da enzima (MSG) da bactéria *Escherichia coli*. O GlcB é uma enzima que utiliza a via glioxalato, permitindo que a bactéria assimile o composto carbono, necessário para sua replicação dentro do macrófago (Munoz-Elias & McKinney 2005). Recentemente, foi levantada a hipótese de que essa enzima produzida pelo *M. tuberculosis* exerça função de adesão. A malato

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

sintetase foi encontrada na superfície de bacilos intactos e acredita-se que haja ligação entre o GlcB e a laminina e a fibronectina das células epiteliais do pulmão, através do seu domínio C terminal (único na malato sintetase produzida pelo *M. tuberculosis*) (Kinhikar et al. 2006). Devido sua importância para o estabelecimento e a persistência da infecção pelo *M. tuberculosis*, o GlcB parece ser um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes inibidores dessa enzima, principalmente tendo-se em mente que o desenvolvimento de drogas que atuem nas vias de persistência da infecção é fundamental na luta antituberculose (Smith et al. 2004). Em pesquisa é usado como candidato a marcador da tuberculose, sendo já testado para o sorodiagnóstico de pacientes com tuberculose, co-infectados com HIV ou não (Singh et al. 2005) (**Quadro 1**).

O Complexo antigênico 85 (Ag 85) é composto por três proteínas secretadas: Ag 85A (Rv3804c), Ag 85B (Rv1886c) e Ag 85C (Rv0129c), codificadas pelos genes *FbpA*, *FbpB* e *FbpC2* respectivamente, com peso molecular entre 30 a 32-kDa. Possuem atividade micolil transferase, participando da síntese do ácido micólico, que constitui a parede celular da bactéria, contribuindo para a manutenção da integridade da parede e a patogênese da tuberculose. A inibição da transcrição dos componentes do complexo Ag 85 parece reduzir o crescimento do *M. tuberculosis* em cultura (Harth et al. 2002). A deleção do gene que codifica o Ag 85A resulta em diminuição da replicação da micobactéria dentro de macrófagos *in vitro* (Armitige et al. 2000). Há um trabalho sobre a inibição da atividade micoliltransferase dos três membros do complexo, resultando em bloqueio do crescimento da bactéria e demonstrando sua importância no desenvolvimento de novas drogas contra a tuberculose (Belisle et al. 1997). Devido as suas características imunodominantes, apresentam-se como candidatos promissores à nova vacina, sendo usados em inúmeros experimentos. Em camundongos foi testada uma vacina BCG recombinante, contendo Ag 85A que estimula grande expressão de IFN- $\gamma$  e IgG2a, caracterizando a resposta Th1 (Dhar et al. 2004). Outra vacina estudada envolve a fusão do ESAT-6 com o Ag 85B, já na fase do ensaio clínico de testes em primatas não humanos. No entanto, para implementação dessa vacina em programas de vacinação, é preciso entender as

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

falhas no mecanismo de proteção da atual BCG a fim de aperfeiçoar a ação da nova vacina (Dietrich et al. 2006). O complexo Ag 85 também tem sido explorado no seu uso como candidato ao diagnóstico da tuberculose (Raja et al. 2004, Kashyap et al. 2005) (**Quadro 1**).

O antígeno MPT-51 (Rv3803c) é uma proteí

Inúmeros outros antígenos protéicos do *M. tuberculosis* são encontrados na literatura. Antígenos como CFP-21, MPT-64, MPT-32, Ag 14-kDa, MPT-63, Hsp60, Ag 38-kDa e Ag 19-kDa (glicoprotéico) são testados isolados ou em multicomplexos para tentar aumentar a acurácia do diagnóstico (**Quadro 1**). Por exemplo, o trabalho de Wang et al. (2005) combinam os antígenos ESAT-6, CFP-21, MPT-63 e MPT-64 para teste de sorodiagnóstico da tuberculose em pacientes com a doença ativa. Na Venezuela, outro trabalho testa um sorodiagnóstico usando combinação de antígenos PPD, Ag 38-kDa e Hsp60 para diagnóstico da tuberculose em crianças (Araujo et al. 2004).

## **1.5. Resposta Imune ao *M. tuberculosis*.**

### **1.5.1. Resposta Inata.**

Diversos trabalhos são realizados na tentativa de elucidar melhor as etapas envolvidas nos mecanismos de proteção do hospedeiro para conter o bacilo da tuberculose, assim como definir os mecanismos de escape do bacilo a fim de manter sua sobrevivência.

Na infecção inicial, o hospedeiro ao inalar as gotículas contendo os bacilos, resiste a esses microorganismos através das barreiras físicas da nasofaringe, clearance mucociliar, secreção traqueobronquial e defesa celular inespecífica, mediada principalmente por células broncoepiteliais, macrófagos, neutrófilos e células NK. Contudo muitos bacilos do *M. tuberculosis* conseguem sobreviver e se multiplicar dentro das células apresentadoras de antígeno (APCs): as células dendríticas (DCs) e os macrófagos, gerando a tuberculose primária (Schlesinger 1996b).

Os macrófagos alveolares, tanto no homem como em camundongos, ao reconhecerem os PAMPs do *M. tuberculosis*, através de receptores PRRs, tornam-se

ativados e fagocitam os bacilos (Schlesinger 1996b, Nau et al. 2002). Há liberação pelos macrófagos de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 e quimiocinas como IL-8 e MIP-1 (do inglês *Macrophage Inflammatory Protein-1*), que estimulam o recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção (Takashima et al. 1990, Rhoades et al. 1995, Sadek et al. 1998). Os receptores de reconhecimento na superfície dos macrófagos alveolares são os receptores do complemento CR1, CR3 e CR4 que se ligam a fragmentos do C3, capazes de opsonizar antígenos do *M. tuberculosis* (Ferguson et al. 2004) e os receptores PRRs.

Os receptores PRRs são: receptores de manose que se ligam a glicolipídeos como LAM da parede celular do bacilo (Kang et al. 2005); receptores semelhantes ao Toll (TLR-2 e TLR-4), que reconhecem componentes do bacilo: lipoproteína de 19-kDa, LAM, e outros glicolipídeos (Nau et al. 2002, Quesniaux et al. 2004); receptores *scavenger* que reconhecem componentes de lipoproteína de baixo peso molecular (LDL), polissacarídeos e glicolipídeos. Outro receptor recentemente descrito é o NOD2 (do inglês *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2*), uma proteína intracelular, contendo repetições do aminoácido leucina, similares ao TLR, responsável pelo reconhecimento de peptidoglicanos de bactérias gram negativas e positivas. Ferwerda et al. (2005) em estudo *in vitro*, levantam a hipótese que o NOD2 pode ser um sistema independente, capaz de reconhecer componentes do *M. tuberculosis* dentro da célula fagocitária, de forma sinérgica com os receptores de Toll.

As DCs podem reconhecer o *M. tuberculosis*, via receptores de Toll (TLR) que interagem com PAMPs, de forma semelhante aos macrófagos. Um trabalho realizado com células humanas demonstra que as DCs ativadas aumentam a expressão de vários coestimuladores e de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (do inglês *Major Histocompatibility Complex*, MHC) na sua superfície. Ainda, essas células infectadas secretam quantidades elevadas de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  (Henderson et al. 1997). As DCs existem em diferentes estágios de maturação e ativação, caracterizados fenotipicamente por marcadores de superfície como CD11b, CD11c,

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

CD80, CD86, CD54, CD40, MHC de classe I e II, e por sua função. Enquanto as DCs imaturas são mais eficientes para capturar os antígenos, as DCs maduras exercem melhor a função de estimular linfócitos T, demonstrado em estudos usando precursores de DCs, derivados da medula óssea e estimulados com o *M. tuberculosis* (Latchumanan et al. 2002, 2005). As DCs à medida que migram para os linfonodos regionais vão amadurecendo e ao chegarem nos linfonodos, apresentam os antígenos processados aos linfócitos T virgens, via MHC (Humphreys et al. 2006). As DCs podem contribuir na regulação da resposta imune, induzindo resposta Th1, pela liberação IL-12. Essa resposta celular induzida por DCs parece favorecer a evasão das micobactérias para outras células, provavelmente por lise dos macrófagos infectados, com liberação de bacilos vivos e mortos, que poderão ser engolfados pelas DCs. Com a migração das DCs para os órgãos linfóides secundários, pode haver disseminação das micobactérias para esses órgãos (Latchumanan et al. 2005).

O *M. tuberculosis* desenvolveu vários mecanismos de escape, para conseguir sobreviver e replicar dentro das células: para evitar a ação dos macrófagos, componentes do bacilo como a lipoproteína de 19-kDa, via TLR2, inibe a sinalização de IFN- $\gamma$  em macrófagos humanos, resultando em diminuição da expressão de MHC de classe II e conseqüentemente inibição da apresentação de antígenos micobacterianos aos linfócitos T (Noss et al. 2001, Gehring et al. 2003); A LAM inibe a ação dos compostos intermediários de formas reativas do oxigênio e diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias (Briken et al. 2004); As micobactérias podem também induzir a liberação de fatores supressores da resposta imune pelos macrófagos como TGF- $\beta$  e IL-10, porém sua maior habilidade é deter o processo de maturação do fagossomo, bloqueando a ação da bomba de próton e impedindo assim a acidificação do meio, que é requerida para a fusão do fagossoma com o lisossoma. Deste modo o bacilo permanece num meio intracelular não acidificado (Ting et al. 1999, Geijtenbeek et al. 2003, Stewart et al. 2005).

As células NK reconhecem anticorpos IgG opsonizando antígenos na superfície de células alvo. Pesquisas do papel das células NK e NKT na resposta inata contra o bacilo da tuberculose, realizados com camundongos infectados,

mostraram que essas células respondem rapidamente ao modelo de infecção gerado por antígenos da parede celular do *M. tuberculosis*, tornando-se efectoras, (Apostolou et al. 1999, Junqueira-Kipnis et al. 2003). No entanto, embora as células NK e NKT sejam detectadas no início da resposta inata, elas não constituem o principal mecanismo protetor contra a tuberculose.

Acredita-se que os mecanismos pelos quais as células NK destroem as células alvo infectadas pelo *M. tuberculosis* sejam por liberação de grânulos citotóxicos, as perforinas e por induzir as células alvo a entrarem em apoptose, como foi observado no modelo experimental em camundongo realizado por Junqueira-Kipnis et al. (2003). Já outro trabalho realizado *in vitro* com células humanas, demonstra que os macrófagos infectados com os bacilos são mortos por ação das células NK e esse mecanismo parece ocorrer por apoptose e não por ação dos grânulos citotóxicos (Brill et al. 2001). Esse fenômeno ocorre porque as células NK possuem em sua superfície receptores indutores da apoptose, capazes de se ligarem às células alvo e sinalizar para que se inicie a apoptose. Entretanto, o mecanismo de morte celular ainda não está bem definido, embora haja evidências sugerindo que a via Fas-FasL seja usada nesse processo (Oshimi et al. 1996).

### **1.5.2. Resposta Celular.**

Os linfócitos T  $\gamma\delta$  respondem ao patógeno tanto na resposta imune inata como na adquirida e influenciam no desenvolvimento do granuloma. Esses linfócitos podem reconhecer antígenos do *M. tuberculosis*, não dependendo da apresentação pela via clássica de moléculas MHC, mas através da proteína CD1 (Ulrichs & Porcelli 2000). Em experimento realizado em camundongos infectados por *M. avium*, nocautes em linfócitos T  $\gamma\delta$  observa-se uma diminuição do recrutamento de neutrófilos e da inflamação no pulmão destes animais (Saunders et al. 1998). Estudando trabalhadores da saúde e contatos de pacientes tuberculosos, Ordway et al. (2005b) sugeriram que aqueles que desenvolvem a doença ativa, mostram um

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de Antígenos do *M. tuberculosis* por Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

mecanismo compensatório na fase inicial da doença, envolvendo um aumento da resposta citolítica liderada pelos linfócitos T  $\gamma\delta$ , porém essas células não conseguem por si só proteger o indivíduo de desenvolver a infecção.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos protéicos do *M. tuberculosis*, que foram processados no citosol e apresentados via moléculas MHC de classe I. Ao tornarem-se ativados, exercem ação citolítica nas células alvo infectadas pelo bacilo, por mecanismos semelhantes aos das células NK, com liberação de perforina ou por via CD95-FasL, sinalizando para apoptose das células alvo (Brookes et al. 2003). Alguns estudos com modelos animais em camundongos e com células humanas *in vitro* têm mostrado que, inicialmente os linfócitos T CD8<sup>+</sup> produzem pequenas quantidades de IFN- $\gamma$ . Com a cronificação da infecção, a produção de IFN- $\gamma$  aumenta, contrastando com os efeitos citotóxicos dessas células, maiores na fase inicial da resposta, mas não na fase crônica, embora a habilidade de sintetizar perforina esteja intacta. O entendimento dessa perda de função citotóxica ainda permanece obscuro (De La Barrera et al. 2003, Lazarevic et al. 2005).

Embora todos os linfócitos T  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  estejam envolvidos na defesa contra o *M. tuberculosis*, as células efetoras essenciais são os linfócitos T CD4<sup>+</sup> $\alpha\beta$ . Saunders et al. (2002), em estudo de animais infectados com o bacilo, nocautes de CD4, comprovaram a importância de células CD4, na amplificação da resposta protetora do hospedeiro, pela ativação de células efetoras e recrutamento leucocitário para o sítio da infecção.

Estudos sobre as funções dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> contra diversas doenças humanas mostram que os linfócitos T podem ser classificados fenotipicamente em subpopulações, derivadas de células Th precursoras (do inglês *T helper*). Essas células sofrem diferenciação, dependendo das citocinas secretadas no meio em: células Th0 quando IL-2 presente, células Th1 sob ação de IL-12, resultando em resposta imune celular e células Th2 quando IL-4 encontra-se presente, resultando em resposta imune humoral (Liew 2002). As células Th1 são caracterizadas por sua habilidade em produzir citocinas como o IFN- $\gamma$  que atuam sobre macrófagos e monócitos, e IL-2 que age na proliferação de linfócitos T. As células Th2 produzem

citocinas como a IL-4, IL-5 e IL-10 que levam a ativação de linfócitos B para secreção de imunoglobulinas (Bass et al. 1989, Herring et al. 2004). Uma pesquisa com camundongos mostra a importância do IFN- $\gamma$  na resposta protetora do hospedeiro. Esses animais, com deleção do gen para IFN- $\gamma$  foram incapazes de conter e controlar a infecção causada pelo *M. tuberculosis*. Foi observado um aumento do número de bacilos e ampliação da lesão com necrose (Cooper et al. 1993).

Já Surcel et al. (1994) estudando a proliferação de linfócito T e citocinas no sangue periférico de pacientes com tuberculose ativa, observaram que há um aumento de IL-4, mas não de IFN- $\gamma$  em resposta a estimulação, sugerindo então uma resposta tipo Th2 nos pacientes. Outro trabalho confirma essa hipótese, reportando que a detecção de IL-4, em um grande número de bovinos infectados pelo *M. bovis*, está associada com o avanço da imunopatologia da doença (Rhodes et al. 2000).

### **1.5.3. Resposta Humoral.**

A importância dos linfócitos B na tuberculose não está bem elucidada (Vordermeier et al. 1996, Bosio et al. 2000). Enquanto o trabalho de Welsh et al. (2005) indica que o aumento da resposta humoral está associado com a progressão e severidade da doença, pois acompanhando a evolução da infecção bovina causada pelo *M. bovis*, observaram uma diminuição da secreção de IFN- $\gamma$  com depressão da resposta celular, elevação da expressão de IL-10 e aumento da resposta humoral na fase mais severa da doença. Outro trabalho sugere que a presença de agregados de linfócitos B nos granulomas, em camundongo e em tecido humano, pode estar associada à proteção contra a tuberculose (Tsai et al. 2006).

Anticorpos séricos, que reconhecem especificamente antígenos provenientes do *M. tuberculosis*, também estão presentes nos indivíduos que entraram em contato com o bacilo e podem ser usados como marcadores da tuberculose (Greenaway et al. 2005). As pesquisas indicam que o perfil de anticorpos, que reconhecem especificamente os antígenos das micobactérias, é alterado com a progressão da

doença, sugerindo que esses microorganismos secretam proteínas antigênicas diferentes nas formas distintas da doença pulmonar: primária, latente, cavitária e não cavitária e mesmo na extra-pulmonar (Lyashchenko et al. 1998a, Singh et al. 2005). Há também a hipótese de que a secreção desses antígenos pode ser diferenciada entre grupos e populações infectadas, como observado em pacientes coinfectados com o vírus HIV (Lyashchenko et al. 1998b, Colangeli et al. 1999). Um papel importante desempenhado pelos anticorpos é o clearance de antígenos e produtos do *M. tuberculosis* liberados no sítio da infecção. Um estudo sobre a cinética de distribuição de LAM administrada em camundongos, demonstra que a LAM se liga a IgM especificamente, contribuindo para a excreção hepatobiliar deste produto (Glatman-Freedman et al. 2000).

#### ***1.5.4. Principais Citocinas Envolvidas na Resposta Imune à Tuberculose.***

Várias citocinas estão envolvidas na resposta imune contra o bacilo da tuberculose. As citocinas pró-inflamatórias normalmente compartilham atividades biológicas na estimulação de células de origem hematopoiética e linfóides. Enquanto outras agem na regulação da resposta inflamatória.

A IL-12 produzida pelas APCs, em modelo experimental, estimula as células T e NK efectoras, a secretarem IFN- $\gamma$ , que agem sobre as APCs, recrutando mais células mononucleares para formação do granuloma e aumentando a expressão de MHC e de moléculas co-estimuladoras na superfície dessas células (Cooper et al. 1997). Outras citocinas agem sinergicamente com a IL-12, na sinalização de linfócitos T para produzirem IFN- $\gamma$ . Esse fenômeno foi mostrado usando camundongos nocautes para IL-12 e IL-18 simultaneamente, onde observou-se que a ausência dessas citocinas não impediu a resposta imune mediada por IFN- $\gamma$  (Kawakami et al. 2004). A IL-23 é uma dessas citocinas que age de forma sinérgica a IL-12, contudo não contribui substancialmente para resistência do hospedeiro, quando a IL-12 está presente (Chackerian et al. 2006).

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

O receptor de IL-12 (IL-12R $\beta$ 1) tem ganhado destaque nos últimos anos, com a hipótese de que seu polimorfismo gênico pode contribuir para o aumento da susceptibilidade a várias doenças, incluindo a tuberculose (Akahoshi et al. 2003, Remus et al. 2004). Há indicações que variações genéticas nesse receptor podem predispor alguns indivíduos à tuberculose, por diminuição da ligação de IL-12 e de IL-23, que também compartilha o receptor IL-12R $\beta$ 1, resultando em disfunção parcial de IFN- $\gamma$  (Remus et al. 2004, Lee et al. 2005).

O TNF- $\alpha$  é essencial para a proteção contra o bacilo na formação e manutenção do granuloma. Camundongos nocautes em TNF- $\alpha$  infectados via aerosol pelo *M. tuberculosis* são susceptíveis a infecção, gerando uma formação deficiente do granuloma e necrose exarcebada no pulmão, embora desenvolvam resposta celular normal contra o bacilo. Acredita-se que há uma correlação entre a produção de TNF- $\alpha$  e a liberação de óxido nítrico (Bean et al. 1999, Sharma et al. 2004). Um estudo envolvendo genética humana sugere que variações no gene do TNF- $\alpha$  em combinação com o gene HLA podem levar um aumento na susceptibilidade à tuberculose, levantando a hipótese da importância do TNF- $\alpha$  na proteção contra a TB (Selvaraj et al. 2001).

A IL-10 deve também ser destacada na resposta às micobactérias. Pode ser produzida por macrófagos e DCs ativadas. De uma maneira genérica, a IL-10 modula negativamente a resposta inflamatória e impede a proliferação de células T. Além de regular negativamente a produção de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e NO (de Waal Malefyt et al. 1993). Esta modulação da resposta inflamatória envolve vários aspectos, dentre eles a diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias e moléculas MHC em células APCs (Koppelman et al. 1997). Camundongos deficientes em IL-10, infectados com *M. bovis*, apresentam resistência maior à tuberculose (Murray & Young 1999). Jacobs et al. (2002) confirmam esses resultados, porém os camundongos não tiveram aumento de IFN- $\gamma$ , sugerindo que outro mecanismo foi responsável pela resistência à doença. Turner et al. (2002) acompanharam a evolução da tuberculose em camundongos alterados geneticamente, para produzirem constitutivamente IL-10. Eles observaram que esses animais não tiveram aumento da

susceptibilidade à doença durante o estágio inicial da infecção, mas no estágio crônico da tuberculose, onde apresentaram reação exarcebada com aumento do número de bacilos no pulmão, recrutamento maior de macrófagos e decréscimo de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ . Já outro trabalho usando camundongos com alteração genética ligada ao cromossomo X, mostra que apesar do aumento de IL-10 e maior susceptibilidade nos estágios iniciais da doença, na fase crônica esses animais controlam a infecção como os animais controle (Junqueira-Kipnis et al. 2005).

O IFN- $\gamma$  secretado pelos linfócitos T, tem ação na ativação dos macrófagos infectados e no recrutamento de outras células mononucleares para o sítio da infecção para formação do granuloma. Camundongos depletados no gene para IFN- $\gamma$  falham na ativação de macrófagos e em conter o crescimento do bacilo (Flynn et al. 1993). O papel do IFN- $\gamma$  e seus receptores na tuberculose humana têm sido estudados, e parece que alterações genéticas na região promotora do receptor-1 (IFNGR1) podem estar associadas com a susceptibilidade à doença. No entanto esta hipótese precisa ser melhor elucidada (Bulat-Kardum et al. 2006).

A IL-6 é requerida para indução de resposta celular ao bacilo, estimulando produção de IFN- $\gamma$  no início da infecção. Camundongos nocautes em IL-6, quando infectados com *M. tuberculosis*, apresentam diminuição da secreção de IFN- $\gamma$ , mas conseguem controlar o crescimento bacteriano no pulmão, sugerindo ação sinérgica de outras citocinas no local (Saunders et al. 2000).

A IL-2 e IL-15 estão envolvidas na resposta imune contra o bacilo da tuberculose. Elas atuam na ativação de células NK para produção de IFN- $\gamma$  (Becknell & Caligiuri 2005, Rausch et al. 2006).

A IL-4 é produzida por todos os subgrupos de células T e tem a função principal de direcionar a resposta imune para Th2. Está aumentada na fase crônica da tuberculose (Ordway et al. 2005a).

## **1.6. Diagnóstico da Tuberculose.**

### ***1.6.1. Testes Diagnósticos em Uso.***

Todos os pacientes com os sintomas clínicos clássicos da tuberculose: tosse persistente com expectoração ou não por mais de duas semanas, febre vespertina, sudorese noturna, dor torácica, dispnéia, emagrecimento e hemoptise devem ser investigados quanto à ocorrência de tuberculose. Os exames laboratoriais para diagnóstico incluem baciloscopia e cultura do escarro ou lavado broncoalveolar, radiografia do tórax e teste tuberculínico (Ministério da Saúde 2002).

A pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) no escarro é muito útil no diagnóstico da tuberculose pulmonar. Porém, muitos trabalhos mostram que há oscilação na sensibilidade desse teste, de acordo com a apresentação da doença, entre 30 a 80%, com valor preditivo positivo variando entre 73 a 98%, quando comparados com o teste padrão ouro, que é a cultura do bacilo feito com o material biológico infectado (Nelson et al. 1998, Craft et al. 2000). No entanto, a cultura apresenta a desvantagem de ser uma técnica com resultado demorado, devido ao crescimento lento do bacilo, variando de três a oito semanas e a sensibilidade do teste também oscila entre 30 a 85% dependendo dentre outras causas, das lesões pulmonares apresentadas (Walton et al. 2005).

A radiografia do tórax é usada na avaliação da evolução da tuberculose pulmonar em resposta ao tratamento e na exclusão de outra doença pulmonar. Trabalhos anteriores mostram que a radiografia apresenta baixa especificidade, em torno de 65%, variando conforme a lesão apresentada. Tanto a especificidade como a sensibilidade aumenta nas avaliações radiológicas quando se evidencia lesão cavitária (Graham et al. 2002, van Cleeff et al. 2005).

O teste de mantoux, tuberculínico ou comumente denominado no Brasil de PPD é um teste de hipersensibilidade tardia, utilizado para diagnosticar a tuberculose infecção e ponderar a instituição de quimioprofilaxia em indivíduos com resultados positivos, principalmente se forem pessoas com alto risco de desenvolver a doença, como os imunocomprometidos. É um diagnóstico auxiliar em crianças suspeitas de estarem com tuberculose, uma vez que elas normalmente não são bacilíferas

(apresentam baciloscopia negativa) e em indivíduos com formas extra-pulmonares. O PPD é uma ferramenta complementar nos programas de tuberculose, pois avalia vacinação com BCG e medidas a serem adotadas no combate dessa doença. Assim, resultados falso-positivos são esperados em indivíduos que foram vacinados nos últimos 10 anos (Farhat et al. 2006). Embora possam ocorrer também resultados falso-negativos em indivíduos imunossuprimidos, como os portadores do HIV e indivíduos parasitados por helmintos (el-Kalouby et al. 1979, Yusuph et al. 2005).

#### ***1.6.2. Testes Sorológicos Usados em Pesquisa para Diagnóstico.***

Devido à gravidade da tuberculose são necessárias novas ferramentas para o combate dessa doença, principalmente medidas que visem um rápido diagnóstico e tratamento eficaz. Alguns métodos pesquisados podem ser testes promissores para o diagnóstico de triagem e monitoramento da tuberculose, principalmente em regiões endêmicas, auxiliando o diagnóstico em crianças, pacientes não bacilíferos, pacientes com tuberculose extra-pulmonar e aqueles com alto risco de desenvolver a doença. Desse modo, muitos antígenos protéicos secretados pelo *M. tuberculosis* estão sendo estudados como marcadores em testes sorológicos.

O teste de ELISA (ensaio imunoenzimático) indireto baseia-se na utilização de antígenos expressos em grande quantidade pelo *M. tuberculosis* H37Rv, purificados por técnicas especiais, onde são testados quanto à presença de anticorpos específicos, nos soros de indivíduos com tuberculose ativa e de seus contatos. Esses ensaios incluem a dosagem de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA, na tentativa de avaliar qual ou quais anticorpos são secretados nas diferentes fases da doença, que possam caracterizar a tuberculose. As pesquisas têm sugerido que os antígenos de baixo peso molecular apresentam melhor imunodominância (Sable et al. 2005a), tais como o CFP-10, CFP-21, MPT-51, ESAT-6, MPT-63, MPT-64, GlcB, GroES, HspX e o Antígeno 85 entre outros.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

Os ensaios de ELISA são um dos testes mais estudados, pelas vantagens apresentadas como baixo custo, fácil manuseio e adaptação da metodologia (manual e automação). Singh et al. (2003) testaram um ensaio de ELISA, avaliando a resposta humoral a dois antígenos: MPT-32 e GlcB de pacientes com tuberculose ativa, diagnosticados pela baciloscopia. A sensibilidade do teste foi 68,0% (MPT-32) e 75,0% (GlcB). Conde et al. (2004) recrutaram pacientes com doença ativa e contatos para avaliação sérica de IgA e IgG contra o antígeno P-90 e observaram que IgA, apresentou sensibilidade (74,0%) e especificidade (68,0%) maiores no teste, do que para IgG, sensibilidade de 69,0% e especificidade 64,0%. No entanto para os dois anticorpos houve resultados falso-positivos no grupo dos controles saudáveis. Já Raja et al. (2004) usaram o ensaio ELISA para avaliar o reconhecimento do antígeno 85B (Ag 30-kDa) por anticorpos séricos da classe IgG, IgA e IgM, de indivíduos com tuberculose. A sensibilidade do teste foi 67,4% para IgG, 14,8% para IgA e 14,3% para IgM, e especificidade de 99%, 96,7% e 92,0% respectivamente (**Quadro 1**).

Em outro trabalho, Wang et al. (2005) mostraram a resposta do anticorpo IgM aos antígenos CFP-21, ESAT-6, MPT-63 e MPT-64, obtendo sensibilidade de 34,6%, 60,3%, 52,6%, 78,2% respectivamente e para o anticorpo IgG foi 46,2%, 64,1%, 93,6%, 57,7%. Quando o ensaio ELISA foi realizado com todos os antígenos associados esta porcentagem aumentou para 96,2% (IgM) e 84,6% (IgG), sugerindo que a combinação de um ou mais antígenos pode aumentar a acurácia do teste (**Quadro 1**).

Uma pesquisa envolvendo o uso dos antígenos MPT-51 e GlcB na dosagem de IgG sérico de pacientes com HIV co-infectados com tuberculose, demonstra que 79,0% reconhecem o GlcB e 92,0% o MPT-51. Para pacientes com TB<sup>+</sup>/HIV<sup>-</sup> a sensibilidade foi 70,0% (GlcB) e 60,0% (MPT-51). Quando se associa os antígenos, a sensibilidade aumenta para 83,0% (Singh et al. 2005). O trabalho de Achkar et al. (2006) avalia a presença de anticorpos específicos aos antígenos MPT-51 e GlcB em pacientes com TB, diagnosticados por cultura positiva. A sensibilidade e especificidade para os dois antígenos testados foi 58,0% e 98,0% respectivamente (**Quadro 1**).

Ainda, outro estudo utiliza o ensaio de ELISA, para analisar o perfil de várias subclasses de IgG específicos ao antígeno ES-31 em diferentes pacientes com tuberculose. Os resultados mostram que na tuberculose ativa os anticorpos IgG1 e IgG3 específicos a essa serina protease estão aumentados, sugerindo seu uso como marcador de doença ativa (Gupta et al. 2005).

A imunocromatografia é também um teste sorológico rápido que pesquisa anticorpos específicos para antígenos do *M. tuberculosis*, porém apresenta a desvantagem do custo elevado. Um teste de imunocromatografia, que está na fase III do ensaio clínico para uso comercial, detecta anticorpos IgG contra antígenos do *M. tuberculosis*, usando sangue total, plasma e soro. Os melhores resultados foram obtidos na dosagem realizada no soro, onde a sensibilidade do teste foi de 65,0% e especificidade de 67,0% (Gounder et al. 2002). Outro trabalho realizado recentemente, usa cinco antígenos incluindo o antígeno 38-kDa. A sensibilidade e especificidade desse teste em estudos prévios com soro de pacientes com tuberculose pulmonar da Turquia foram 33,3% e 100% respectivamente, comparado com a pesquisa de BAAR no escarro (Ongut et al. 2006) (**Quadro 1**).

**Quadro 1. Sensibilidade e especificidade dos testes ELISA e Imunocromatografia usados em pesquisa.**

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.

Teste	Teste padrão	Antígeno	Anticorpo	Sensibilidade %	Especificidade %	Referência
ELISA	BAAR	MPT-32	IgG	68,0	ND*	Sing et al 2003
	BAAR	GlcB	IgG	75,0	95,0	Sing et al 2003
	Cultura	P-90	IgA IgG	74,0 69,0	68,0 64,0	Conde et al 2004
	Cultura	Ag 85B	IgG IgA IgM	67,4 14,8 14,3	99,0 96,7 92,0	Raja et al 2004
	Cultura	CFP-21	IgG IgM	46,2 34,6	100,0 100,0	Wang et al 2005
	Cultura	ESAT-6	IgG IgM	64,1 60,3	100,0 100,0	Wang et al 2005
	Cultura	MPT-63	IgG IgM	93,6 52,6	100,0 100,0	Wang et al 2005
	Cultura	MPT-64	IgG IgM	57,7 78,2	100,0 100,0	Wang et al 2005
	Cultura	MPT-51	IgG	60,0	ND	Sing et al 2005
	Cultura	GlcB	IgG	70,0	ND	Sing et al 2005
	Cultura	MPT-51	IgG	58,0	98,0	Achkar et al 2006
	Cultura	GlcB	IgG	58,0	98,0	Achkar et al 2006
	IMUNOCRO MATOGRAFIA	Cultura	5 ags	IgG	65,0	67,0
BAAR		4 ags+38kDa	IgG	33,3	100,0	Ongut et al 2006

\* ND = não declarado

Já o QuantiFERON-TB é um teste comercial, que avalia a produção de IFN- $\gamma$ , liberado pelos linfócitos T, após estímulo com o PPD. Muito usado em países de baixa endemia, no entanto, em países endêmicos, onde há maior exposição aos bacilos, a porcentagem de falso-positivos pode ser elevada. O QuantiFERON-TB Gold ou QuantiFERON-RD1 substituiu o QuantiFERON-TB, usando os antígenos ESAT-6 e CFP-10, codificados na região RD-1 do genoma do *M. tuberculosis*, e não o PPD, na tentativa de eliminar os resultados falso-positivos em pacientes vacinados com BCG. Tem sido considerado um teste promissor, em países não endêmicos. A proposta é identificar formas latentes da tuberculose, possuindo uma sensibilidade acima de 80,0%, no entanto possuem a desvantagem de terem um custo elevado (Ravn et al. 2005, Dogra et al. 2006) (**Quadro 2**).

Outra pesquisa compara o QuantiFERON-TB com o ELISA, mostrando resultados de melhor especificidade, em relação ao teste tuberculínico, entretanto a

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.

porcentagem de indeterminados e positivos foram diferentes entre os dois testes (Ferrara et al. 2006).

O teste ELISPOT (do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSPOT*) permite quantificar o número de células, que secretam uma determinada citocina ou anticorpo a partir de uma suspensão celular, estimulada com antígenos, e marcadas especificamente (SPOTs). A avaliação da cinética de células produtoras de anticorpos (plasmócitos) específicos ao bacilo durante o tratamento da tuberculose, demonstrou que houve um rápido decréscimo dessas células (SPOTs), logo no início da terapia sugerindo seu uso para monitorar a terapêutica, embora seja um teste de custo elevado (Sousa et al. 2000).

Goletti et al. (2006) utilizam o ELISPOT para avaliar o IFN- $\gamma$  secretado em resposta ao ESAT-6 e CFP-10 em amostras de pacientes com tuberculose ativa. Os resultados foram comparados com outros testes comerciais: o QuantiFERON-TB Gold e o T SPOT-TB (que também usam ESAT-6/CFP-10). A sensibilidade do ELISPOT foi de 70,0% e a especificidade foi de 91,0% (**Quadro 2**).

**Quadro 2. Sensibilidade e especificidade dos testes ELISPOT e Quantiferon- RD1 usados em pesquisa.**

Teste	Teste padrão	Antígeno	Sensibilidade %	Especificidade %	Referência
ELISPOT	QFN-GOLD* T SPOT-TB	CFP-10/ ESAT-6	70,0	91,0	Goletti et al 2006
QUANTIFERON RD1	Cultura BAAR	CFP-10/ ESAT-6	85,0	97,0	Ravn et al 2005
	PPD	CFP-10/ ESAT-6	95,0	ND**	Dogra et al 2006

\* QFN-GOLD = Quantiferon-RD1 ou GOLD, usam os antígenos ESAT-6 e CFP-10.

\*\* ND = não declarado

### 1.7. Tratamento.

O tratamento da tuberculose é padronizado por cada país, seguindo as normas de recomendação da OMS. No Brasil, o Ministério da Saúde normatizou a distribuição das medicações pelo sistema de saúde, através de seus postos municipais

de atendimento. O tratamento inicial é o esquema I, sendo adotados três medicações: rifampicina (R), isoniazida (H) e pirazinamida (Z). Esse esquema deve ser mantido por 6 meses, de forma regular, todos os dias. Em casos especiais, o esquema terapêutico proposto pode ser mais longo. Nos primeiros dois meses, são utilizadas as três medicações juntas. Já nos últimos quatro meses, passa-se a usar apenas a rifampicina associada à isoniazida. O motivo da utilização de mais de uma medicação contra o mesmo germe é que a taxa de resistência do microorganismo a este esquema tríplice é baixa, assim os medicamentos agem em lugares diferentes, de maneira sinérgica. No caso de gestação, o tratamento não deve ser alterado (Ministério da Saúde 2002).

Além do esquema de tratamento RHZ, existem outros esquemas (**Quadro 3**), utilizados nos casos de falência do esquema I, que pode ocorrer por multi-resistência às drogas desse esquema, resultando em aumento do tempo de tratamento e combinação de outras drogas. Infelizmente o número de casos de pacientes com bacilos multi-resistentes tem aumentado, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas drogas (Lalloo et al. 2006).

A profilaxia ainda é feita pela vacina de BCG, constituída por uma cepa avirulenta do *M. bovis*, variando os esquemas de vacinação de acordo com a taxa de incidência da tuberculose. É uma vacina segura, administrada em recém-nascidos, estimulando uma memória imunológica protetora de longa duração. Contudo, muitos estudos mostram que os níveis de proteção desta vacina, em populações diferentes, variam de 0 a 80% (Andersen & Doherty 2005). No Brasil, um estudo realizado sobre a situação da BCG conclui que aqui também há uma variabilidade na proteção, principalmente após dez anos de imunização (Barreto et al. 2005). A vacina BCG foi originalmente desenvolvida com administração via oral e posteriormente foi usada a via intradérmica. Em nosso país foi usada a administração oral da BCG até os anos 70.

Atualmente, no Brasil, o Ministério da Saúde oferece a BCG na rotina aos recém-nascidos com peso maior ou igual a 2000g, crianças portadoras do HIV e PPD negativas, profissionais de saúde com PPD entre zero e nove milímetros e contatos domiciliares com hanseníase. A segunda dose, administrada desde 1994, em crianças

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.

em idade escolar (6 a 10 anos), foi suspensa a partir de junho de 2006. Essa determinação se deve aos achados sobre a baixa eficácia da segunda dose, observados no mundo todo, e confirmados aqui no Brasil, de que o reforço não oferece proteção adicional (Ministério da Saúde 2006, Dantas et al. 2006).

**Quadro 3. Esquemas de tratamento padronizados pelo Ministério da Saúde, com base na forma clínica e história de tratamento anterior.**

ESQUEMAS	ESQUEMA I ESQUEMA BÁSICO	ESQUEMA II * ESQUEMA MENINGO ENCEFÁLICO	ESQUEMA IR ESQUEMA DE REFORÇO	ESQUEMA III ESQUEMA DE FALÊNCIA DOS ESQ. I E IR
<b>DROGAS</b>	ISONIAZIDA RIFAMPICINA PIRAZINAMIDA	ISONIAZIDA RIFAMPICINA PIRAZINAMIDA	ISONIAZIDA RIFAMPICINA PIRAZINAMIDA ETAMBUTOL	PIRAZINAMIDA ETAMBUTOL ESTREPTOMICINA ETIONAMIDA
<b>TEMPO DE TERAPIA</b>	6 MESES	9 MESES	6 MESES	12 MESES

Fonte: Adaptado do Ministério da Saúde. Manual Técnico para o Controle da Tuberculose: caderno de Atenção Básica. M.S. Secretaria de políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. 6ª edição. Normas e Manuais Técnicos; 148: 1-70.

ISONIAZIDA (H)- inibe a síntese do ácido micólico.

RIFAMPICINA (R)- bloqueia a ação da RNA polimerase.

PIRAZINAMIDA (Z)- inibe a síntese de ácidos graxos.

ETAMBUTOL (E)- inibe a síntese de arabinogalactana e lipoarabinomanana.

ESTREPTOMICINA (S)- inibe a tradução do RNA mensageiro.

ETIONAMIDA (ET)- inibe a síntese do ácido micólico.

\*Esse esquema é associado com corticosteróides nos primeiros meses de tratamento.

## **2. JUSTIFICATIVA.**

No Brasil apesar dos esforços do Programa de Controle Nacional da Tuberculose, onde há cobertura vacinal em crianças menores de um ano em torno de 90%, a incidência da TB continua alta devido às falhas na execução e acompanhamento do tratamento dos doentes. O diagnóstico ocorre muitas vezes tardiamente, quando o doente já se encontra numa fase avançada, crônica da tuberculose, dificultando sua cura e contribuindo para a disseminação da doença. Em 2004 foi registrada em Goiás, uma taxa de 10,5% de óbitos e o percentual de cura de 72%, se encontra muito aquém das metas estabelecidas pelo Ministério da Saúde.

É preciso desenvolver novos testes diagnósticos, com marcadores específicos e de boa sensibilidade que poderão auxiliar os diagnósticos já existentes. Acredita-se que um teste capaz de discriminar a tuberculose, ainda nos estágios iniciais da doença, será de grande valia. O ensaio ELISA, devido ao seu custo baixo e ser de fácil execução, têm sido utilizados para caracterizar antígenos do *M. tuberculosis*, imunodominantes, para uso como marcadores da tuberculose. Nesse trabalho foi avaliado o reconhecimento dos antígenos recombinantes protéicos MPT-51 e GlcB do *M. tuberculosis*, por anticorpos específicos, da classe IgG e IgM, no soro de pacientes com tuberculose ativa, com a finalidade de serem usados no desenvolvimento de novos testes diagnósticos da tuberculose.

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1. Objetivo Geral.**

Avaliar o reconhecimento dos antígenos recombinantes MPT-51 (rMPT-51) e GlcB (rGlcB) do *M. tuberculosis* por anticorpos séricos de indivíduos com tuberculose ativa.

#### **3.2. Objetivos Específicos.**

Avaliar a imunogenicidade dos antígenos rMPT-51 e rGlcB, em indivíduos com TB ativa, pela detecção de anticorpos séricos específicos da classe IgM e IgG.

Determinar se anticorpos séricos IgG e IgM específicos ao rMPT-51 e ao rGlcB, de pacientes com tuberculose ativa, discriminam a doença quando comparados com os grupos: controle saudável e pacientes hansenianos, usando o ensaio de ELISA.

Investigar a viabilidade do uso dos antígenos rMPT-51 e rGlcB como marcadores da tuberculose em sorodiagnóstico, pelo ensaio ELISA.

Verificar os níveis séricos de anticorpos IgM e IgG específicos ao rMPT-51 e ao rGlcB antes e após o tratamento dos pacientes com TB (esquema I).

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

## **4. METODOLOGIA.**

### **4.1. População em Estudo.**

O estudo foi delineado para avaliação da imunogenicidade dos antígenos recombinantes MPT-51 e GlcB em pacientes com tuberculose pulmonar ativa, assim utilizou-se dois grupos de comparação, pareados por sexo e idade: controle saudável e pacientes hansenianos da forma Virchoviana. Os voluntários foram selecionados independentes do sexo, maiores de 18 e moradores do Estado de Goiás.

O tamanho da amostra foi determinado com base no teste padrão-ouro (cultura do bacilo), que apresenta sensibilidade oscilando entre 30 e 85%, dependendo das lesões pulmonares (Greenbaum et al. 1980, Levy et al. 1989) e ec0seledend comentea rsibili(adeientrum)78(editárae no testeELISAr)]TJ/Cs6 cs4 1 0 0scnJ16.275

do tórax sugestivo da doença. Os indivíduos com outras doenças crônicas e/ou imunossupressoras como a infecção pelo HIV, ou em uso de medicamentos supressores (corticóides), mulheres gestantes ou ainda aqueles que não tiveram diagnóstico confirmado foram excluídos.

#### **4.1.2. Controles Saudáveis.**

Esse grupo controle foi composto por voluntários saudáveis selecionados aleatoriamente na comunidade, moradores do estado de Goiás e que atenderam os critérios: teste tuberculínico (PPD) não reator, HIV soronegativo e sem manifestações de doenças crônicas ou parasitárias. Foram ainda excluídos aqueles em uso de medicamentos imunossupressores e mulheres gestantes. Esses voluntários foram selecionados de acordo com o sexo e a idade para pareamento ( $\pm 6$  anos) com os pacientes com tuberculose ativa.

#### **4.1.3. Pacientes com Hanseníase.**

Foram recrutados pacientes com hanseníase, admitidos para tratamento nas Unidades de Saúde Pública de Goiás: o Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad e o Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica. Os pacientes com hanseníase, em tratamento, portadores da forma Virchoviana foram incluídos no estudo, obedecendo aos critérios: diagnóstico clínico e/ou laboratorial para hanseníase (baciloscopia), sem evidências clínicas de outras doenças imunossupressoras, como HIV. Também foram pareados por sexo e idade com os pacientes tuberculosos.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, protocolo número: 002/05 datado de 26/01/2005 (**Anexo 3**). Antes da inclusão de cada voluntário nesse estudo, um total de 147, os objetivos do trabalho, os procedimentos para coleta de sangue, bem como outras informações foram fornecidas a todos os participantes, de forma escrita e verbal, para obter o consentimento mediante assinatura (**Anexo 1**).

#### **4.2. Coleta de Dados Clínicos e Epidemiológicos.**

Os dados dos participantes voluntários foram obtidos através de entrevista e dos prontuários dos pacientes. Foram coletados dados dos controles saudáveis referentes a sexo, idade, contatos com pacientes portadores de tuberculose, doença prévia, crônica ou outra no momento da coleta de sangue, realização do PPD e vacinação prévia com BCG. Para os pacientes com TB coletaram-se dados referentes a sexo, idade, forma da doença, tipo de lesão, esquema de tratamento e duração da terapia, evolução da doença, vacinação prévia com BCG e diagnóstico laboratorial. Para os pacientes hansenianos, coletaram-se dados referentes ao sexo, idade, forma e evolução da doença, diagnóstico, tratamento e vacinação com BCG (**Anexo 2**).

#### **4.3. Coleta das Amostras.**

Aproximadamente seis mililitros (mL) de sangue total, sem anticoagulante foram coletados de cada voluntário selecionado. A amostra foi identificada, processada e o soro separado por centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. Os soros foram alíquotados e armazenados a -20°C até o momento do uso. Em 11 pacientes com TB foram coletadas duas amostras de sangue: antes e após o tratamento de seis meses.

#### **4.4. Antígenos Recombinantes.**

Os antígenos recombinantes protéicos: MPT-51 e GlcB do *M. tuberculosis*, foram produzidos em *E. coli*, pelo laboratório de pesquisa na Universidade Estadual do Colorado (CSU) e fornecidos ao Laboratório de Imunopatologia e Doenças Infecciosas, mediante convênio firmado com a Universidade Federal de Goiás, contrato número NO1-AI-75320.

#### **4.5. Anticorpos (conjugados).**

Anti IgG: anticorpo monoclonal de coelho, anti-IgG humana conjugado com peroxidase (IgG-HRP, BIO-RAD) diluído 1/15000 para uso no teste de ELISA indireto.

Anti IgM: anticorpo monoclonal de cabra, anti-IgM humana conjugado com peroxidase (IgM-HRP, ZYMED) diluído 1/5000 para uso no teste de ELISA indireto.

#### **4.6. Ensaio Imuno Enzimático (ELISA).**

##### ***4.6.1. ELISA Indireto para Detecção de IgG Sérica.***

Inicialmente foram depositados em cada poço das placas de poliestireno (Placas de 96 poços NUNC-immunoplate), para adsorção, 50 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) do antígeno MPT-51 ou GlcB, na concentração de 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em tampão 0,015 M carbonato-bicarbonato, pH 9,6 e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, foi removido o conteúdo dos poços e acrescentados 100  $\mu\text{L}$  de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, leite desnatado 1% e as placas foram mantidas a 37°C por 2 horas em câmara úmida para bloqueio. As placas foram lavadas uma vez com tampão fosfato salina (PBS) pH 7,3. Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de cada

Mestrado - UFGO. 2007.

soro diluído 1/100 em tampão PBS pH 7,3, leite desnatado 0,05% nos orifícios e as placas incubadas a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Após esse período, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão PBS pH 7,3, contendo 0,05% de Tween 20 e acrescentados em cada orifício 50 µL de anticorpo de coelho, anti-IgG humana conjugado com peroxidase diluído 1/15000 em tampão PBS pH 7,3, leite desnatado 0,05% e mantidas a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Todo conteúdo dos poços foi removido e a placa novamente lavada cinco vezes com tampão PBS pH 7,3, contendo 0,05% de Tween 20. Em seguida, foram depositados em cada poço da placa 50 µL do substrato preparado com orto-fenilenodiamina na concentração de 5µg/mL e peróxido de hidrogênio 30 volumes diluídos em tampão citrato-fosfato pH 5,1. As placas foram então incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, longe da luz e a reação enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N (50 µL/orifício). A leitura das reações foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Thermo Labsystem-Multiskan).

#### **4.6.2. ELISA Indireto para Detecção de IgM Sérica.**

Foram depositados em cada poço das placas de poliestireno (Placas de 96 poços NUNC-immunoplate), para adsorção, 50 µL do antígeno MPT-51 ou GlcB, na concentração de 2,5 µg/mL em tampão 0,015 M carbonato-bicarbonato, pH 9,6 e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, foi removido o conteúdo dos poços e acrescentados 100 µL de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, leite desnatado 1% e as placas foram mantidas a 37°C por 2 horas em câmara úmida para bloqueio. As placas foram lavadas uma vez com tampão fosfato salina (PBS) pH 7,3. Em seguida foram adicionados 50 µL de cada soro diluído 1/10 em tampão PBS pH 7,3, leite desnatado 0,05% nos orifícios e as placas incubadas a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Após esse período, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão PBS pH 7,3, contendo 0,05% de Tween 20 e acrescentados em cada orifício 50 µL de anticorpo de cabra, anti-IgM humana conjugado com peroxidase diluído 1/5000 em

tampão PBS pH 7,3, leite desnatado 0,05% e mantidas a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Todo conteúdo dos poços foi removido e a placa novamente lavada cinco vezes com tampão PBS pH 7,3, contendo 0,05% de Tween 20. Em seguida, foram depositados em cada poço da placa 50 µL do substrato preparado com orto-fenilenodiamina na concentração de 5µg/mL e peróxido de hidrogênio 30 volumes diluídos em tampão citrato-fosfato pH 5,1. As placas foram então incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, longe da luz e a reação enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N (50 µL/orifício). A leitura das reações foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Thermo Labsystem-Multiskan).

#### **4.7. Validação do Ensaio ELISA na Detecção de Anticorpos Específicos aos Antígenos Recombinantes MPT-51 e GlcB.**

Os ensaios de ELISA nesse trabalho foram validados pelo cálculo dos valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), sensibilidade e especificidade. O valor preditivo positivo associa-se basicamente à especificidade: quanto mais específico for o teste, melhor o VPP. Já o valor preditivo negativo associa-se à sensibilidade: assim, testes de maior sensibilidade, apresentam melhor VPN. Os valores preditivos dependem da prevalência da tuberculose na população estudada (incluindo os falso-positivos com outras doenças micobacterianas atípicas e os indivíduos vacinados com BCG) (Arantes 1992, Medronho et al. 2002).

Inicialmente foi determinado o ponto de corte (do inglês *cut off*, CO) de cada reação de ELISA, com base na média das densidades ópticas (DO) das amostras de soro dos controles saudáveis e hansenianos. O critério para calcular o ponto de corte foi a determinação da média das DOs dos grupos controles saudáveis e hansenianos (n=98), somada a 2 desvios padrões (2DPs), que garante o nível de confiança dos resultados. Para validação dos testes, as amostras de soro dos pacientes com tuberculose ativa foram analisadas, juntamente com os controles, sendo considerado resultados positivos, os valores de DOs superiores ao ponto de corte da reação e

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
 Antígenos do M. tuberculosis por  
 Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.

resultados negativos, os valores de DOs inferiores ao ponto de corte. Os valores VPP, VPN, da sensibilidade e especificidade foram calculados com o auxílio de tabela 2X2 (Arantes 1992) (Tabela 1).

**Tabela 1. Dados para validação dos ensaios de ELISA.**

		Doença		
Teste	Positivo	Presente	Ausente	Total
		Negativo	A	B
	Total	C	D	C+D
		A+C	B+D	N

**Legenda:** A= verdadeiro positivo; B= falso positivo; C= falso negativo; D= verdadeiro negativo; A+B= total de positivos no teste; C+D= total de negativos no teste; A+C=total de doentes testados; B+D= total de controles negativos testados.

Fórmulas para determinação do valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), sensibilidade (S) e especificidade (E):

$$\text{VPP} = \frac{A}{A + B} \quad \text{VPN} = \frac{D}{D + C} \quad \text{S} = \frac{A}{A + C} \quad \text{E} = \frac{D}{D + B}$$

#### 4.8. Análise Estatística.

A comparação entre as variâncias das densidades ópticas (DO) e os respectivos desvios padrões obtidos nos diferentes grupos foi realizada por ANOVA, testes não paramétricos: de Mann Whitney e Kruskal Wallis. Foi considerado  $p < 0,05$  como resultado significativamente diferente. O test  $t$  foi usado para avaliar diferenças entre as médias. Os dados foram analisados pelo: “Programa Prism versão 4.02 (2002) e Excel (2003)” para elaboração dos gráficos, tabelas e análise estatística das médias e desvios padrões. O cálculo do tamanho amostral e dos intervalos de confiança (IC 95%) foi realizado pelo programa EpiInfo versão 6.04.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. Dados Clínicos e Epidemiológicos da População em Estudo.

Para avaliar a existência ou não de anticorpos IgM e IgG circulantes específicos aos antígenos recombinantes MPT-51 e GlcB do *M. tuberculosis*, foram recrutados e selecionados: pacientes com tuberculose ativa, voluntários saudáveis e por se tratar de uma região endêmica a várias doenças tropicais, pacientes hansenianos também foram incluídos, para avaliação de possível resposta cruzada aos antígenos do *M. tuberculosis*.

A **Tabela 2** mostra o perfil clínico e epidemiológico dos indivíduos incluídos nesse estudo. Um total de 49 amostras de soro de pacientes com TB ativa foi coletado: Três amostras eram de pacientes com TB pleural e 46 de pacientes diagnosticados com TB pulmonar. Trinta e três pacientes com TB pulmonar eram recém diagnosticados, sendo a coleta de sangue realizada no momento seguinte após o diagnóstico. Os outros treze pacientes já tinham iniciado o tratamento, sendo sete classificados como TB recidiva. Esses pacientes foram pareados por sexo e idade com os grupos controle: indivíduos saudáveis e pacientes hansenianos (forma Virchoviana), para avaliação sérica da resposta imune humoral aos antígenos rMPT-51 e rGlcB.

A maioria dos pacientes com TB selecionados foi do sexo masculino (n=39) com idade variando de 20 a 74 anos ( $42 \pm 14,7$ ). Quanto ao questionário, muitos dos voluntários no nosso estudo não souberam informar se foram vacinados ou não com BCG e não apresentavam cicatriz vacinal que confirmasse imunização por via intradérmica. Devido à possibilidade deles terem sido vacinados na década de 60 e 70, quando a via de administração oral era utilizada no Brasil os mesmos foram classificados como sem informação (SI) (**Tabela 2**).

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

O teste tuberculínico (PPD RT23, usado no Brasil), avaliado pela técnica de Mantoux, foi realizado em todos os indivíduos do grupo de controles saudáveis, enquanto no grupo de pacientes hansenianos não foi realizado esse teste (**Tabela 2**). Entre os pacientes com tuberculose ativa, 32 pacientes realizaram o teste, com 24 resultados positivos: quatro TB pulmonar reatores fraco (5 a 9 mm), 18 TB pulmonar e dois TB pleural reatores forte (>10 mm). Oito pacientes tiveram resultados negativos, não reatores (0 a 4 mm) e dezessete não realizaram esse teste. Os resultados foram classificados de acordo com as recomendações da OMS como mostra o **Quadro 4**.

**Quadro 4. Interpretação dos resultados do teste tuberculínico.**

Tamanho da enduração	Classificação	Interpretação
0 a 4 mm	Não Reator	Não infectados com o bacilo.

Positivo. Risco de TB ativa quando Tcf/F41.71184.33 0 TD0 Tc0<0.5.

5 a 9 mm Reator Fraco

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

primeiros meses do esquema I, e sete com recidiva estavam no segundo tratamento).

Três pacientes com TB pleural também estavam no início do tratamento (**Tabela 2**)

**Tabela 2. Dados clínicos e epidemiológicos da população em estudo.**

<b>Grupos</b>	<b>C. saudável<sup>a</sup></b>	<b>TB ativa<sup>b</sup></b>	<b>Hanseníase<sup>c</sup></b>
	<b>(n=49)</b>	<b>(n=49)</b>	<b>(n=49)</b>
<b>Sexo (homens/mulheres)</b>	<b>39/10</b>	<b>39/10</b>	<b>39/10</b>
<b>Idade (média de idade); variação</b>	<b>(42); 18-68</b>	<b>(42); 20-88</b>	<b>(42); 10-</b>

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos            do            M.            *tuberculosis*            por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

## 5.2. Reconhecimento do Antígeno Recombinante MPT-51 por Anticorpos IgM Séricos dos Pacientes com Tuberculose Ativa pelo Ensaio de ELISA.

Como a maioria dos pacientes com TB selecionados apresentava manifestações clínicas da doença em torno de um mês, sendo, portanto recém diagnosticados, os anticorpos séricos da classe IgM desses pacientes foram avaliados se reconheceriam o antígeno rMPT-51. Essa avaliação foi realizada pelo método ELISA indireto. Cada amostra de soro de pacientes com TB (n=49) foi pareada de acordo com o sexo e idade com as amostras dos controles saudáveis, PPD não reatores e dos pacientes hansenianos da forma Virchoviana. A concentração do antígeno rMPT-51 foi de 2,5 µg/mL, o soro diluído a 1/10 e as reações realizadas em triplicata. Trinta e três amostras de pacientes com TB ativa, confirmadas pela cultura do bacilo (teste padrão ouro), deram positivas nesse ensaio. Como os valores preditivos do ensaio variam de acordo com a prevalência da tuberculose, no Brasil foi estimado o valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), com IC 95% de 91,6 % (77,5-98,2%) e 85,6 % (77,6-91,5%) respectivamente. A sensibilidade com IC 95% foi de 67,3 % (52,4-80%) e especificidade 96,9 % (91,3-99,4%). Em relação aos outros grupos, uma amostra de controle saudável e duas amostras dos pacientes hansenianos deram resultado acima do ponto de corte (0,772) (Tabela 3).

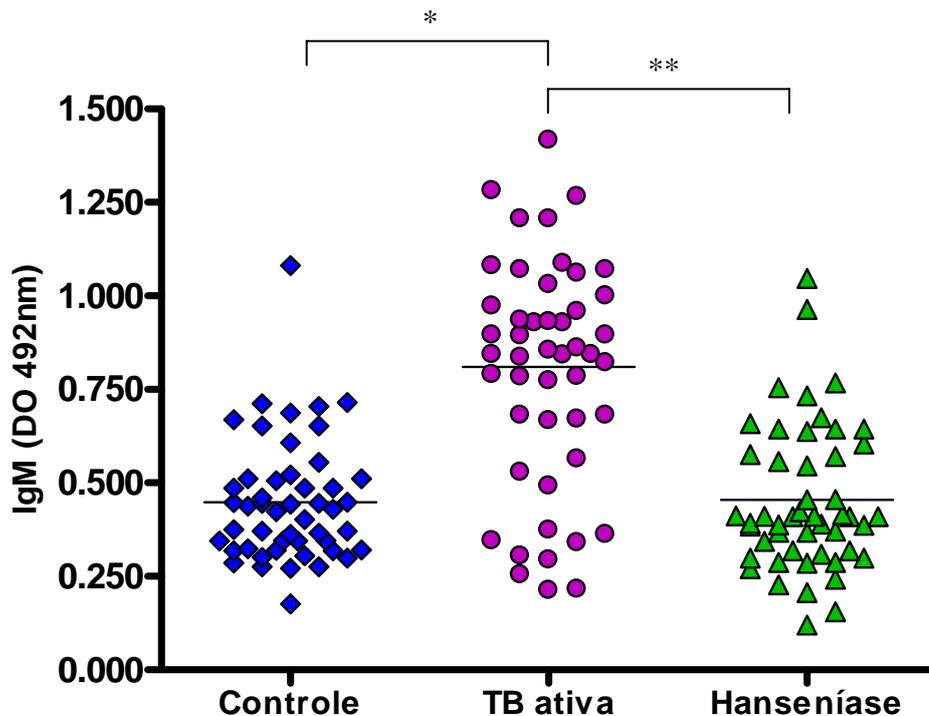
**Tabela 3. Sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste para detecção de IgM anti-MPT-51.**

Antígeno	Ponto de corte	Pacientes TB N° ≥ ponto de corte	Controles* N° ≥ ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
				% (IC 95%)	% (IC 95%)	% (IC 95%)	% (IC 95%)
MPT-51	0,772	33/49	03/98	67,3 (52,4-80,0)	96,9 (91,3-99,4)	91,6 (77,5-98,2)	85,6 (77,6-91,5)

\*Grupo de controles saudáveis e pacientes hansenianos (forma Virchoviana)

As análises estatísticas foram realizadas nos programas: Prism e Excel (teste Kruskal-Wallis e Mann Whitney). Após análise dos dados, observa-se que nesse ensaio, para dosagem dos anticorpos IgM anti-MPT-51 houve discriminação dos

pacientes com TB ativa  $0,810 \pm 0,319$  dos controles saudáveis  $0,448 \pm 0,162$  ( $p < 0,001$ ) e hansenianos  $0,454 \pm 0,195$  ( $p = 0,001$ ) (Figura 2).



**Figura 2. Determinação dos níveis séricos de IgM anti-MPT-51 de pacientes com tuberculose ativa.** As DOs de cada amostra de soro dos pacientes com tuberculose foram comparadas com as DOs das amostras dos controles saudáveis e hansenianos ( $n=49$ ). Os pontos no gráfico mostram as médias das concentrações de cada amostra (diluída 1/10), mensurada em triplicata pelo ELISA: 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de antígeno rMPT-51 e anticorpo de cabra anti-IgM humana conjugado à peroxidase diluído a 1/5000. A barra horizontal em cada grupo representa a média das leituras ópticas dos níveis de IgM. O ponto de corte foi 0,772. \*Diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre controles saudáveis e pacientes com tuberculose ativa. \*\*Diferença estatística ( $p = 0,001$ ) entre pacientes tuberculosos e hansenianos.

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos        do        M.        *tuberculosis*        por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

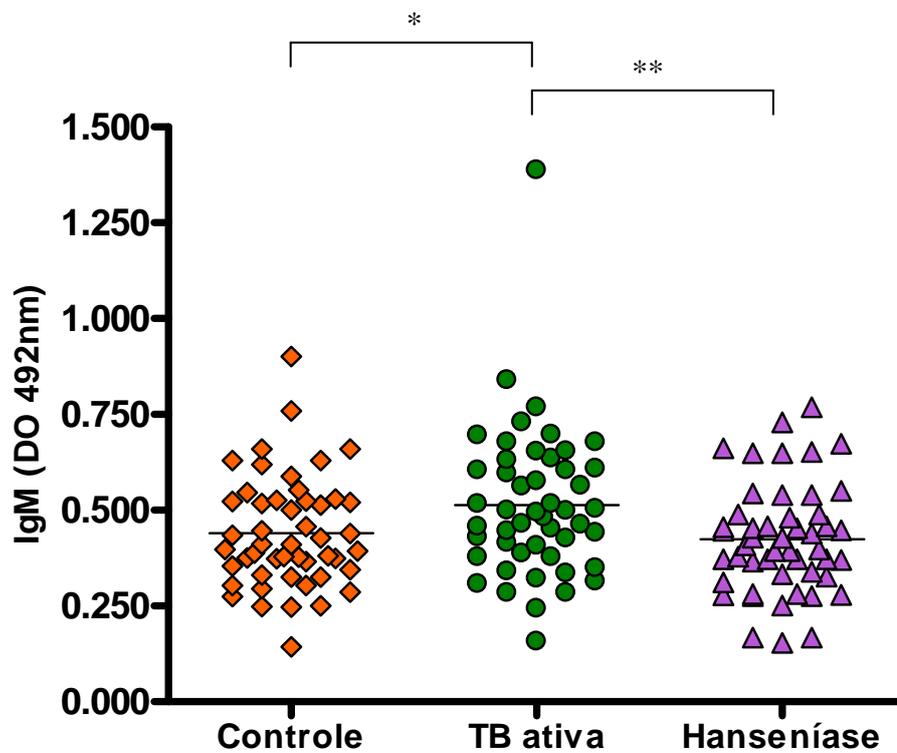
Mestrado - UFGO. 2007.

### **5.3. Reconhecimento do Antígeno Recombinante GlcB por Anticorpos IgM Séricos dos Pacientes com Tuberculose Ativa pelo Ensaio ELISA.**

Como o *M. tuberculosis* secreta diferentes antígenos com a evolução da tuberculose, foi avaliado também o reconhecimento do antígeno rGlcB por anticorpos séricos IgM dos pacientes com tuberculose ativa (n=49) que poderia caracterizar esse antígeno como marcador da tuberculose, através do ELISA indireto. O antígeno rGlcB foi usado na concentração de 2,5 µg/mL e as amostras de soro dos pacientes com TB foram diluídos 1/10 e pareadas de acordo com o sexo e idade com os controles saudáveis, PPD não reatores e pacientes com hanseníase Virchoviana. As reações foram realizadas em triplicata.

Após o cálculo do ponto de corte da reação (0,730) observa-se que somente quatro amostras dos pacientes com tuberculose ativa foram positivas e quatro amostras dos grupos controle deram falso-positivos: duas dos controles saudáveis e duas dos pacientes hansenianos. A sensibilidade do ELISA foi de 8,2% e especificidade de 95,9%. Os VPP e VPN foram calculados com valores de 50,0% e 67,6% respectivamente.

Na **Figura 3** observa-se que houve diferença estatística nas DOs entre os doentes com TB e os grupos: controle saudável ( $p < 0,04$ ) e hanseniano ( $p = 0,01$ ) (teste Kruskal-Wallis e Mann Whitney). As médias com os respectivos desvios padrões das leituras ópticas foram: dos controles  $0,440 \pm 0,145$ , pacientes com tuberculose ativa  $0,513 \pm 0,195$  e hansenianos  $0,424 \pm 0,142$ .



**Figura 3. Determinação dos níveis séricos de IgM anti- GlcB de pacientes com tuberculose ativa.** As DOs de cada amostra de soro dos pacientes com tuberculose foram comparadas com as DOs das amostras dos controles saudáveis e hansenianos (n=49). Os pontos no gráfico mostram as médias das concentrações de cada amostra (diluída 1/10), mensurada em triplicata pelo ELISA: 2,5 µg/mL de antígeno rGlcB e anticorpo de cabra anti-IgM humana conjugado à peroxidase diluído a 1/5000. A barra horizontal em cada grupo representa a média das leituras ópticas dos níveis de IgM específico. O ponto de corte foi 0,730. \*Diferença estatística (p<0,04) entre

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

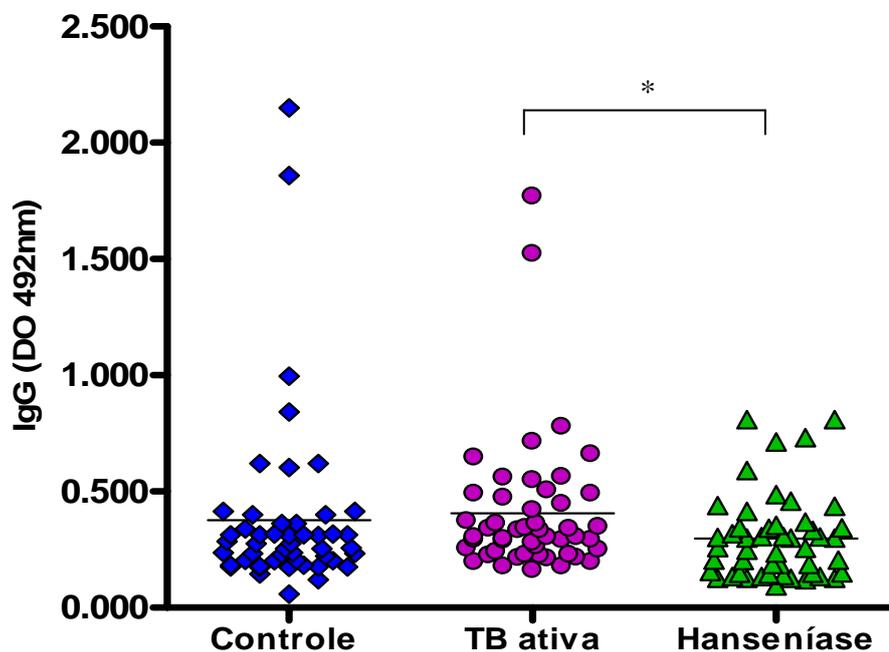
controles saudáveis e pacientes com tuberculose ativa. \*\*Diferença estatística (p=0,01) entre pacientes tuberculosos e hansenianos.

#### **5.4. Reconhecimento do Antígeno Recombinante MPT-51 por Anticorpos IgG Séricos dos Pacientes com Tuberculose Ativa pelo Ensaio ELISA.**

Sendo a tuberculose uma doença de evolução lenta, que apresenta vários estágios (infecção primária, infecção latente, TB ativa), foi avaliado também se os anticorpos da classe IgG de pacientes com tuberculose ativa, seriam capazes de reconhecer o antígeno rMPT-51. A concentração de IgG nos soros dos pacientes com TB (n=49) foi avaliada por ELISA e comparada com os grupos: controle saudável e hanseniano com a forma Virchoviana. O antígeno foi padronizado na concentração de 2,5 µg/mL e os soros foram diluídos 1/100, sendo a reação realizada em triplicata.

O ponto de corte desse ensaio foi 1,140 e observado que duas amostras de pacientes com TB foram positivas para esse ensaio. Todas as amostras dos pacientes hansenianos foram negativas e apenas duas amostras dos saudáveis apresentaram resultados falso-positivos. O cálculo da sensibilidade foi realizado, assim como a especificidade, com valores de 4,1% e 98,0% respectivamente. O VPP foi de 50,0% e VPN foi de 67,1%.

A **Figura 4** mostra que houve diferença significativa nas DOs entre os pacientes com tuberculose ativa e os pacientes com hanseníase ( $p=0,01$ ). Os dados foram tabulados e foi realizada a análise estatística (teste Kruskal-Wallis e Mann Whitney). As médias das densidades ópticas e desvios padrões obtidos dos controles saudáveis, pacientes com TB e hansenianos foram  $0,376\pm 0,376$ ;  $0,406\pm 0,299$  e  $0,298\pm 0,181$  respectivamente.



**Figura 4. Determinação dos níveis séricos de IgG anti-MPT-51 de pacientes com tuberculose ativa.** As DOs de cada amostra de soro dos pacientes com tuberculose foram comparadas com as DOs das amostras dos controles saudáveis e hansenianos (n=49). Os pontos no gráfico mostram as médias das concentrações de cada amostra (diluída 1/100), medidas em triplicata pelo ELISA: 2,5 µg/mL de antígeno rMPT-51 e anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado à peroxidase diluído a 1/15000. A barra horizontal em cada grupo representa a média das leituras ópticas dos níveis de IgG específico. O ponto de corte foi 1,140. \*Diferença estatística (p=0,01) entre pacientes tuberculosos e hansenianos.

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos        do        M.        *tuberculosis*        por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

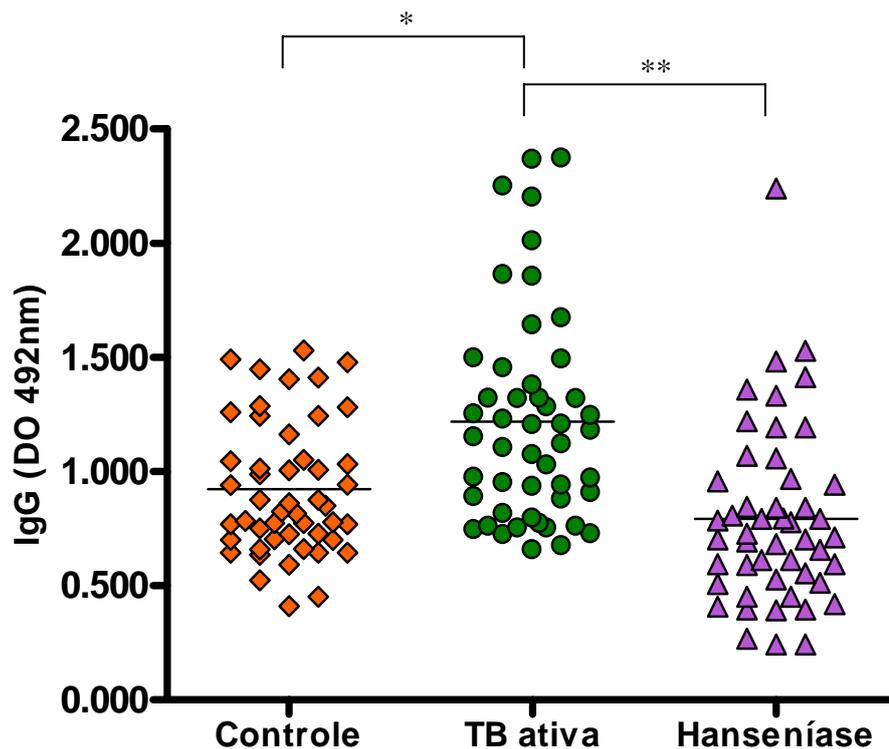
Mestrado - UFGO. 2007.

### **5.5. Reconhecimento do Antígeno Recombinante GlcB por Anticorpos IgG Séricos dos Pacientes com Tuberculose Ativa pelo Ensaio ELISA.**

Foi questionado também se os anticorpos da classe IgG de pacientes com TB ativa (n=49) seriam capazes de reconhecer o antígeno rGlcB e discriminar os doentes dos controles. Com esse intuito foi realizado o ELISA indireto para determinar a concentração sérica de IgG específico ao rGlcB. O antígeno foi usado na concentração de 2,5 µg/mL e os soros foram diluídos a 1/100. As reações foram processadas em triplicata como descrito.

Os resultados das DOs dos anticorpos IgG anti-GlcB mostraram que nove amostras dos doentes com tuberculose foram positivas e somente uma amostra dos controles (incluindo os saudáveis e pacientes hansenianos) deu resultado falso-positivo. O ponto de corte da reação foi 1,538. De igual modo, foi realizada a validação desse ensaio, calculando a sensibilidade (18,4%), a especificidade (99%), os valor preditivo positivo (VPP= 90%) e valor preditivo negativo (VPN=70,8%).

A análise estatística mostra que houve diferença significativa entre tuberculosos e controles saudáveis (p=0,001) e hansenianos (p<0,001), analisados pelo teste Kruskal-Wallis e Mann Whitney (**Figura 5**). As médias das DOs e desvios padrões de cada grupo foi avaliada: controles saudáveis 0,922±0,305, doentes com TB ativa 1,219±0,462 e hansenianos 0,795±0,392.



**Figura 5. Determinação dos níveis séricos de IgG anti-GlcB de pacientes com tuberculose ativa.** As DOs de cada amostra de soro dos pacientes com tuberculose foram comparadas com as DOs das amostras dos controles saudáveis e hansenianos. (n=49). Os pontos no gráfico mostram as médias das concentrações de cada amostra (diluída 1/100), medidas em triplicata pelo ELISA: 2,5 µg/mL de antígeno rGlcB e anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado à peroxidase diluído a 1/15000. A barra horizontal em cada grupo representa a média das leituras ópticas dos níveis de IgG específico. O ponto de corte foi 1,538. \*Diferença estatística (p=0,001) entre pacientes tuberculosos e controles saudáveis. \*\*Diferença estatística (p<0,001) entre pacientes tuberculosos e hansenianos.

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos        do        M.        *tuberculosis*        por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

### **5.6. Cinética dos Anticorpos IgM Séricos anti-MPT-51 de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Antes e Após o Tratamento.**

Trabalhos mostram que pacientes com tuberculose ao iniciarem o tratamento, começam a reduzir o número de micobactérias, com negatividade da baciloscopia em entre o 8° a 60° dia de terapia e na cultura 15° a 90° dia (Sousa et al. 2000, Arias-Bouda et al. 2003). Sendo assim, foi questionado se há redução também da resposta humoral nesses pacientes durante o tratamento. Para verificar se os níveis dos anticorpos da classe IgM específicos para o antígeno recombinante MPT-51 são alterados com o tratamento, onze pacientes foram monitorados durante a terapia. As coletas foram realizadas antes e após seis meses de quimioterapia com esquema I. Após o ELISA, as DOs de cada amostra de soro foram comparadas e analisadas estatisticamente pelo teste *t* de student. Em uma análise global, as médias das DOs de IgM antes ( $1,010 \pm 0,233$ ) e após ( $1,030 \pm 0,269$ ) o tratamento foram similares e sem diferença estatística nos valores de IgM sérica que reconhecem rMPT-51 (**Figura 6A**). No entanto, uma análise individual, mostra níveis diferenciados entre os pacientes, mostrando que três reduziram os níveis de IgM, três mantiveram e cinco aumentaram (**Figuras 6B, C e D**).

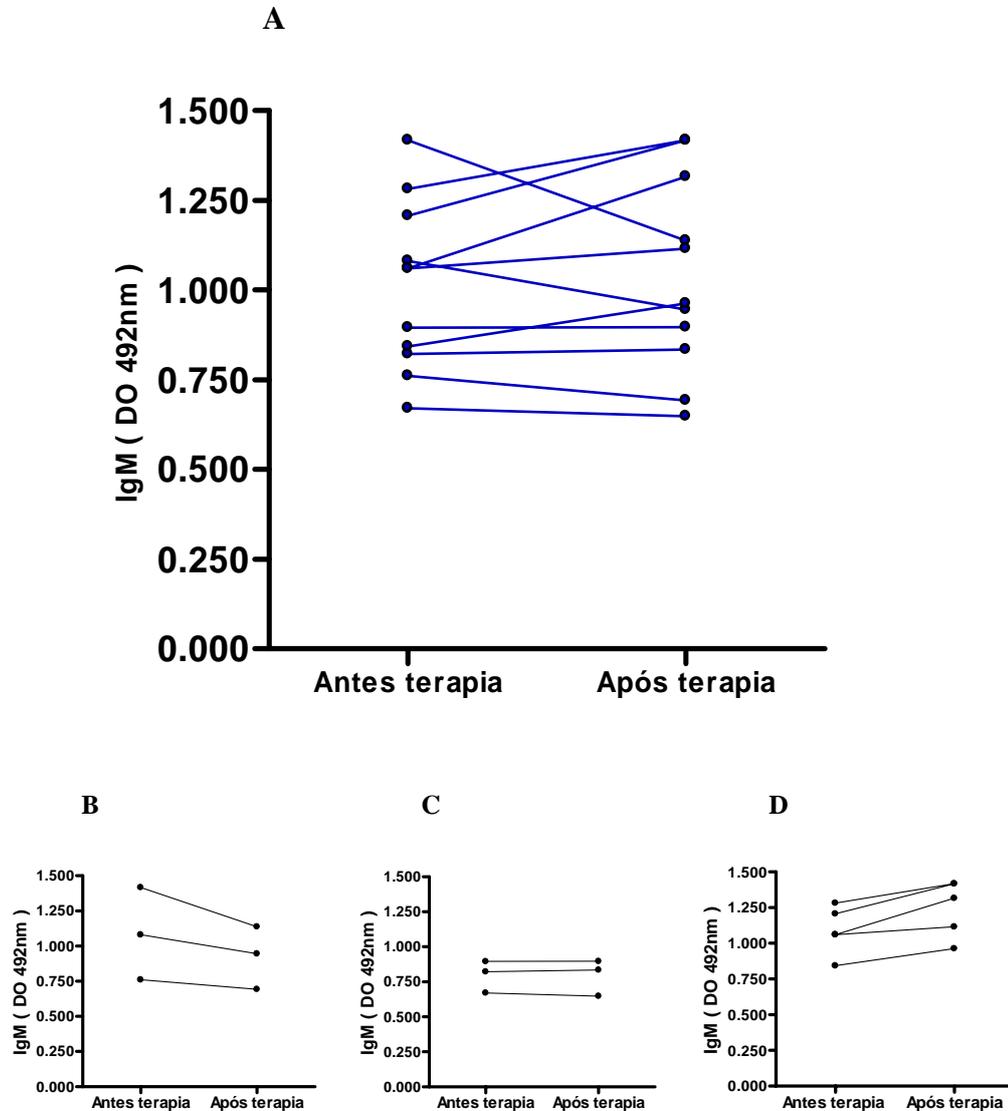
Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

---

---

---

Mestrado - UFGO. 2007.



**Figura 6. Detecção dos níveis séricos de IgM anti-MPT-51 dos pacientes com tuberculose pulmonar antes e após o tratamento. A.** Foram coletados soros dos pacientes recém diagnosticados e após seis meses de terapia (n=11). As reações foram realizadas em duplicata pelo ELISA, nas condições de 2,5 µg/mL de antígeno, diluição do soro 1/10 e anticorpo de cabra anti-IgM humana conjugado a peroxidase. **B-D.** Mostram os níveis dos pacientes com TB que diminuíram (**B**), mantiveram (**C**) e aumentaram (**D**) as concentrações de IgM que reconhecem rMPT-51.

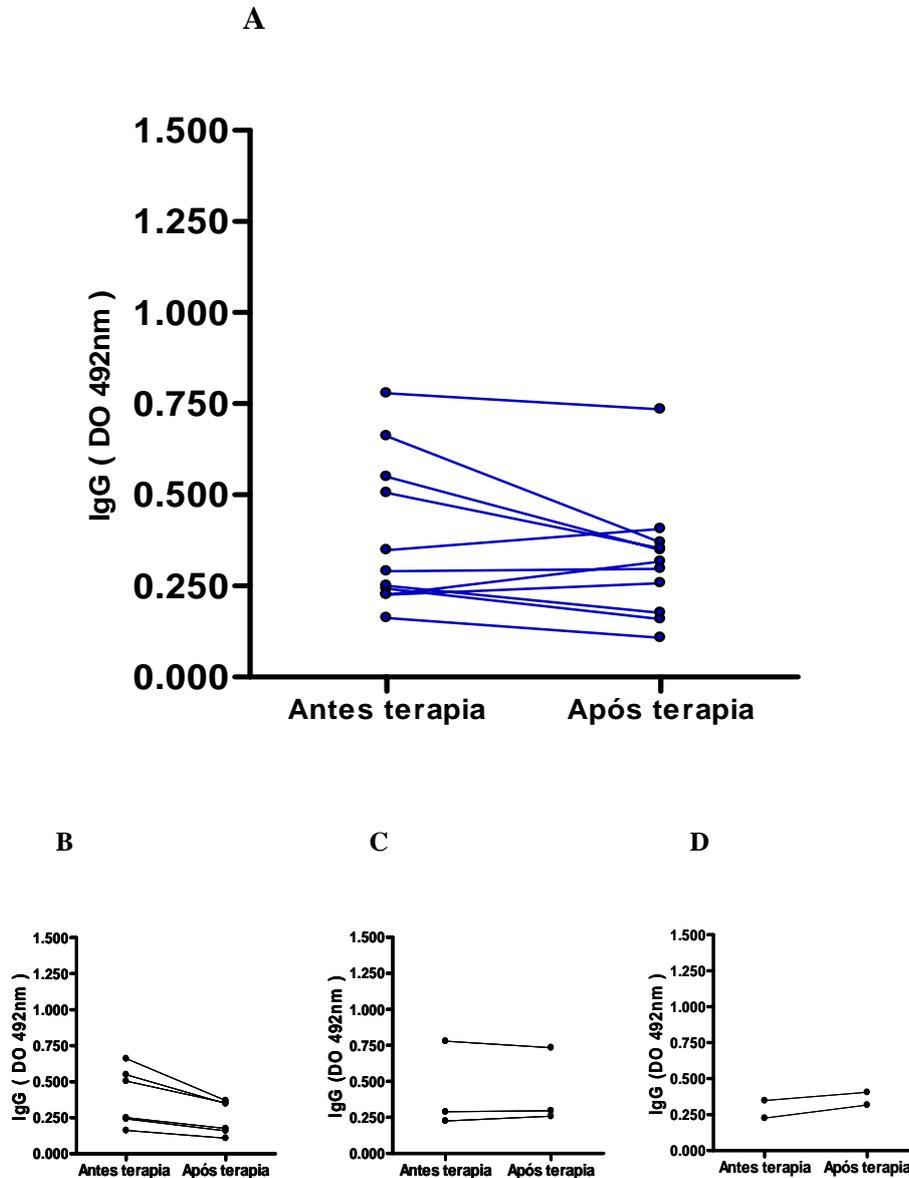
### **5.7. Cinética dos Anticorpos IgG Séricos anti-MPT-51 de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Antes e Após o Tratamento.**

De acordo com a literatura, hipotizou-se que o tratamento, inicialmente, aumentaria o suprimento de antígenos bacilares, devido maior exposição do bacilo, aumentando a resposta imune humoral (Arias-Bouda et al. 2003) e conseqüentemente o nível sérico de IgG específico para antígenos micobacterianos. Assim, a concentração de IgG específica para rMPT-51 nos pacientes com tuberculose ativa antes de iniciarem a terapia e após seis meses de tratamento (n=11) foi determinada. As reações foram realizadas em duplicata pelo ensaio ELISA nas mesmas condições já descritas. Os perfis de IgG nos pacientes antes e após o tratamento foram similares, quando analisado todos os dados pelo teste *t* de student, com médias e desvios padrões das DOs  $0,385 \pm 0,205$  e  $0,320 \pm 0,167$  (**Figura 7A**). Quando analisado os níveis séricos de IgG anti-MPT-51 individualmente nos pacientes, observa-se que em seis pacientes houve diminuição de IgG, três mantiveram os níveis desse anticorpo e dois aumentaram (**Figuras 7B, C e D**).

Os níveis de anticorpos IgM e IgG que reconhecem o antígeno rMPT-51 de cada paciente avaliado mostra que sete pacientes apresentaram resultados similares, ou seja, os que tiveram redução, mantiveram ou aumentaram IgM séricas após a terapia, também mostraram os mesmos resultados em relação à IgG. Contudo quatro dos pacientes mostraram perfis diferentes em relação a essas duas classes de anticorpos (**Figuras 6 e 7**).

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de Antígenos do *M. tuberculosis* por Anticorpos.

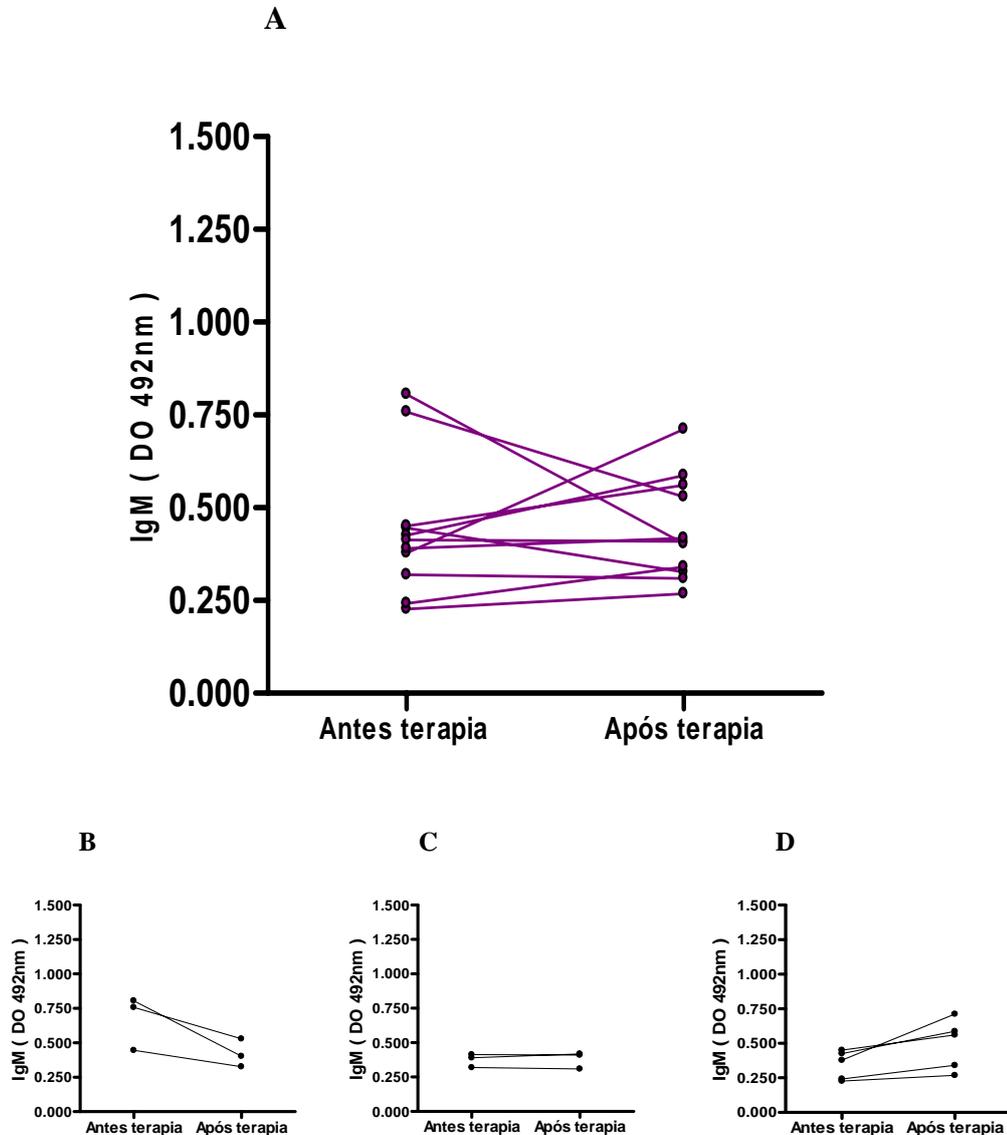
Mestrado - UFGO. 2007.



**Figura 7. Detecção dos níveis séricos de IgG anti-MPT-51 dos pacientes com tuberculose pulmonar antes e após o tratamento. A.** Foram coletados soros dos pacientes antes e após a terapia do esquema I (n=11). As reações foram realizadas em duplicata pelo ELISA nas condições de 2,5 µg/mL de antígeno rMPT-51, diluição da amostra 1/100 e uso de anticorpo de coelho anti-IgG humana conjugado com peroxidase. **B.** Perfil individual dos pacientes onde houve diminuição de IgG anti-MPT-51, **C.** Mantiveram e **D.** Aumentaram.

### **5.8. Cinética dos Anticorpos IgM Séricos anti-GlcB de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Antes e Após o Tratamento.**

Com o intuito de avaliar também o perfil de anticorpos que reconhecem o antígeno recombinante GlcB nos pacientes com tuberculose antes a após o tratamento, mensurou-se os anticorpos IgM séricos anti-GlcB dos onze pacientes monitorados durante o tratamento. Após dosagem dos níveis séricos de IgM anti-GlcB, as duas variáveis foram analisadas estatisticamente (teste *t* de student) e não apresentaram diferença estatística, com concentrações similares desse anticorpo: antes ( $0,441 \pm 0,184$ ) e após o tratamento ( $0,442 \pm 0,138$ ) (**Figura 8A**). A análise individual dos pacientes mostra um perfil diferenciado, com diminuição da concentração de IgM anti GlcB em três doentes, três mantiveram os níveis séricos de IgM e cinco aumentaram (**Figuras 8B, C e D**). Os três pacientes que tiveram redução de IgM anti-GlcB após a terapia foram os mesmos que também tiveram diminuição dos níveis séricos de IgM e IgG anti-MPT-51 (**Figuras 6, 7 e 8**).



**Figura 8. Detecção dos níveis séricos de IgM anti-GlcB dos pacientes com tuberculose pulmonar antes e após o tratamento. A.** Amostras de soro dos pacientes comparadas antes da terapia e após seis meses de terapia do esquema I (n=11). As reações foram realizadas em duplicata pelo ELISA usando diluição da amostra 1/10, concentração do antígeno 2,5 µg/mL e anticorpo anti-IgM conjugado a peroxidase, diluído a 1/5000. **B-D.** Perfil individual de IgM anti-GlcB de cada paciente em grupos que diminuiram (**B**), mantiveram (**C**) e aumentaram (**D**) os níveis séricos de IgM antes e após o tratamento.

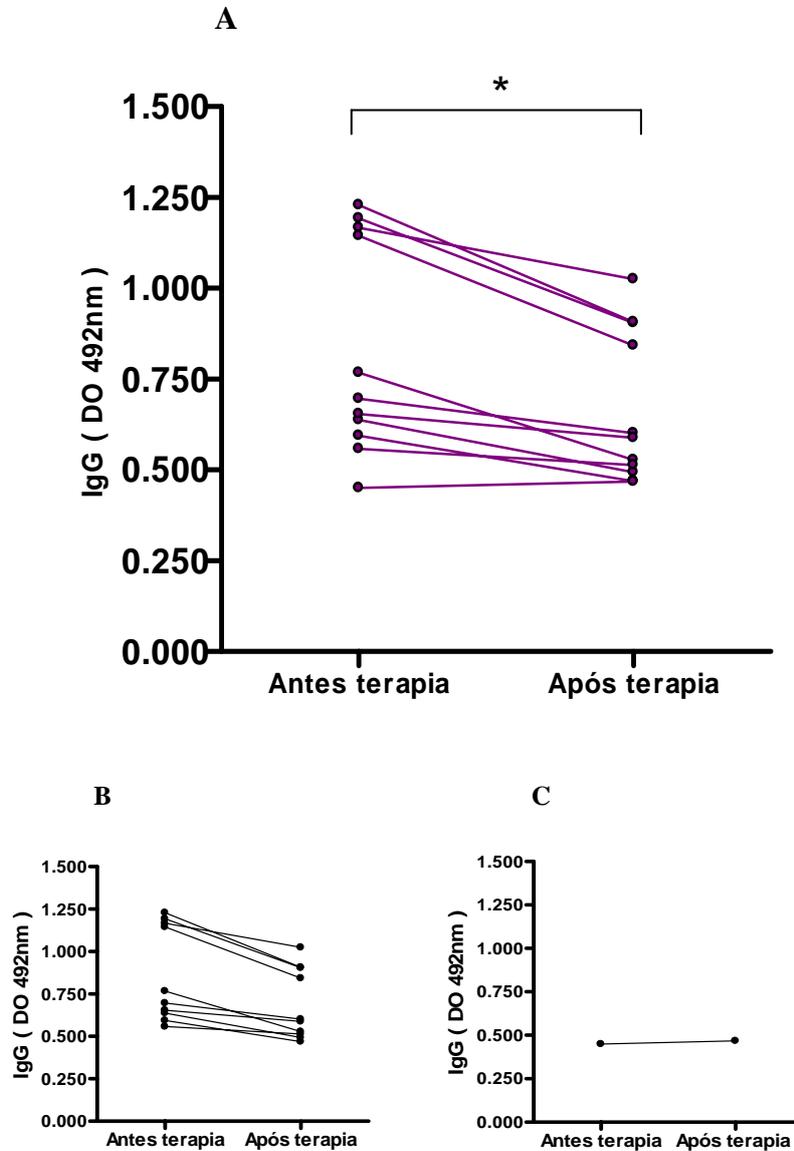
Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

### **5.9. Cinética dos Anticorpos IgG Séricos anti-GlcB de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Antes e Após o Tratamento.**

Igualmente, foi determinado se o tratamento modificaria os níveis dos anticorpos séricos da classe IgG anti-GlcB dos pacientes com TB. Os anticorpos séricos dos onze doentes com TB pulmonar selecionados, foram mensurados antes e após o tratamento, pelo ELISA indireto. As reações foram realizadas em duplicata. A **Figura 9A** mostra as DOs de cada paciente antes e após o tratamento, com médias e desvios padrões de  $0,827 \pm 0,294$  e  $0,667 \pm 0,208$  respectivamente. Os dados desse experimento foram analisados e observa-se diferença estatística significativa entre as médias das duas variáveis (teste *t* de student,  $p < 0,01$ ). Uma análise dessas variáveis pontualmente, mostra que os níveis de IgG anti-GlcB de dez doentes diminuíram após o tratamento e um paciente manteve os níveis de IgG (**Figura 9B e C**).



**Figura 9. Detecção dos níveis séricos de IgG anti-GlcB dos pacientes com tuberculose pulmonar antes e após a terapia. A.** As amostras de soro coletadas foram comparadas antes e após a terapia com esquema I (n=11). As reações foram realizadas em duplicata pelo ELISA nas condições de 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de antígeno GlcB, diluição da amostra 1/100 e uso de anticorpo de coelho anti-IgG humana conjugado com peroxidase. \*  $p < 0,01$ . **B.** Exibe homogeneidade no padrão de IgG anti-GlcB entre os pacientes. **C.** Um manteve os níveis de IgG.

## 6. DISCUSSÃO.

Investigamos o reconhecimento dos antígenos rMPT-51 e rGlcB por anticorpos séricos de pacientes com tuberculose ativa, pelo ensaio ELISA. Para controle utilizamos um grupo de indivíduos saudáveis, sem evidências de doenças crônicas e imunossupressão e outro grupo de pacientes com hanseníase Virchoviana (**Tabela 2**). Como a hanseníase é uma doença endêmica em nossa região, causada pelo *M. leprae*, a comparação com esse grupo é importante para averiguar se haveria reação cruzada no ensaio utilizado. Isso pode ocorrer devido à homologia existente entre as proteínas do *M. tuberculosis* e do *M. leprae*, bem como entre outras micobactérias. Teve-se o cuidado de escolher pacientes hansenianos com a forma Virchoviana, porque essa é a única forma da doença que polariza para resposta humoral, e que consegue representar com segurança o grupo de pacientes hansenianos usados nesse estudo.

Estudos têm sido propostos para caracterização de proteínas imunogênicas, produzidas pelo *M. tuberculosis* que possam ser usadas no desenvolvimento de novos testes diagnósticos da tuberculose, como os sorodiagnósticos em teste que utilizam essas proteínas como marcadores da doença (Bothamley et al. 1992, Laal et al. 1997). A escolha dos antígenos MPT-51 e o GlcB foi determinada por serem proteínas secretadas pelo *M. tuberculosis*, quando cultivado em condições de stress nutricional, que mimetizam o microambiente intracelular vivido pelo bacilo nas células mononucleares. Esses antígenos são imunodominantes e possuem disponibilidade de processamento em larga escala, de proteínas recombinantes purificadas, sendo produzidas em *E. coli* (Samanich et al. 1998).

Nossa população em estudo incluiu homens e mulheres com tuberculose, a maioria recém diagnosticada, confirmada por baciloscopia e/ou cultura (n=49), com idade variando de 20 a 74 anos, HIV soronegativos. O controle negativo foi composto por dois grupos: 49 indivíduos saudáveis e 49 pacientes hansenianos, totalizando 147 amostras (**Tabela 2**).

Os níveis de anticorpos IgM específicos ao rMPT-51 nos pacientes com tuberculose ativa, dosados pelo ELISA, foram mais elevados. A sensibilidade desse ensaio foi 67,3% e especificidade foi 96,9%. O VPP foi de 91,6% e o VPN 85,6% (**Figura 2**). Embora o antígeno MPT-51 seja secretado também pelo *M. leprae* (Rinke de Wit et al. 1993, Rambukkana et al. 1993, Ohara et al. 1997), a homologia dessa proteína entre essas duas espécies de micobactérias parece não ter interferido na especificidade do ensaio.

Anticorpos IgG que reconhecem o rMPT-51, no ensaio de ELISA, não distinguiram doentes com TB ativa de controles saudáveis, com médias das DOs  $0,406 \pm 0,299$  e  $0,376 \pm 0,382$  respectivamente, contudo distinguem pacientes com TB de hansenianos (**Figura 4**). A sensibilidade desse teste foi muito baixa (4,1%), no entanto, o ensaio demonstrou boa especificidade (98,0%). O VPP do ensaio foi de 50% e VPN 67,1% .

Os ensaios de ELISA para dosagem de IgG e de IgM específicos ao rGlcB discriminaram os doentes com tuberculose pulmonar, dos controles saudáveis e dos doentes hansenianos (**Figura 3 e 5**). Contudo esses testes de ELISA não mostraram boa precisão. Para detecção de IgM anti-GlcB a sensibilidade também foi baixa, 8,2% e a especificidade 95,9%, o VPP 50,0% e o VPN 67,6%; para dosagem de IgG anti-GlcB os resultados obtidos da sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram 18,4%, 99%, 90% e 70,8% respectivamente.

Pesquisas realizadas por Singh et al. (2005), em Nova Iorque, mostraram que os níveis de IgG anti-MPT-51 e IgG anti-GlcB em grupos de indivíduos saudáveis PPD<sup>-</sup> e PPD<sup>+</sup> foram mais baixos, quando comparados com pacientes TB/HIV<sup>+</sup> e pacientes TB/HIV<sup>-</sup>, avaliados por ELISA e Western blot. Conquanto nossos dados não reportam os de Singh (**Quadro 1**), em relação à dosagem de anticorpos IgG anti-MPT-51 (sensibilidade 60%) e IgG anti-GlcB (sensibilidade 70%), eles corroboram com a teoria de que há heterogeneidade no reconhecimento de um mesmo antígeno por anticorpos em diferentes populações, principalmente em países endêmicos como em nossa região (Lyashchenko et al. 1998b).

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

A sensibilidade baixa dos ensaios ELISA, pode estar associada à possibilidade de que alguns dos nossos controles negativos tenham entrado em contato prévio com o *M. tuberculosis* (ou mesmo outras micobactérias atípicas). Por se tratar de uma região endêmica a TB, nossa população torna-se mais exposta ao bacilo. Outro fator possível é a interferência da vacina BCG nos resultados obtidos, uma vez que em Goiás até junho de 2006, a maioria da população recebeu duas doses da vacina BCG. Esses dois fatos juntos podem explicar porque os níveis séricos de anticorpos anti-MPT-51 e anti-GlcB nos controles deram leituras elevadas, resultando em pontos de corte (cut off) também elevados e conseqüentemente a sensibilidade de cada teste dando valor baixo.

Alguns trabalhos implicados na avaliação comparativa dos padrões de antígenos secretados pelo *M. tuberculosis* em estágios clínicos da tuberculose, mostram diferentes resultados. Samanich et al. (2001) que trabalharam com cerca de 100 proteínas CFPs, sugerem que há um grupo definido de antígenos, reconhecidos por anticorpos que mantem os padrões de produção sérica, nos estágios diferentes da doença (estágios iniciais e tardios). Porém eles não descartam a hipótese de que pode também haver outro grupo adicional de antígenos, reconhecidos por anticorpos séricos, que sofrem alterações durante a evolução da tuberculose. A pesquisa de Coates et al. (1981) sugere haver diversidade na resposta humoral, e mudança nas concentrações de anticorpos contra antígenos micobacterianos com a evolução da doença. Entretanto esses trabalhos não reportam qual a influência do tratamento na resposta humoral.

Com o intuito de avaliar se a terapia induziria uma mudança nas concentrações de anticorpos específicos

antígenos diferentes. o da tuber se andotígenos idu.

antígenos rMPT-51 e rGlcB, resultando também em aumento dos anticorpos circulantes que reconhecem esses antígenos e se as concentrações de IgM e IgG específicos permaneceriam altas até o fim do tratamento.

Os resultados mostram que os anticorpos IgM e IgG específicos ao antígeno rMPT-51, nos onze pacientes com TB pulmonar monitorados, mantiveram níveis similares antes e após a terapia. Quando avaliados individualmente observa-se que alguns pacientes apresentaram diminuição dos níveis de anticorpos, enquanto outros aumentaram. Esperávamos que houvesse diminuição desses anticorpos, principalmente de IgM, que é um anticorpo de fase aguda (**Figura 6 e 7**). No entanto, houve redução de IgM anti-MPT-51 em apenas três pacientes e aumento em cinco. Esses resultados podem ter ocorrido por intensa estimulação da resposta humoral, pelos antígenos liberados dos bacilos mortos em resposta à ação dos antimicobacterianos, resultando na produção de anticorpos específicos ao MPT-51. Como exemplo da ação da quimioterapia há a isoniazida, que age sobre a maioria dos bacilos extrapulmonares, logo nos primeiros dias de terapia, podendo contribuir para o aumento da resposta humoral nas primeiras semanas do tratamento. Consequentemente concentrações de anticorpos ligeiramente aumentados são observadas nos dois primeiros meses de terapia, mas que pode persistir por mais tempo (Arias-Bouda et al. 2003). Na dosagem de IgG anti-MPT-51 observa-se redução desse anticorpo em seis pacientes com TB pulmonar e aumento em dois.

De forma semelhante os níveis séricos de anticorpos IgM que reconhecem o GlcB, também não alteraram ao final de seis meses de terapia (**Figura 8**). Com avaliação individual mostrando redução de IgM anti-GlcB em três pacientes e aumento em cinco doentes.

Na literatura há trabalhos mostrando a diversidade da resposta humoral a antígenos liberados durante o tratamento da tuberculose. O trabalho de Imaz & Zerbini (2000) indica que os mesmos níveis de anticorpos podem persistir por vários anos, dificultando a discriminação entre tuberculose ativa e doença no passado. Eles usaram a técnica de ELISA para dosagem de anticorpos específicos ao antígeno micobacteriano Ag14-kDa, mostrando que somente após um ano do início da terapia

foi observado decréscimo dos níveis de anticorpos e que em muitos pacientes os mesmos níveis persistiram por quase três anos. Outro trabalho sugere que o sorodiagnóstico pode auxiliar no monitoramento da eficácia terapêutica no tratamento da tuberculose, dependendo dentre outros fatores, do antígeno usado no ensaio. Assim, a pesquisa de Azzurri et al. (2006) mostra que houve diminuição dos anticorpos IgG específicos ao ESAT-6 nos pacientes com tuberculose, durante o tratamento, mensurados também por ELISA, confirmando nossos dados em relação ao GlcB. A dosagem dos anticorpos IgG anti-GlcB revela que houve redução significativa nas concentrações de IgG após o tratamento na maioria dos pacientes. Dez pacientes mostraram redução desse anticorpo e um paciente manteve os níveis séricos após o tratamento (**Figura 9**).

Dos onze pacientes monitorados, quatro pacientes apresentaram resultados similares em todas as dosagens: três pacientes tiveram redução das concentrações de IgM e IgG anti-MPT-51 e IgM anti-GlcB e um paciente teve aumento desses anticorpos após o tratamento.

Várias proteínas imunodominantes secretadas pelo bacilo da tuberculose são usadas no desenvolvimento de novos testes diagnósticos da tuberculose, como o ELISA que é largamente usado. Contudo sérios problemas de especificidade e sensibilidade ainda são encontrados, limitando a disponibilização de muitos testes já propostos (**Quadro 1**). A maioria dessas pesquisas com diferentes antígenos, demonstra baixa sensibilidade, quando comparados com a cultura e a baciloscopia (Turner et al. 1988, Arias-Bouda et al. 2003, Gupta et al. 2005). Segundo a OMS um teste para diagnóstico de tuberculose deve ter sensibilidade acima de 80% e especificidade maior que 95%. Embora a sensibilidade encontrada no ensaio de ELISA, para dosagem de IgM anti-MPT-51, tenha sido de 67,3% (52,4 a 80,0%) e especificidade 97,9% (91,3 a 99,4%), nossos resultados sugerem que o rMPT-51 pode ser usado na elaboração de novos testes diagnósticos da tuberculose. Além disso, mesmos os testes diagnósticos para tuberculose já existentes, apresentam sensibilidade variando de 30 a 80% para a baciloscopia e para a cultura (considerada

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

padrão-ouro), a variação oscila entre 30 e 85% (Nelson et al.1998, Craft et al. 2000, Walton et al. 2005).

Infelizmente há um reconhecimento heterogêneo de antígenos do *M. tuberculosis* por anticorpos séricos, seja pela genética do hospedeiro (alguns alelos do HLA podem estar relacionados com aumento da resposta humoral a determinados antígenos) ou genética da cepa infectante, seja pela produção de diferentes antígenos durante a evolução da tuberculose ou pela carga bacilar. Tudo isso leva a uma falha em detectar anticorpos específicos, em mais de 30% dos pacientes com tuberculose (Ivanyi et al. 1988). Essa situação parece ser agravada em regiões endêmicas, onde há uma possibilidade maior de exposição ao bacilo e muitos indivíduos estão na forma latente da doença, sendo necessários muitos estudos para o desenvolvimento de um teste com melhor acurácia.

Nossos dados caracterizaram o rMPT-51 como possível marcador da tuberculose, na avaliação de IgM específico a esse antígeno. No entanto, seria interessante testar o rMPT-51 em associação com o rGlcB e outros antígenos imunodominantes. Alguns autores propõem o uso de multiantígenos no sorodiagnóstico, pois vários dados apontam que a combinação de dois ou mais antígenos tem elevado a sensibilidade e especificidade da reação (Lyashchenko et al. 2000, Wang et al. 2005). É preciso ainda repetir nossos experimentos em outras populações, incluindo maior número de pacientes com TB e de controles, pois uma variedade de fatores, já citados, pode influenciar no resultado dos testes.

Apesar do ensaio de ELISA para o antígeno rGlcB ter demonstrado baixa sensibilidade, sugerimos que o mesmo possa ser usado para o acompanhamento da terapêutica, uma vez que os níveis séricos de IgG específicos diminuíram após o tratamento da tuberculose.

## 7. CONCLUSÕES.

Tanto o antígeno recombinante MPT-51 como o GlcB foram reconhecidos por anticorpos séricos de pacientes com TB, discriminando esses pacientes dos outros grupos, exceto quando avaliados o reconhecimento do MPT-51 por anticorpos da classe IgG.

O ensaio de ELISA para a detecção de anticorpos IgM que reconhecem o MPT-51, teve melhores resultados com sensibilidade de 67,3% (52,4 a 80,0%) e especificidade 97,9% (91,3 a 99,4%).

Os níveis de anticorpos da classe IgG específicos ao antígeno protéico rGlcB, diminuíram após o tratamento da tuberculose.

Esse estudo demonstra que a análise da resposta imune humoral pode ajudar na identificação de novos antígenos imunodominantes como o MPT-51 e GlcB, para serem usados no desenvolvimento de sorodiagnósticos e novas vacinas de subunidades para tuberculose.

## 8. REFERÊNCIAS.

- 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* 13: 1291-1293.
- Adler H, Straub C and Frei R 2005. Comparison of BacT/ALERT 3D, Lowenstein-Jensen medium and Middlebrook 7H10/7H11 biplate for recovering mycobacteria from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24: 499-500.
- Akahoshi M, Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Tanaka Y, Okada K, Otsuka T and Harada M 2003. Influence of interleukin-12 receptor beta1 polymorphisms on tuberculosis. *Hum Genet* 112: 237-243.
- Andersen P and Doherty TM 2005. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* 3: 656-662.
- Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Nagata T and Koide Y 2005. Expression mapping using a retroviral vector for CD8+ T cell epitopes: definition of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by H2-Dd. *J Immunol Methods* 298: 21-34.
- Apostolou I, Takahama Y, Belmant C, Kawano T, Huerre M, Marchal G, Cui J, Taniguchi M, Nakauchi H, Fournie JJ, Kourilsky P and Gachelin G 1999. Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5141-5146.
- 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 Bacteriol* 49 Pt 3: 1263-1273.
- Arantes GR 1992. The predictive value of the standard tuberculin test in BCG-vaccinated children. *Rev. Saúde Pública*. 26: 264-268.
- Araujo Z, Waard JH, Fernandez de Larrea C, Lopez D, Fandino C, Maldonado A, Hernandez E, Ocana Y, Ortega R, Singh M, Ottenhoff TH, Arend SM and Convit J 2004. Study of the antibody response against *Mycobacterium*

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

*tuberculosis* antigens in Warao Amerindian children in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 517-524.

Arias-Bouda LM, Kuijper S, Van der Werf A, Nguyen LN, Jansen HM and Kolk AH 2003. Changes in avidity and level of immunoglobulin G antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in sera of patients undergoing treatment for pulmonary tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 702-709.

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

Azzurri A, Kanaujia GV, Sow OY, Bah B, Diallo A, Del Prete G and Gennaro ML 2006. Serological markers of pulmonary tuberculosis and of response to anti-tuberculosis treatment in a patient population in Guinea. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19: 199-208.

Bahk YY, Kim SA, Kim JS, Euh HJ, Bai GH, Cho SN and Kim YS 2004. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics* 4: 3299-3307.

Barreto ML, Cunha SS, Pereira SM, Genser B, Hijjar MA, Yury Ichihara M, de Brito SC, Dourado I, Cruz A, Santa'Ana C and Rodrigues LC 2005. Neonatal BCG protection against tuberculosis lasts for 20 years in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 1171-1173.

Bass H, Mosmann T and Strober S 1989. Evidence for mouse Th1- and Th2-like helper T cells in vivo. Selective reduction of Th1-like cells after total lymphoid irradiation. *J Exp Med* 170: 1495-1511.

Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD and Britton WJ 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 162: 3504-3511.

Becknell B and Caligiuri MA 2005. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol* 86: 209-239.

Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ and Besra GS 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276: 1420-1422.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

- Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P and Gicquel B 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 144 ( Pt 11): 3195-3203.
- Bloom BR and Murray CJ 1992. Tuberculosis: commentary on a reemerging killer. *Science* 257: 1055-1064.
- Bosio CM, Gardner D and Elkins KL 2000. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *J Immunol* 164: 6417-6425.
- Bothamley GH, Rudd R, Festenstein F and Ivanyi J 1992. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax* 47: 270-275.
- Brennan PJ and Nikaido H 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 64: 29-63.
- Briken V, Porcelli SA, Besra GS and Kremer L 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 53: 391-403.
- Brill KJ, Li Q, Larkin R, Canaday DH, Kaplan DR, Boom WH and Silver RF 2001. Human natural killer cells mediate killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via granule-independent mechanisms. *Infect Immun* 69: 1755-1765.
- Brookes RH, Pathan AA, McShane H, Hensmann M, Price DA and Hill AV 2003. CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. *Eur J Immunol* 33: 3293-3302.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D and Cole ST 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3684-3689.
- Bulat-Kardum L, Etokebe GE, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Zaputovic L, Pavelic J, Beg-Zec Z and Dembic Z 2006. Interferon-gamma receptor-1 gene promoter polymorphisms (G-611A; T-56C) and susceptibility to tuberculosis. *Scand J Immunol* 63: 142-150.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

- Camus JC, Pryor MJ, Medigue C and Cole ST 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148: 2967-2973.
- Chackerian AA, Chen SJ, Brodie SJ, Mattson JD, McClanahan TK, Kastelein RA and Bowman EP 2006. Neutralization or absence of the IL-23 pathway does not compromise immunity to mycobacterial infection. *Infect Immun* 74: 6092-6099.
- Chambers HF, Moreau D, Yajko D, Miick C, Wagner C, Hackbarth C, Kocagoz S, Rosenberg E, Hadley WK and Nikaido H 1995. Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2620-2624.
- Chiang CY and Riley LW 2005. Exogenous reinfection in tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 5: 629-636.
- Chowell G, Diaz-Duenas P and Chowell D 2005. The dynamics of pulmonary tuberculosis in Colima, Mexico (1999-2002). *Scand J Infect Dis* 37: 858-862.
- Coates AR, Hewitt J, Allen BW, Ivanyi J and Mitchison DA 1981. Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet* 2: 167-169.
- Codecasa L, Mantegani P, Galli L, Lazzarin A, Scarpellini P and Fortis C 2006. An in-house RD1-based enzyme-linked immunospot-gamma interferon assay instead of the tuberculin skin test for diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 44: 1944-1950.
- Colangeli R, Antinori A, Cingolani A, Ortona L, Lyashchenko K, Fadda G and Gennaro ML 1999. Humoral immune responses to multiple antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients co-infected with the human immunodeficiency virus. *Int J Tuberc Lung Dis* 3: 1127-1131.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris 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 and Barrell BG 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
- Conde MB, Suffys P, Lapa ESJR, Kritski AL and Dorman SE 2004. Immunoglobulin A (IgA) and IgG immune responses against P-90 antigen for

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

diagnosis of pulmonary tuberculosis and screening for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 94-97.

Conti AA, Lippi D and Gensini GF 2004. Tuberculosis: a long fight against it and its current resurgence. *Monaldi Arch Chest Dis* 61: 71-74.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG and Orme IM 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178: 2243-2247.

Cooper AM, Magram J, Ferrante J and Orme IM 1997. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 186: 39-45.

Cosma CL, Sherman DR and Ramakrishnan L 2003. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 57: 641-676.

Craft DW, Jones MC, Blanchet CN and Hopfer RL 2000. Value of examining three acid-fast bacillus sputum smears for removal of patients suspected of having tuberculosis from the "airborne precautions" category. *J Clin Microbiol* 38: 4285-4287.

Crump JA, Tanner DC, Mirrett S, McKnight CM and 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* 41: 1987-1990.

Daffe M and Draper P 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* 39: 131-203.

Daniel TM 2006. The history of tuberculosis. *Respir Med* 100: 1862-1870.

Daniel TM 1982. Robert Koch, tuberculosis, and the subsequent history of medicine. *Am Rev Respir Dis* 125: 1-3.

Dantas OM, Ximenes RA, de Albuquerque Mde F, da Silva NL, Montarroyos UR, de Souza WV, Pereira TC, Campelo AR and Rodrigues LC 2006. A case-control study of protection against tuberculosis by BCG revaccination in Recife, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 536-541.

De La Barrera SS, Finiasz M, Frias A, Aleman M, Barrionuevo P, Fink S, Franco MC, Abbate E and del CSM 2003. Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 132: 450-461.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

- de Waal Malefyt R, Yssel H and de Vries JE 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 150: 4754-4765.
- Demissie A, Leyten EM, Abebe M, Wassie L, Aseffa A, Abate G, Fletcher H, Owiafe P, Hill PC, Brookes R, Rook G, Zumla A, Arend SM, Klein M, Ottenhoff TH, Andersen P and Doherty TM 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 13: 179-186.
- Dhar N, Rao V and Tyagi AK 2004. Immunogenicity of recombinant BCG vaccine strains overexpressing components of the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 193: 19-25.
- Dietrich J, Weldingh K and Andersen P 2006. Prospects for a novel vaccine against tuberculosis. *Vet Microbiol* 112: 163-169.
- Dogra S, Narang P, Mendiratta DK, Chaturvedi P, Reingold AL, Colford JM, Jr., Riley LW and Pai M 2006. Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect* 54: 267-276.
- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V and Raviglione MC 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama* 282: 677-686.
- Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM and Raviglione MC 2005. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *Jama* 293: 2767-2775.
- el-Kalouby AH, Amer R, Abdel-Wahab MF and el-Raziky EH 1979. Delayed hypersensitivity to specific antigen and heterologous PPD antigen in patients infected with *Schistosoma mansoni* and/or *Schistosoma haematobium*. *Egypt J Bilharz* 6: 43-49.
- Farhat M, Greenaway C, Pai M and Menzies D 2006. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 1192-1204.
- Felix R and Bittner RC 1995. [Tuberculosis and radiologic diagnosis 100 years after W. C. Roentgen]. *Pneumologie* 49 Suppl 3: 657-662.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

- Ferguson JS, Weis JJ, Martin JL and Schlesinger LS 2004. Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect Immun* 72: 2564-2573.
- Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, Meccugni B, Dori IM, Andreani A, Bergamini BM, Mussini C, Rumpianesi F, Fabbri LM and Richeldi L 2006. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 367: 1328-1334.
- Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, Langenberg DM, van Crevel R, Adema GJ, Ottenhoff TH, Van der Meer JW and Netea MG 2005. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 1: 279-285.
- Flores AR, Parsons LM and Pavelka MS, Jr. 2005. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology* 151: 521-532.
- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA and Bloom BR 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 178: 2249-2254.
- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ and Dye C 2003. Tuberculosis. *Lancet* 362: 887-899.
- Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding CV and Boom WH 2003. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 71: 4487-4497.
- Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek B and Van Kooyk Y 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 197: 7-17.
- Glatman-Freedman A, Mednick AJ, Lendvai N and Casadevall A 2000. Clearance and organ distribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan (LAM) in the presence and absence of LAM-binding immunoglobulin M. *Infect Immun* 68: 335-341.
- Golden MP and Vikram HR 2005. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician* 72: 1761-1768.
- Goletti D, Carrara S, Vincenti D, Saltini C, Rizzi EB, Schinina V, Ippolito G, Amicosante M and Girardi E 2006. Accuracy of an immune diagnostic assay

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

-----  
-----  
-----  
Mestrado - UFGO. 2007.

based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study. *Clin Microbiol Infect* 12: 544-550.

Gonzalez OY, Adams G, Teeter LD, Bui TT, Musser JM and Graviss EA 2003. Extra-pulmonary manifestations in a large metropolitan area with a low incidence of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 7: 1178-1185.

Gonzalez-Juarrero M, Shim TS, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP and Orme IM 2003. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 171: 3128-3135.

Gounder C, De Queiroz Mello FC, Conde MB, Bishai WR, Kritski AL, Chaisson RE and Dorman SE 2002. Field evaluation of a rapid immunochromatographic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* 40: 1989-1993.

Graham S, Das GK, Hidvegi RJ, Hanson R, Kosiuk J, Al ZK and Menzies D 2002. Chest radiograph abnormalities associated with tuberculosis: reproducibility and yield of active cases. *Int J Tuberc Lung Dis* 6: 137-142.

Greenaway C, Lienhardt C, Adegbola R, Brusasca P, McAdam K and Menzies D 2005. Humoral response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with tuberculosis in the Gambia. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 1112-1119.

Greenbaum M, Beyt BE, Jr. and Murray PR 1980. The accuracy of diagnosing pulmonary tuberculosis at a teaching hospital. *Am Rev Respir Dis* 121: 477-481.

Gupta R, Espinal MA and Raviglione MC 2004. Tuberculosis as a major global health problem in the 21st century: a WHO perspective. *Semin Respir Crit Care Med* 25: 245-253.

Gupta S, Shende N, Bhatia AS, Kumar S and Harinath BC 2005. IgG subclass antibody response to mycobacterial serine protease at different stages of pulmonary tuberculosis. *Med Sci Monit* 11: CR585-588.

Hamasaki N, Isowa K, Kamada K, Terano Y, Matsumoto T, Arakawa T, Kobayashi K and Yano I 2000. In vivo administration of mycobacterial cord factor (Trehalose 6, 6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect Immun* 68: 3704-3709.

Harries AD and Dye C 2006. Tuberculosis. *Ann Trop Med Parasitol* 100: 415-431.

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

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

Heldal E, Dahle UR, Sandven P, Caugant DA, Brattaas N, Waaler HT, Enarson DA, Tverdal A and Kongerud J 2003. Risk factors for recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* 22: 637-642.

Henderson RA, Watkins SC and Flynn JL 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 159: 635-643.

Herring AC, Hernandez Y, Huffnagle GB and Toews GB 2004. Role and development of TH1/TH2 immune responses in the lungs. *Semin Respir Crit Care Med* 25: 3-10.

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

Hobday RA 1997. Sunlight therapy and solar architecture. *Med Hist* 41: 455-472.

Humphreys IR, Stewart GR, Turner DJ, Patel J, Karamanou D, Snelgrove RJ and Young DB 2006. A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection. *Microbes Infect* 8: 1339-1346.

Imaz MS and Zerbini E 2000. Antibody response to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* during and after treatment of tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 562-569.

Iseman MD 2002. Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur Respir J Suppl* 36: 87s-94s.

Ivanyi J, Bothamley GH and Jackett PS 1988. Immunodiagnostic assays for tuberculosis and leprosy. *Br Med Bull* 44: 635-649.

Jacobs M, Fick L, Allie N, Brown N and Ryffel B 2002. Enhanced immune response in *Mycobacterium bovis* bacille calmette guerin (BCG)-infected IL-10-deficient mice. *Clin Chem Lab Med* 40: 893-902.

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

Junqueira-Kipnis AP, Basaraba RJ, Gruppo V, Palanisamy G, Turner OC, Hsu T, Jr WRJ, Fulton SA, Reba SM, Boom WH and Orme IM 2006. Mycobacteria

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

lacking the RD1 region do not induce necrosis in the lungs of mice lacking interferon-gamma. *immunology 119*: 224-231.

Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Henao Tamayo M, Harton M, Gonzalez Juarrero M, Basaraba RJ and Orme IM 2005. Interleukin-10 production by lung macrophages in CBA xid mutant mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology 115*: 246-252.

Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach A, Raulet DH, Turner J and Orme IM 2003. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol 171*: 6039-6045.

Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, DesJardin LE and Schlesinger LS 2005. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med 202*: 987-999.

Kashyap RS, Dobos KM, Belisle JT, Purohit HJ, Chandak NH, Taori GM and Daginawala HF 2005. Demonstration of components of antigen 85 complex in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis patients. *Clin Diagn Lab Immunol 12*: 752-758.

Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Miyagi K, Kinjo T, Yara S, Koguchi Y, Miyazato A, Shibuya K, Iwakura Y, Takeda K, Akira S and Saito A 2004. Interferon-gamma production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes Infect 6*: 339-349.

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

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

Koch R 1882. Die aetiologie der tuberkulose. *Berl Klin Wochenschr. 19*: 221-230. [Reprint, 1932. *Am Rev Tuberc 1925*: 1285-1323].

Konomi N, Lebowitz E, Mowbray K, Tattersall I and Zhang D 2002. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. *J Clin Microbiol 40*: 4738-4740.

Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE and de Waal Malefyt R 1997. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alpha peptide complexes at the plasma

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 7: 861-871.

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

Lalloo UG, Naidoo R and Ambaram A 2006. Recent advances in the medical and surgical treatment of multi-drug resistant tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 12: 179-185.

Latchumanan VK, Balkhi MY, Sinha A, Singh B, Sharma P and Natarajan K 2005. Regulation of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigens by dendritic cells. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 377-383.

Latchumanan VK, Singh B, Sharma P and Natarajan K 2002. *Mycobacterium tuberculosis* antigens induce the differentiation of dendritic cells from bone marrow. *J Immunol* 169: 6856-6864.

Lazarevic V, Nolt D and Flynn JL 2005. Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune responses. *J Immunol* 175: 1107-1117.

Lee HW, Lee HS, Kim DK, Ko DS, Han SK, Shim YS and Yim JJ 2005. Lack of an association between interleukin-12 receptor beta1 polymorphisms and tuberculosis in Koreans. *Respiration* 72: 365-368.

Levy H, Feldman C, Sacho H, van der Meulen H, Kallenbach J and Koornhof H 1989. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 95: 1193-1197.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA and Sherman DR 2003. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis* 187: 117-123.

Liew FY 2002. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol* 2: 55-60.

Ligon-Borden BL 2003. Biography: Selman A. Waksman, PhD (1888-1973): pioneer in development of antibiotics and Nobel Laureate. *Semin Pediatr Infect Dis* 14: 60-63.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

- Lin PL, Pawar S, Myers A, Pegu A, Fuhrman C, Reinhart TA, Capuano SV, Klein E and Flynn JL 2006. Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection in cynomolgus macaques. *Infect Immun* 74: 3790-3803.
- Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R and Gennaro ML 1998a. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 66: 5344-5349.
- Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D and Gennaro ML 1998b. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun* 66: 3936-3940.
- Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R and Gennaro ML 2000. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J Immunol Methods* 242: 91-100.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC and Stover CK 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent M. bovis. *J Bacteriol* 178: 1274-1282.
- Marais BJ, Obihara CC, Gie RP, Schaaf HS, Hesselning AC, Lombard C, Enarson D, Bateman E and Beyers N 2005. The prevalence of symptoms associated with pulmonary tuberculosis in randomly selected children from a high burden community. *Arch Dis Child* 90: 1166-1170.
- Mayuri, Bagchi G, Das TK and Tyagi JS 2002. Molecular analysis of the dormancy response in *Mycobacterium smegmatis*: expression analysis of genes encoding the DevR-DevS two-component system, Rv3134c and chaperone alpha-crystallin homologues. *FEMS Microbiol Lett* 211: 231-237.
- Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B and Vernon A 2005. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep* 54: 49-55.
- McNeil M, Daffe M and Brennan PJ 1990. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J Biol Chem* 265: 18200-18206.
- Medlar EM 1955. The behavior of pulmonary tuberculous lesions; a pathological study. *Am Rev Tuberc* 71: 1-244.
- Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR and Werneck GL 2002. Epidemiologia. *Editora Atheneu*. .

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

Mikusova K, Yagi T, Stern R, McNeil MR, Besra GS, Crick DC and Brennan PJ 2000. Biosynthesis of the galactan component of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem* 275: 33890-33897.

Ministério da Saúde 2005. Projetos, Programas e Relatórios. *M.S. Secretaria de Vigilância em Saúde*. 6.

Ministério da Saúde 2002. Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica /. *M.S. Secretaria de Políticas de Saúde Departamento de Atenção Básica. Normas e Manuais Técnicos; n. 148*: 70 p.

Ministério da Saúde 2006. NOTA TÉCNICA Nº 66/CGPNI/DEVEP/SVS/MS. 24 de maio de 2006. suspensão do uso da segunda dose da vacina BCG-ID do calendário de vacinação. *Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações*.

Munoz-Elias EJ and McKinney JD 2005. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat Med* 11: 638-644.

Murray PJ and Young RA 1999. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 67: 3087-3095.

Musellim B, Erturan S, Sonmez Duman E and Ongen G 2005. Comparison of extra-pulmonary and pulmonary tuberculosis cases: factors influencing the site of reactivation. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 1220-1223.

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

Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES and Young RA 2002. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1503-1508.

Nelson SM, Deike MA and Cartwright CP 1998. Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 36: 467-469.

Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, Boom WH and Harding CV 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 167: 910-918.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

- Ohara N, Ohara-Wada N, Kitaura H, Nishiyama T, Matsumoto S and Yamada T 1997. Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 65: 3680-3685.
- Ongut G, Ogunc D, Gunseren F, Ogus C, Donmez L, Colak D and Gultekin M 2006. Evaluation of the ICT Tuberculosis test for the routine diagnosis of tuberculosis. *BMC Infect Dis* 6: 37.
- Ordway DJ, Martins MS, Costa LM, Freire MS, Arroz MJ, Dockrell HM and Ventura FA 2005a. [Increased IL-4 production in response to virulent *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients with advanced disease]. *Acta Med Port* 18: 27-36.
- Ordway DJ, Pinto L, Costa L, Martins M, Leandro C, Viveiros M, Amaral L, Arroz MJ, Ventura FA and Dockrell HM 2005b. Gamma delta T cell responses associated with the development of tuberculosis in health care workers. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43: 339-350.
- Orme M 2001. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). *Int J Tuberc Lung Dis* 5: 589-593.
- Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S and Miyazaki S 1996. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 157: 2909-2915.
- Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, Cohn DL, Lambregts-van Weezenbeek CS, Kim SJ, Chaulet P and Nunn P 1998. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med* 338: 1641-1649.
- Qamra R, Mande SC, Coates AR and Henderson B 2005. The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 385-394.
- Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yermeev V, Bihl F, Erard F, Botha T, Drennan M, Soler MN, Le Bert M, Schnyder B and Ryffel B 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* 6: 946-959.
- Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B and Brennan PJ 2004. Improved diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of free and immune complex-bound anti-30 kDa antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 50: 253-259.
- Rambukkana A, Das PK, Kolk AH, Burggraaf JD, Kuijper S and Harboe M 1993. Identification of a novel 27-kDa protein from *Mycobacterium tuberculosis*

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

culture fluid by a monoclonal antibody specific for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Scand J Immunol* 37: 471-478.

- Rausch A, Hessmann M, Holscher A, Schreiber T, Bulfone-Paus S, Ehlers S and Holscher C 2006. Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 36: 1156-1167.
- Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, Kok-Jensen A, Andersen P and 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* 12: 491-496.
- Remus N, El Baghdadi J, Fieschi C, Feinberg J, Quintin T, Chentoufi M, Schurr E, Benslimane A, Casanova JL and Abel L 2004. Association of IL12RB1 polymorphisms with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco. *J Infect Dis* 190: 580-587.
- Rhoades ER, Cooper AM and Orme IM 1995. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63: 3871-3877.
- Rhodes SG, Palmer N, Graham SP, Bianco AE, Hewinson RG and Vordermeier HM 2000. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. *Infect Immun* 68: 5393-5400.
- Riley RL, Mills CC, Nyka W, Weinstock N, Storey PB, Sultan LU, Riley MC and Wells WF 1995. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. 1959. *Am J Epidemiol* 142: 3-14.
- Rinke de Wit TF, Bekelie S, Osland A, Wieles B, Janson AA and Thole JE 1993. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins. *Infect Immun* 61: 3642-3647.
- Rosenkrands I, Weldingh K, Ravn P, Brandt L, Hojrup P, Rasmussen PB, Coates AR, Singh M, Mascagni P and Andersen P 1999. Differential T-cell recognition of native and recombinant *Mycobacterium tuberculosis* GroES. *Infect Immun* 67: 5552-5558.
- Sable SB, Kaur S, Verma I and Khuller GK 2005a. Immunodominance of low molecular weight secretory polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis* to induce cytotoxic T-lymphocyte response. *Vaccine* 23: 4947-4954.
- Sable SB, Kumar R, Kalra M, Verma I, Khuller GK, Dobos K and Belisle JT 2005b. Peripheral blood and pleural fluid mononuclear cell responses to low-

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

molecular-mass secretory polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis* in human models of immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 73: 3547-3558.

Sable SB, Verma I and Khuller GK 2005c. Multicomponent antituberculous subunit vaccine based on immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 23: 4175-4184.

Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK and Rich EA 1998. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 513-521.

Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J and Holcomb TA 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2091-2094.

Samanich K, Belisle JT and Laal S 2001. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immun* 69: 4600-4609.

Samanich KM, Belisle JT, Sonnenberg MG, Keen MA, Zolla-Pazner S and Laal S 1998. Delineation of human antibody responses to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 178: 1534-1538.

Saunders BM, Frank AA, Cooper AM and Orme IM 1998. Role of gamma delta T cells in immunopathology of pulmonary *Mycobacterium avium* infection in mice. *Infect Immun* 66: 5508-5514.

Saunders BM, Frank AA, Orme IM and Cooper AM 2002. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. *Cell Immunol* 216: 65-72.

Saunders BM, Frank AA, Orme IM and Cooper AM 2000. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 68: 3322-3326.

Schlesinger LS 1996a. Role of mononuclear phagocytes in *M. tuberculosis* pathogenesis. *J Investig Med* 44: 312-323.

Schlesinger LS 1996b. Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 215: 71-96.

Selvaraj P, Sriram U, Mathan Kurian S, Reetha AM and Narayanan PR 2001. Tumour necrosis factor alpha (-238 and -308) and beta gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, B and DR genes. *Tuberculosis (Edinb)* 81: 335-341.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

-----  
-----  
-----  
Mestrado - UFGO. 2007.

- Serbina NV, Lazarevic V and Flynn JL 2001. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 167: 6991-7000.
- Sharma S, Sharma M, Roy S, Kumar P and Bose M 2004. *Mycobacterium tuberculosis* induces high production of nitric oxide in coordination with production of tumour necrosis factor-alpha in patients with fresh active tuberculosis but not in MDR tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 82: 377-382.
- Singh KK, Dong Y, Belisle JT, Harder J, Arora VK and Laal S 2005. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* recognized by antibodies during incipient, subclinical tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 354-358.
- Singh KK, Dong Y, Hinds L, Keen MA, Belisle JT, Zolla-Pazner S, Achkar JM, Nadas AJ, Arora VK and Laal S 2003. Combined use of serum and urinary antibody for diagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis* 188: 371-377.
- Smith CV, Sharma V and Sacchetti JC 2004. TB drug discovery: addressing issues of persistence and resistance. *Tuberculosis (Edinb)* 84: 45-55.
- Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P and Andersen AB 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63: 1710-1717.
- Sousa AO, Wagnier A, Poincignon Y, Simonney N, Gerber F, Lavergne F, Herrmann JL and Lagrange PH 2000. Kinetics of circulating antibodies, immune complex and specific antibody-secreting cells in tuberculosis patients during 6 months of antimicrobial therapy. *Tuber Lung Dis* 80: 27-33.
- Squire SB, Obasi A and Nhlema-Simwaka B 2006. The Global Plan to Stop TB: a unique opportunity to address poverty and the Millennium Development Goals. *Lancet* 367: 955-957.
- Starke JR 2004. Tuberculosis in children. *Semin Respir Crit Care Med* 25: 353-364.
- Stead WW 1997. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med* 18: 65-77.
- Stewart GR, Patel J, Robertson BD, Rae A and Young DB 2005. Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog* 1: 269-278.
- Surcel HM, Troye-Blomberg M, Paulie S, Andersson G, Moreno C, Pasvol G and Ivanyi J 1994. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology* 81: 171-176.

Taggart EW, Hill HR, Ruegner RG and Litwin CM 2006. Evaluation of an in vitro assay for interferon gamma production in response to the *Mycobacterium tuberculosis*-synthesized peptide antigens ESAT-6 and CFP-10 and the PPD skin test. *Am J Clin Pathol* 125: 467-473.

Takashima T, Ueta C, Tsuyuguchi I and Kishimoto S 1990. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 58: 3286-3292.

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

Thompson JS, Severson CD, Stearns NA and Kasik JE 1972. Immunological distinction of mycobacterial beta-lactamases. *Infect Immun* 5: 542-546.

Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A and Ernst JD 1999. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol* 163: 3898-3906.

Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C, Tufariello J, Flynn J and Chan J 2006. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol* 8: 218-232.

Tufariello JM, Chan J and Flynn JL 2003. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 3: 578-590.

Turner M, Van Vooren JP, De Bruyn J, Serruys E, Dierckx P and Yernault JC 1988. Humoral immune response in human tuberculosis: immunoglobulins G, A, and M directed against the purified P32 protein antigen of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Clin Microbiol* 26: 1714-1719.

Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM and Cooper AM 2002. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol* 169: 6343-6351.

Ulrichs T and Porcelli SA 2000. CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet* 2: 416-432.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

- van Cleeff MR, Kivihya-Ndugga LE, Meme H, Odhiambo JA and Klatser PR 2005. The role and performance of chest X-ray for the diagnosis of tuberculosis: a cost-effectiveness analysis in Nairobi, Kenya. *BMC Infect Dis* 5: 111.
- Voladri RK, Lakey DL, Hennigan SH, Menzies BE, Edwards KM and Kernodle DS 1998. Recombinant expression and characterization of the major beta-lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1375-1381.
- Vordermeier HM, Venkataprasad N, Harris DP and Ivanyi J 1996. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. *Clin Exp Immunol* 106: 312-316.
- Waksman SA 1950. [Antibiotics in human therapy, with particular reference to tuberculosis.]. *Minerva Med* 41: 157-159.
- Walton C, Hawkey PM and James VL 2005. Examination of specimens for mycobacteria in clinical laboratories in 21 countries: a 10-year review of the UK National Quality Assessment Scheme for Mycobacteria Culture. *Clin Microbiol Infect* 11: 1016-1021.
- Wang BL, Xu Y, Li ZM, Xu YM, Weng XH and Wang HH 2005. Antibody response to four secretory proteins from *Mycobacterium tuberculosis* and their complex antigen in TB patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 1327-1334.
- Wayne LG and Hayes LG 1996. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun* 64: 2062-2069.
- Welsh MD, Cunningham RT, Corbett DM, Girvin RM, McNair J, Skuce RA, Bryson DG and Pollock JM 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 114: 101-111.
- Wilson RA, Maughan WN, Kremer L, Besra GS and Futterer K 2004. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. *J Mol Biol* 335: 519-530.
- Wilson RA, Rai S, Maughan WN, Kremer L, Kariuki BM, Harris KD, Wagner T, Besra GS and Futterer K 2003. Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of *Mycobacterium tuberculosis* FbpC1 (Rv3803c). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59: 2303-2305.
- World Health Organization 2006. The stop TB strategy. Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. *WHO/HTM/STB/2006.37*.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do *M. tuberculosis* por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR and Barry CE, 3rd 1998. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9578-9583.

Yusuph H, Garbati MA and Gashau W 2005. Mantoux reaction in patients with HIV-related pulmonary tuberculosis in Maiduguri, Nigeria. *Afr J Med Med Sci* 34: 125-128.

Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H and Nerlich AG 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 41: 359-367.

## 9. ANEXOS.

### 9.1. Anexo 1. Termo de Consentimento dos Voluntários.

#### 9.1.1. Controles Saudáveis.

##### UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. IPTSP

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia - GO. CEP 74605-050  
Fone (062)3521.1837 - 3209.6102 - FAX (062)3521.1839

##### Consentimento de Participação na pesquisa

Título do projeto: **Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos pela resposta imune de pacientes tuberculosos.**

Nome do pesquisador responsável: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis, DVM, Ph.D.  
Contato para problemas e dúvidas decorrentes desta pesquisa: Dr. João Alves de Araújo Filho, Médico, telefone: 62 3225-4971.

Você está sendo convidado a participar, voluntariamente, em uma pesquisa que será conduzida na Universidade Federal de Goiás (Goiânia-Goiás). Esta pesquisa tentará identificar proteínas do *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria que causa a doença tuberculose) que são reconhecidas pelo sangue (soro e células) de pessoas saudáveis e pacientes com tuberculose.<sup>1</sup>

O pesquisador gastará aproximadamente 20 minutos com você para: a) explicar o motivo da pesquisa, anotar algumas informações sobre o seu estado de saúde atual e pedir o seu consentimento para participar neste projeto. Neste período, um questionário será preenchido para facilitar a análise dos resultados futuramente. b) o seu sangue será coletado (20 mL). Você pode retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que haja qualquer prejuízo (Goiânia, Goiás, Brasil).

Embora não exista nenhum risco em potencial durante a coleta de sangue, algumas vezes podem ocorrer vermelhidão e dor no local da coleta. Algumas pessoas podem desmaiar durante a coleta. Se isto acontecer interromperemos a sua participação imediatamente. Para coletar o seu sangue, o seu braço será limpo e esterilizado com álcool, depois de garrotear a parte superior do seu braço o sangue será coletado usando agulha e seringas estéreis. Para a coleta, será usada uma seringa de 20 mL. Não é possível identificar todos os problemas que podem ocorrer durante esse procedimento, mas nós (médico, enfermeira e o pesquisador) tomamos todas as medidas para minimizar os riscos desconhecidos desse procedimento.

Os resultados sobre a sua saúde e dos testes realizados com o seu sangue serão mantidos confidenciais pela pesquisadora responsável. Os seus dados pessoais não serão revelados em nenhum momento. Os resultados deste estudo serão publicados numa revista científica internacional.

##### Participação

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Se você decidir participar deste estudo, você poderá desistir a qualquer momento sem que você seja penalizado. A sua assinatura provará que você leu, entendeu e deu o seu consentimento para participar desta pesquisa. Sua assinatura também provará que você está recebendo uma cópia deste documento.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

-----  
-----  
-----  
Mestrado - UFGO. 2007.

Nome do participante (letra de forma)

Testemunha: nome e RG

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Data

### **9.1.2. Pacientes com Tuberculose.**

#### **UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. IPTSP**

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia – GO.CEP 74605-050

Fone (062)3521.1837 – 3209.6102 - FAX (062)3521.1839

#### **Consentimento de Participação na pesquisa**

Título do projeto: **Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos pela resposta imune de pacientes tuberculosos.**

Nome do pesquisador responsável: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis, DVM, Ph.D.  
Contato para problemas e dúvidas decorrentes desta pesquisa: Dr. João Alves de Araújo Filho, Médico, telefone: 62 3225-4971.

Você está sendo convidado a participar, voluntariamente, em uma pesquisa que será conduzida na Universidade Federal de Goiás (Goiânia-Goiás). Esta pesquisa tentará identificar proteínas do *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria que causa a doença tuberculose) que são reconhecidas pelo sangue (soro e células) de pessoas saudáveis e pacientes com tuberculose. <sup>1</sup>

O pesquisador gastará aproximadamente 20 minutos com você para: a) explicar o motivo da pesquisa, anotar algumas informações sobre o seu estado de saúde atual e pedir o seu consentimento para participar neste projeto. Neste período, um questionário será preenchido para facilitar a análise dos resultados futuramente. b) o seu sangue será coletado (20 mL). Se você decidir não participar da pesquisa, você não terá seu tratamento ou assistência interrompida. Você pode retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que o seu tratamento ou acompanhamento pelo Hospital de Doenças Tropicais seja interrompido (Goiânia, Goiás, Brasil).

Embora não exista nenhum risco em potencial durante a coleta de sangue, algumas vezes podem ocorrer vermelhidão e dor no local da coleta. Algumas pessoas podem desmaiar durante a coleta. Se isto acontecer interromperemos a sua participação imediatamente. Para coletar o seu sangue, o seu braço será limpo e esterilizado com álcool, depois de garrotear a parte superior do seu braço o sangue será coletado usando agulha e seringas estéreis. Para a coleta, será usada uma seringa de 20 mL. Não é possível identificar todos os problemas que podem ocorrer durante esse procedimento, mas nós (médico, enfermeira e o pesquisador) tomamos todas as medidas para minimizar os riscos desconhecidos desse procedimento.

Os resultados sobre a sua saúde e dos testes realizados com o seu sangue serão mantidos confidenciais pela pesquisadora responsável. Os seus dados pessoais não serão revelados em nenhum momento. Os resultados deste estudo serão publicados numa revista científica internacional.

#### **Participação**

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Se você decidir participar deste estudo, você poderá desistir a qualquer momento sem que você seja penalizado ou perca a sua assistência no Hospital de Doenças Tropicais. A sua assinatura provará que você leu, entendeu e deu o seu consentimento para participar desta pesquisa. Sua assinatura também provará que você está recebendo uma cópia deste documento.

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

Nome do participante (letra de forma)

Testemunha: nome e RG

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Data

**9.1.3. Pacientes com Hanseníase.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. IPTSP**

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia - GO.CEP 74605-050

Fone (062)3521.1837 - 3209.6102 - FAX (062)3521.1839

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

**PROJETO HANSENÍASE/ ESTUDO DE PREPARAÇÕES DE BCG**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Estamos avaliando preparações de BCG para possível uso como forma de tratamento da hanseníase. Esclarecemos que essas preparações utilizadas são de uso corrente na vacinação de crianças contra tuberculose e no tratamento de alguns tipos de câncer.

Solicitamos o seu consentimento para inclui-lo neste grupo de estudo e para divulgar os resultados obtidos em revistas especializadas e Congresso. Esclarecemos que seu nome não será revelado em momento algum.

Caso você concorde em participar, você deverá fazer os exames solicitados: coletas de sangue.

Se você não quiser participar, não há nenhum procedimento (coletas de sangue).

Declaro ter explicado em detalhes os procedimentos descritos acima, inclusive os riscos inerentes ao mesmo ao Sr(a) \_\_\_\_\_.

## 9.2. Anexo 2. Questionário Aplicado aos Voluntários.

### 9.2.1. Controles Saudáveis.

#### Registro número:

**Questionário do Projeto:** Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress.

#### Dados:

Nome:

Data admissão:

Número na pesquisa:

Data nascimento:

Idade: [] anos

Endereço:

Fone:

Cor pele:

Sexo: F[] M[]

Profissão:

#### Anamnese:

Teve contato com TB ativa?

Sim [] Não [] Não sabe []

Teve contato com hanseníase?

Sim [] Não [] Não sabe []

**BCG:** Sim [] Não [] número de doses: []

Data da última dose:

**PPD:** Sim [] Não [] Resultado [] mm

**Uso de medicamentos:** Sim [] Não [] Qual?

Data início:

Complicações:

#### Doenças:

Prévia : sim [] não [] Qual?

Crônica: sim [] não [] Qual?

Doença pulmonar? sim [] não [] Alergia? sim [] não []

Nos últimos dias teve: Febre? sim [] não [] Dores musculares? sim[] não[]

Está gripado ou resfriado? sim [] não []

Fumante? sim [] não [] Etilista? sim [] não []

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.

**9.2.2. Pacientes com Tuberculose**

**Prontuário número:**

**Questionário do Projeto:** Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress.

**Dados:**

Nome:  
Data admissão: Número na pesquisa:  
Data nascimento: Idade: [] anos  
Endereço:  
Fone: Cor pele: Sexo: F[] M[]  
Profissão: Hipótese diagnóstico:

**Exames:**

Escarro: **AAFB** + [] - []  
Biopsia: Resultado: pos. [] neg. [] Tecido:  
Cultura: Resultado: pos. [] neg. [] Meio:  
HIV: Resultado: pos. [] neg. []  
PPD: [] mm Outros:  
*Mycobacterium*

Teve contato com TB ativa? Sim [] Não [] Não sabe []  
Teve contato com hanseníase? Sim [] Não [] Não sabe []  
**BCG:** Sim [] Não [] número de doses: [] Data da última dose:

**TB ativa no momento?** Sim [] Não [] Não sabe [] Data do início:  
É tuberculose primária? Sim [] Não [] Não sabe []  
Lesão Cavitária: [] Área afetada:  
Não cavitária: [] Pleural: [] Outra:

**História prévia de TB** Com que idade? [] anos  
Foi uma tuberculose primária? Sim [] Não [] Não sabe []  
Existe evidência de lesões? Sim [] Não [] Não sabe []

**Tratamento anti TB** Data de início:  
INH: Sim [] Não [] Não sabe [] ETH: Sim [] Não [] Não sabe []  
RIF: Sim [] Não [] Não sabe [] PYZ: Sim [] Não [] Não sabe []  
STP: Sim [] Não [] Não sabe []

**Resultado da quimioterapia**

Ainda no tratamento? Curado [] Voltou [] Morte []  
Uso de corticóide? Sim [] Não [] Qual?  
Data início: Complicações:

**Doenças:**

Concomitante: Sim [] Não [] Qual?

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

Prévia:	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Qual?
Crônica:	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Qual?

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.

**9.2.3. Pacientes com Hanseníase.**

**Prontuário número:**

**Questionário do Projeto:** Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress.

**Dados:**

Nome:

Data admissão:

Número na pesquisa:

Data nascimento:

Idade: [] anos

Endereço:

Fone:

Cor pele:

Sexo: F[] M[]

Profissão:

Hipótese diagnóstico:

**Dados familiares:**

Nome do pai:

Nome da mãe:

Possui filhos: Sim[] Não[] Relacionar: \_\_\_\_\_

Possui irmãos: Sim [] Não[] Relacionar: \_\_\_\_\_

**Dados relacionados à doença:**

Data início da doença:

Forma clínica: Indeterminada [] Tuberculoíde [] Difusa [] Virchoviana []

Evolução da doença para alguns pólos: \_\_\_\_\_

Doenças associadas: \_\_\_\_\_

Teve contato com TB ativa? Sim [] Não [] Não sabe []

Teve contato com hanseníase? Sim [] Não [] Não sabe []

**BCG:** Sim [] Não [] número de doses: [] Data da última dose: \_\_\_\_\_

**Diagnóstico clínico e laboratorial:**

Clínico: Sim [] Não [] Baciloscopia-BAAR: Sim [] Não []

Histopatologia: Sim [] Não [] Tecido: \_\_\_\_\_

Patologia: \_\_\_\_\_ Laudo: \_\_\_\_\_

Teste Mitsuda: Resultado: Positivo [] Negativo []

Teste intradérmico: \_\_\_\_\_

Exames laboratoriais complementares: \_\_\_\_\_

**Tratamento:**

Data de início:

Medicação atual e doses: \_\_\_\_\_

Intercorrências durante o tratamento:

Reação tipo I: Sim [] Não [] Reação tipo II: Sim [] Não [] Internações: Sim [] Não []

Fenômeno de Lúcio: Sim [] Não [] medicações: \_\_\_\_\_

**Resultado da quimioterapia**

Ainda no tratamento? Curado [] Voltou [] Morte []

**Doenças:**

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

Concomitante: Sim       Não                       Qual?  
Prévia:              Sim       Não                       Qual?  
Crônica:              Sim       Não                       Qual?

### **9.3. Anexo 3. Documentos Referentes a Aprovação do Projeto de Pesquisa.**

#### ***9.3.1. Parecer da Diretoria do IPTSP***

#### **UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. IPTSP**

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia – GO.CEP 74605-050  
Fone (062)3521.1837 – 3209.6102 - FAX (062)3521.1839

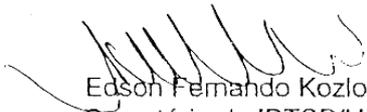
Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

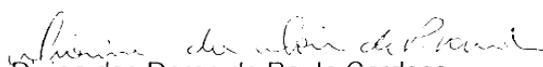
## C E R T I D ã O

Certificamos que em reunião do Conselho Diretor do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, realizada no dia 27 de outubro de 2004, foram discutidos e aprovados os seguintes projetos de pesquisa: "Perfil sócio-demográfico e clínico epidemiológico dos pacientes portadores de infecção HIV/aids atendidos no Serviço de Atendimento Especializado (SAE), Goiânia, de 2001-2004" - Responsável: Profª. Ms. Ana Maria de Oliveira; "Prevalência de microorganismos Gram-negativos produtores de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL) em sítios estéreis em Hospitais de Goiânia " – Responsável: Profª. Drª. Fabiana Cristina Pimenta; "Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do Mycobacterium tuberculosis induzidos pela resposta imune de pacientes tuberculosos" - Responsável: Profª. Drª. Ana Paula Junqueira Kipnis; "Atividade Antimicrobiana do Álcool Etílico 70,0% em Canetas Odontológicas de Alta Rotação" – Responsável: Prof. Dr. Cleômenes Reis.

Goiânia, 28 de outubro de 2004

  
Edson Fernando Kozlowski  
Secretário do IPTSP/UFG

Tendo em vista Certidão expedida, encaminhe-se à Profª. Drª.  
Lucimeire Antonelli da Silveira, para os devidos fins.

  
Profª. Drª. Divina das Dores de Paula Cardoso  
Diretora do IPTSP/UFG

### **9.3.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa- UFGO.**

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.



PROTOCOLO Nº 01  
26/01/2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

I - Identificação:

• Título do projeto: Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress pela resposta imune de pacientes tuberculosos.

- Pesquisador Responsável: Ana Paula Junqueira Kipinis
- Instituição responsável: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG
- Data de apresentação ao COEP: 26/01/2005

II - Objetivos:

Identificar antígenos protéicos de *M. tuberculosis* capazes de discriminar pacientes tuberculosos de saudáveis. Determinar o padrão de reconhecimento destes antígenos por células T CD4/CD8, selecionar antígenos candidatos à vacina.

III - Sumário do projeto:

• Descrição e caracterização da amostra:

Pacientes tuberculosos recrutados no ambulatório de tuberculose do Hospital de Doenças Tropicais.

Os controles serão controlados entre funcionários, estudantes e/ou estagiários do HDT ou IPTSP.  
Critérios de inclusão e exclusão: Serão 50 pacientes:

- 1) tuberculosos com tuberculose pulmonar com idade de 30 a 60 com diagnóstico comprovado pela reação positiva ao PPD RT 23
- 2) Pacientes com outras doenças que acometem o pulmão
- 3) Pacientes hansênicos.
- 4) Pacientes controles com idade e sexo pareados para cada paciente com tuberculose.

Adequação da metodologia:

Adequada para o objetivo proposto.

Adequação das condições:

adequado

IV - Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:

O projeto visa a caracterização de antígenos para futuros candidatos a vacinas a tuberculose *in vivo* e *in vitro*. Os laboratórios envolvidos possuem as condições necessárias para o desenvolvimento do projeto. A identificação de antígenos candidatos a vacina não fornecerá um benefício direto ao do

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....  
Mestrado - UFGO. 2007.

paciente (além da informação do número de células CD4 e CD8 em seu sangue), como é esclarecido no termo de consentimento, porém poderá fornecer grandes benefícios à comunidade. O paciente será acompanhado e tratado da mesma forma, independente de participar ou não do projeto, sendo garantido o sigilo de sua identidade. A coleta de 20 mL de sangue do paciente oferece um risco mínimo para este, portanto, a análise de riscos e benefícios justifica a execução do trabalho. Os pesquisadores mencionam a utilização de soro estocado de pacientes com hanseníase, entretanto, não apresenta um termo de consentimento Livre e esclarecido para utilização destes soros no projeto atual. A não utilização destes soros não compromete a pesquisa, porém, os pesquisadores devem enviar ao comitê de ética da UFG o TCLO demonstrando que os pacientes estão cientes da utilização destes soros, caso queiram utilizá-lo.

Diante do exposto, sou favorável a aprovação do mesmo.

VI – Data da reunião: 25/02/2005

Assinatura do relator:

Assinatura do Coordenador/COEP:



Assinatura:

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

***9.3.3. Parecer do SUS e Secretaria de Ciências e Tecnologia do Estado de Goiás.***

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos                      do                      M.                      tuberculosis                      por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

Goiânia, 04 de março de 2005

Sra. Pesquisadora  
ANA PAULA KIPINIS  
Proponente de Projeto no Programa Pesquisa para o SUS - C&T em Saúde em  
Goiás

Prezada Pesquisadora!

Com satisfação vimos comunicar que seu projeto intitulado  
/Caracterização dos antígenos proteicos naturais e recombinantes do  
~~Mycobacterium tuberculosis pela resposta imune de pacientes tuberculosos~~  
atendidos pelo Sistema Único de Saúde de Goiânia/ foi APROVADO, com  
valor integral, conforme solicitado.  
Estaremos proximamente convocando para concretizar a concessão dos  
recursos solicitados, tão logo sejam disponibilizados.  
Recomendamos providenciar documentação, conforme exigências do Edital.

Atenciosamente

Comitê Gestor  
Pesquisa para o SUS - C&T em Saúde Goiás  
SECTEC-GO

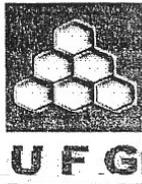
--

Esta mensagem foi verificada pelo sistema de antivírus e  
acredita-se estar livre de perigo.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO ESPORTE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
Rua 235, S/N- Setor Universitário - Goiânia-GO - CEP 74605-050- Fone:(062) 209-6103/09

Ofício nº 069/05

Goiânia, 15 de março de 2005

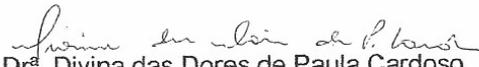
Da Diretora do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG  
À Dep. Profª. Raquel Teixeira  
MDª. Secretária de Ciências e Tecnologia do Estado de Goiás  
Assunto: Termo de aceitação

Senhora Secretária,

Juntamente com nossos cumprimentos, apresentamos a V. Sª. o presente Termo de Aceitação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como Instituição executora do projeto "Caracterização dos antígenos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress pela resposta imune de pacientes tuberculosos atendidos pelo SUS - Goiânia", sob a responsabilidade da Pesquisadora Profª. Drª. Ana Paula Junqueira Kipnis.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos,

Atenciosamente,

  
Profª. Drª. Divina das Dores de Paula Cardoso  
Diretora do IPTSP/UFG

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

**9.4. Anexo 4. Documentos Referentes à Parceria entre a Universidade e as Unidades de Saúde.**

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA  
Rua Delenda Rezende de Melo - S/N - Setor Universitário - 74605-050 - Goiânia - Goiás  
Tel. (062) 261.64.97 - Ramal 218 - FAX: (062) 202.30.66

Goiânia, 10 de junho de 1999.

Ao Dr. Boaventura Braz Queiroz  
Diretor Geral do Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia.

Da Prof.a Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis,  
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- UFG.

Senhor Diretor,

Venho por meio desta solicitar a avaliação do projeto:

*Interações BACILOS CALMETTE-GUERIN e o Sistema Imune: Sistema Complemento, macrófagos e linfócitos normais e de pacientes com Tuberculose e Hanseníase* pela Comissão de Ética deste Hospital. O sub - projeto 3: Avaliação da eficácia imunoprolifática das diferentes formas de BCG na Hanseníase (pacientes e contactantes) será realizado com pacientes atendidos pelo HDT e estará sob minha coordenação direta e a seleção dos pacientes sob coordenação do Prof. Aízar Chaul.

Certa de contar com Vossa prestimosa atenção,

Agradeço antecipadamente.

Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis.

anexo  
1/ Com. Ensino Rg  
e  
Com. Ética  
Boaventura

Dr. Kipnis  
Com. Ética  
1/ Com. Ensino Rg  
14.0  
Chefe Divisão de Ensino e Pesquisa

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.



Sistema Único de Saúde  
Ministério da Saúde  
Governo do Estado de Goiás  
HOSPITAL DR. ANUAR AUAD/HDT

**PARECER**

Goiânia, 06 de Setembro de 1999.

DA : Diretoria Geral  
À : Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Junqueira Kipnis – UFG – IPTSP

Somos favorável ao seu projeto sobre : Interações  
Bacilos Calmette - Guerin e o Sistema Imuni, em pacientes com Tuberculose  
e Hanseníase.

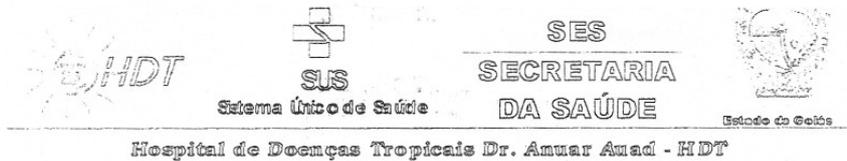
Informamos que o mesmo será de grande valor para  
esta Unidade.

Atenciosamente,

  
Dr. Boaventura Bráz de Queiroz  
Diretor Geral

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.



5.

C.I. n° 104/2006-DEP/HDT

Goiânia, 16 de agosto de 2006

Da: Divisão de Ensino e Pesquisa  
Para: DEAM

FG para  
ação dos  
erculosis

Encaminhamos a aluna Cristina de Melo Cardoso mestranda da UFGO para realizar coleta de dados em prontuários referente ao projeto: "Caracterização de antígenos protéicos naturais e recombinantes do Mycobacterium tuberculosis induzidos pela resposta imune de pacientes tuberculosos".

Atenciosamente,



Célia Rita de Oliveira Paes

Coordenadora de Ensino e Pesquisa - HDT

Missão: Oferecer Assistência especializada na área de doenças infecciosas, dentro do contexto público visando a reintegração do paciente e promover o conhecimento científico.

Visão: Ser um serviço de excelência em infectologia, uma das referências mencionadas no tratamento de saúde de doenças infecciosas, pautando-se pela alta resolutividade diagnóstica e terapêutica.

Hospital Dr. Anuar Anad  
Av. Contorno n.º 3556 Jardim Bela Vista – Goiânia-GO – Fone/Fax: (62) 3249-3122

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos        do        M.        *tuberculosis*        por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

Almeida, C. M. C. Reconhecimento de  
Antígenos do M. tuberculosis por  
Anticorpos.

Mestrado - UFGO. 2007.

Goiânia, 9 de Agosto de 2005.

Da Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis  
Biotério do IPTSP-UFG/  
Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas  
62 2096126

Para Profa. Dra. Maria Oliveira da Silva  
Diretora Geral do CRDT Municipal

Goiânia Goiás

Prezada Senhora,

A par de nossos cumprimentos, gostaríamos de solicitar a colaboração de vossa  
mã no sentido de viabilizar coletas de sangue e informações epidemiológicas para o  
o: **Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do  
bacterium tuberculosis induzidos em condições de stress pela resposta imune de  
ites tuberculosos.** Este projeto encontra-se devidamente aprovado por comitê de  
em pesquisa da UFG e tem como objetivo testar novos antígenos protéicos de *M.*  
*ulosis* como candidatos ao diagnóstico precoce da doença e para uma nova vacina  
tuberculose.

Para a realização deste projeto, aprovado e financiado pela MCT/SETEC/SUS,  
mos ter acesso aos pacientes com tuberculose pulmonar, assim como pacientes  
nças endêmicas correlacionadas à tuberculose (hanseníase) e com outras doenças  
res gerais da cidade de Goiânia. Estes indivíduos serão convidados a participar  
lo, caso seja consentido e assinado, um questionário epidemiológico será  
do e seu sangue será coletado para as análises posteriores. Neste centro de  
a, precisaremos de um espaço físico para a realização dos procedimentos  
riormente e o acesso aos pacientes assistidos no período de agosto de 2005 a  
8.

de poder contar com Vossa Prestimosa atenção,  
eço antecipadamente,

Prof. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis  
anapaula@iptsp.ufg.br

Laboratório de imunopatologia das doenças infecciosas.

Dr. Maria Oliveira da Silva  
Diretora Geral  
CRBM - 169 CPF: 189.525.851-00  
CRDT - Municipal

SMS-CRDT  
CORRESPONDÊNCIA RECEBIDA  
EM: 09/08/05  
ASSINATURA

Almeida, C. M. C.                      Reconhecimento de  
Antígenos        do        M.        *tuberculosis*        por  
Anticorpos.

.....  
.....  
.....

Mestrado - UFGO. 2007.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)