

## **TESTEMUNHA DA TUBERCULOSE: ANTIGENO LIPOARABINOMANNAN**

### **1. Apresentação**

Este estudo avaliou aspectos da imunidade humoral na tuberculose, através de um teste de reação antígeno-anticorpo IgG. O antígeno, componente da parede celular da micobactéria, altamente purificado, é denominado LIPOARABINOMANNAN. Este teste foi operacionalizado com a utilização de um kit denominado MycoDot, proveniente da companhia DYNA-GEN, adquirido em Cambridge, Massachussets, Estados Unidos da América.

O estudo arrolou 173 pacientes portadores de tuberculose doença, confirmados (1) por exame bacteriológico, (2) estudos anatomopatológicos, e (3) por criteriosa suspeita clínica, laboratorial e radiológica, seguidos de acompanhamento evolutivo após início de tratamento específico. O delineamento do estudo foi o de um teste diagnóstico.

A série constitui-se de pacientes com tuberculose (1) pulmonar, (2) extrapulmonar e (3) ambas, com ou sem comorbidades, incluindo pacientes HIV soropositivos.

O grupo controle incluiu 77 pacientes assim distribuídos: (1) pacientes com seqüela de tuberculose (1.1) sugerido por radiograma de tórax, (1.2) história de tratamento específico, (2) pacientes com outras comorbidades, (3) indivíduos hígidos com (3.1) BCG prévia e (3.2) sem BCG prévia.

Foram colhidas amostras séricas e aplicado o teste MycoDot em toda a série de pacientes e controles. Os resultados foram qualitativos, com expressão de positividade ou negatividade.

Este estudo teve o propósito de avaliar um método adicional para o diagnóstico de tuberculose, explorando a imunidade humoral, que poderá constituir-se em um recurso auxiliar, de maior utilidade nos casos com baciloscopia negativa e nas formas extrapulmonares da doença.

## **2. Resumo**

O estudo pretendeu abordar a imunidade humoral na Tuberculose. Foi um estudo de teste diagnóstico que avaliou um antígeno específico, constituinte da parede celular da micobactéria, denominado LIPOARABINOMANNAN (LAM), proveniente de Cambridge, MA, USA da Companhia Dyna-Gen.

O objetivo principal do estudo foi a detecção de anticorpos IgG anti-LAM em casos de tuberculose pulmonar, extrapulmonar e formas combinadas da doença.

A casuística total compreendeu 173 pacientes portadores de tuberculose, sendo a mesma confirmada por métodos bacteriológicos e/ou anatomopatológicos de biópsias de diversos órgãos em 114 casos (65,8%). Em 46 casos (26,5%) a doença se confirmou por rigorosos critérios clínicos, radiológicos e de seguimento após tratamento adequado.

Cento e quinze pacientes eram do sexo masculino (66,5%) e 58 do sexo feminino (33,5%). Cento e trinta e um eram brancos (75,7%), 24 negros (13,9%) e 18 mistos (10,4%).

O total de formas pulmonares foi de 88 casos (51%), sendo 81 (46,8%) formas bacilíferas e 7 casos (4,0%) não-bacilíferas. Dos casos com baciloscopia direta negativa, 3 apresentaram culturas positivas, 2 culturas negativas e em 2 casos a mesma não foi realizada. Formas extrapulmonares compreenderam 71 casos (41%) com predomínio de forma miliar, ganglionar, pleural e do SNC. A combinação de ambas as formas ocorreu em 14 casos (8,1%). Radiologicamente, houve predomínio de lesões escavadas (30,1%),

consolidação (13,9%), padrão miliar (11%) e exame radiológico normal (11%), além de outros achados.

Da série, 118 pacientes eram HIV negativos (68,2%) e 55 eram HIV positivos (31,8%). As principais comorbidades associadas foram *Diabetes Mellitus* (DM), Alcoolismo, Cardiopatia e Neoplasia, entre outras.

Exames culturais foram realizados em 145 pacientes, sendo que em 72 casos a cultura foi positiva (41,6%) e foi negativa em 10 casos (5,8%). Dos 72 exames culturais positivos, o teste do MycoDot foi positivo em 47 casos (65,2%) e negativo em 25 (34,7%). Em 10 exames culturais negativos, o mesmo foi positivo em 6 casos (60%) e negativo em 4 casos (40%). Em 63 exames culturais não realizados, o teste do MycoDot foi positivo em 46 casos e negativos em 17.

Os resultados do teste MycoDot na série total foram: positivos em 120 pacientes (69,4%) e negativos em 53 pacientes (30,6%). As formas pulmonares bacilíferas, não bacilíferas, extrapulmonares e combinadas apresentaram sensibilidade de 74,1%, 85,7%, 63,4% e 64,3% respectivamente.

O grupo controle foi de 77 indivíduos assim distribuídos: 41 sadios, 16 portadores de lesões residuais de tuberculose, 6 sadios com BCG prévia, 6 sadios sem BCG prévia e 8 com outras comorbidades. O resultado do teste MycoDot foi negativo em 73 casos (94,8%) e positivo em 4 casos (5,2%).

A sensibilidade da casuística total foi de 69,4%, a especificidade foi de 94,8%, o valor preditivo positivo (VPP) foi de 96,8% e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 57,9%. Dos pacientes HIV positivos a sensibilidade foi de 61,8% e a especificidade foi de 100%. Nos pacientes HIV negativos a sensibilidade foi de 72,9% e a especificidade foi de 94,7%.

Concluiu-se que o Teste MycoDot é de fácil realização, baixo custo, podendo ser útil como uma ferramenta adicional para o diagnóstico da tuberculose.

### **3. Summary**

This study evaluated the humoral immunity in tuberculosis. It was a study of diagnostic test using a specific antigen, designed Lipoarabinomannan (LAM) provenient of Cambridge, MA, USA, Dyna-Gen Company. This antigen is a cell wall component of mycobacteria.

The major objective was to study anti-LAM IgG antibodies in cases of pulmonary, extrapulmonary and associated forms of tuberculosis.

The casuistic was 173 patients with tuberculosis, confirmed by bacteriologic and/or anatomopathologic methods in 114 cases (68,8%). In the other cases, the tuberculosis was confirmed by clinical, radiological features and follow up of the patients after chemotherapy.

The series presented 115 males, 58 females; 131 was caucasian, 24 black and 18 was non-caucasian.

The total pulmonary forms was 88 cases (51%), 81 with positive AFB in sputum and 7 with negative AFB in sputum. Three have positive culture, two with negative cultures. Extrapulmonary tuberculosis was found in 71 cases (41%). The predominant forms of X-ray of the thorax was miliar and necrositing lesions. HIV-positive patients were 118 and negative 55.

The MycoDot test results were: positive in 120 patients (69,4%) and negative in 53 patients (30,6%).

In control group, MycoDot was negative in 73 cases (94,8%) and positive in 4 cases (5,2%).

The final results were: sensitivity of 69,4%, specificity of 94,8%, the positive predictive value was 96,8% and the negative predictive value was 57,9%. In HIV-positive patients, the sensibility was 61,8% and the specificity was 100%.

The conclusions were the MycoDot test is easy and ideal for use in the diagnosis of active tuberculosis in conjunction with the other methods.

## **4. Introdução**

### **4.1 Considerações Gerais**

O *Mycobacterium tuberculosis* é o patógeno que afeta a humanidade, o mais persuasivo, mórbido e letal dos microorganismos. Em todos os continentes, homens e mulheres, crianças, jovens e idosos, de todas as raças estão em risco de adquirir esta infecção potencialmente fatal e ao mesmo tempo curável. Sua transmissão ocorre somente através do contato direto entre os seres humanos e o único modo de se manter através do tempo e do espaço é de uma pessoa infectada com o bacilo. Excepcionalmente, o bacilo pode ser transmitido por necropsias, de indivíduos altamente infectados.

A tuberculose atinge principalmente o pulmão, mas pode se instalar e desenvolver-se em qualquer órgão do ser humano. O *habitat* do bacilo da tuberculose é principalmente o macrófago. Paradoxalmente, esta é a célula do corpo humano de primeira e principal defesa contra a doença (SADA E; 1990). Esta científica e intrigante dualidade se apresenta como um mistério e oferece excitantes dilemas nesta sutil e frágil balança entre o hospedeiro e o patógeno.

Diferentemente de outras doenças infecciosas, é a que mais mata no mundo inteiro, que possui tratamento com drogas potentes, potencialmente curáveis, mas que ainda não foi erradicada em nenhum país do mundo. A tentativa de uma nova vacina que pudesse proteger o ser humano, que fosse epidemiologicamente efetiva, isto é, que interrompesse o ciclo da transmissão da infecção, tem sido um objetivo no século XX. Entretanto, existem



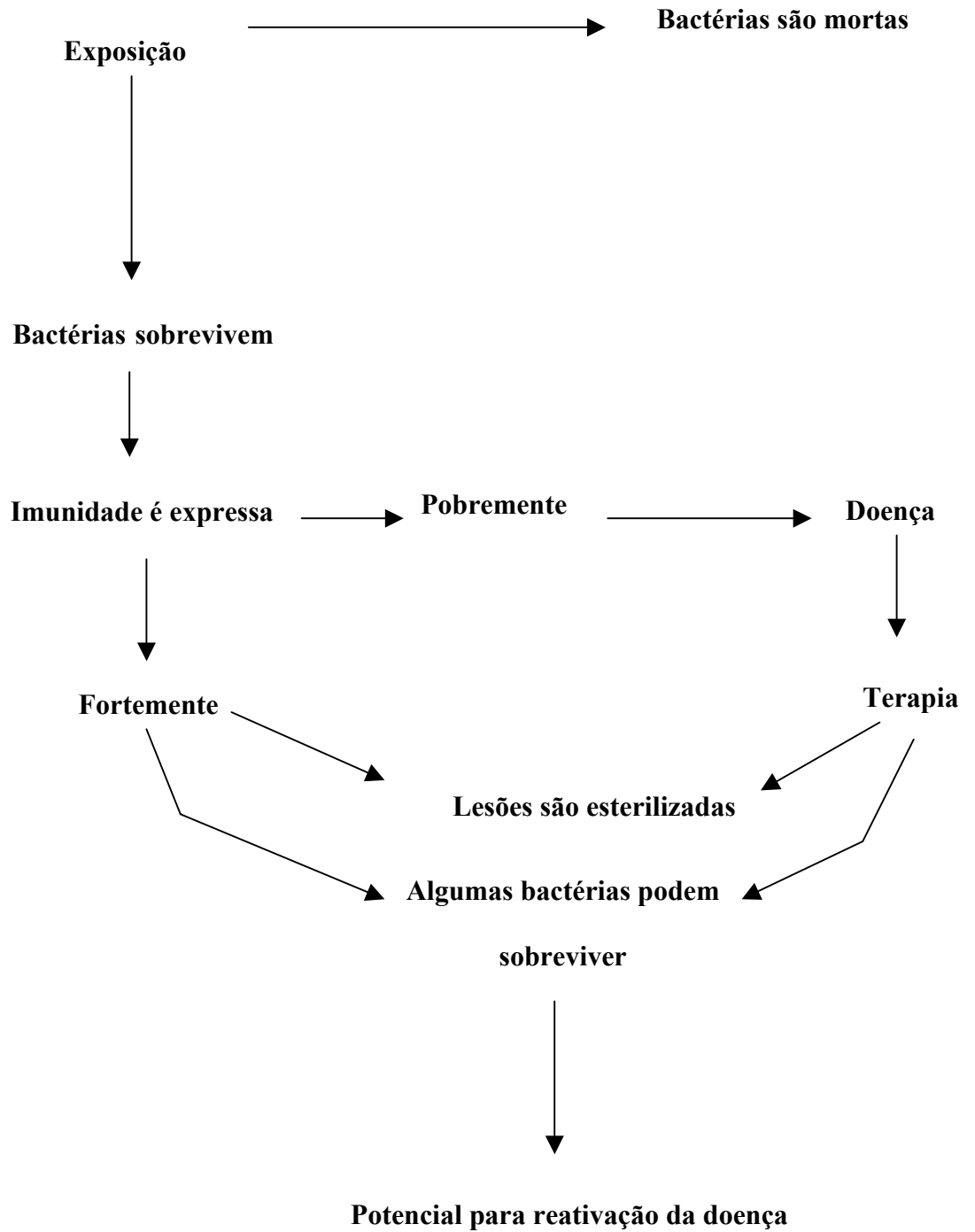
menções e experimentos já em andamento de vacinas com DNA que são promissoras, podendo tratar e proteger o indivíduo. O único sucesso, até então demonstrado, e em algumas regiões do mundo, conseguido pelo cientista médico, foi o importante desenvolvimento de drogas efetivas antimicrobianas. Depois de milênios de desesperadas pesquisas na busca de uma solução para este terrível problema, na metade do século XX, foram descobertas as drogas para a cura desta doença. Entretanto, o tempo requerido para o tratamento, diminui e altera a chance de cura, aumentando a possibilidade de surgimento de cepas do bacilo resistente às drogas no mundo inteiro.

Em 1952, René e Jean Dubois afirmaram na sua “THE WHITE PLAGUE”:

Tuberculose é uma doença social e se apresenta com problemas que transcendem a tradição médica... Sua compreensão implica no impacto de fatores sociais e econômicos do indivíduo que são mais considerados em causar dano ao corpo humano... É a conseqüência de alterações na organização e nos erros do comportamento individual do ser humano... (ISEMAN M; 2000).

Como previsto por Dubois, o conceito de uma conquista científica tem se provado hubristica. Os problemas sociais expressivos nas nações em desenvolvimento têm provado serem uma barreira ao controle da tuberculose.

Uma das grandes ironias do século XX, tem sido a percepção que o advento da quimioterapia significaria a morte da doença. Apesar da alta morbidade e mortalidade da tuberculose, houve uma perda muito importante da chama de entusiasmo nas pesquisas em comparação a outras doenças nas últimas quatro décadas.



*Figura 1 Potenciais desfechos após exposição à infecção por tuberculose*

## **4.2 Coinfecção HIV**

Recentemente, o elemento que revolucionou a doença, trazendo-a à tona, nos seus mais diferentes aspectos, foi o surgimento explosivo do vírus HIV, da AIDS, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

O vírus HIV ataca a tuberculose em arenas biológicas e demográficas. Infectando e desarmando os linfócitos T, o HIV progressivamente altera a imunidade celular que controla e inibe o bacilo da tuberculose no ser humano, sendo considerado o fator potencial mais importante em desenvolver a doença conhecido nos últimos cem anos afirmado por Stiblo (ISEMAN ; 2000).

Assim, as pessoas infectadas pelo HIV são o risco para o potencial desenvolvimento da doença e representam os mais susceptíveis em adquirirem nova infecção. Demograficamente, a tuberculose e a infecção pelo HIV, tem se congregado nas mesmas populações; seguindo a explosão do HIV na África, ocorreu o mesmo com a tuberculose.

Nas grandes áreas dos EUA, o HIV tem sido o fator potencializador e facilitador da doença, com todas as problemáticas que surgem e que representam um enorme desafio à ciência médica mais acurada que possa haver. O mesmo ocorreu em grandes cidades da América Latina, Ásia e Índia, tendo o vírus HIV adquirido importante implicação na epidemiologia da tuberculose. Devido ao seu impacto nas defesas do hospedeiro e sua predileção para grupos e regiões onde a tuberculose é altamente prevalente, pode-se esperar que o vírus HIV aumente a morbidade e mortalidade da doença nas próximas duas décadas, apesar dos avanços que serão feitos no futuro próximo sobre o diagnóstico, tratamento e

prevenção destas infecções. Depois de várias décadas de incidência em declínio, a tuberculose começou a ressurgir nos Estados Unidos. Este aumento tem afetado áreas com maior impacto. A incidência da tuberculose nos USA variava de 10/100.000 habitantes e em New York passou para 50,4/100.000, sendo que no Harlem e no lado oeste de Manhattan teve uma incidência de 150/100.000 habitantes. Certamente, a coinfeção pelo vírus HIV foi o principal responsável por este aumento no número de casos, além das migrações. Em vários países do mundo, este aumento também ocorreu, ocasionando problemas epidemiológicos e surgimento de resistência bacteriana. Como a tuberculose, com seu alto grau de virulência, é o protótipo da infecção que requer uma resposta imune celular para o seu controle, entende-se que pela abolição da imunidade celular nos HIV, essa doença apareça com tanta prevalência e tão precocemente. Em um estudo realizado no Brasil, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HENN LA, PIZZOL F, NAGEL A; 1997) foram demonstradas as diferenças clínico-radiológicas e terapêuticas deste grupo de pacientes. Nesta situação têm-se observado formas atípicas radiológicas, com disseminação miliar, com linfonodomegalias hilares e com grande envolvimento de órgãos extrapulmonares, caracterizando tais formas nessa doença. O médico deve ficar ciente dessa freqüente associação, principalmente nos pacientes chamados de grupo de risco, os *homeless*, os de difíceis condições socioeconômicas, os que vivem em prisões e nos hospitais, afetando médicos e paramédicos. O problema se apresenta maior devido às dificuldades do diagnóstico da doença nesta população (formas paucibacilíferas, granulomas frouxos mal-formados e possibilidade de coinfeções outras associadas).

O estudo da tuberculose e infecção pelo HIV, realizado no Brasil, cidade de São Paulo, por Ferreira e Kritski, com delineamento prospectivo, de *coorte*, demonstrou que em prisões havia um aumentado risco de ambas infecções por tuberculose e HIV, entre a população de mulheres. Entre elas 25% (87) eram HIV soropositivas e 5,7% (20) tinham

tuberculose associada. Neste estudo demonstrou-se que a taxa de conversão tuberculínica, durante o período de encarceramento foi de 29% para as mulheres HIV positivas e 32% para as mulheres HIV negativas. A incidência de tuberculose foi de 9,9% por 100 /pessoas-anos para as HIV positivas e 0,7% por 100/pessoas-anos para as mulheres HIV negativas (FERREIRA MM, KRITSKI AL; 1996).

Outro estudo realizado no BRASIL por Kritski e col. evidenciou as características da associação da tuberculose e HIV no BRASIL ( KRITSKI A, DALCOLOMO M, DEL MELLO FF; 1995).

Um outro estudo demonstrou que entre as inúmeras complicações do HIV, a tuberculose está sendo reconhecida como uma das mais importantes. A coinfeção tuberculose-HIV explodiu na África e nos Estados Unidos. Como a infecção pelo HIV induz a uma imunossupressão à tuberculose, é comum a reativação da doença ou o surgimento de uma infecção primária.

Um outro estudo interessante determinou a imunologia do pulmão frente à infecção pelo HIV (ROSE RM;1991).

O estudo intitulado: The impact of HIV infection on the Global epidemiology of tuberculosis demonstra que o maior fator de risco para o desenvolvimento da tuberculose observado nos últimos 100 anos é a infecção pelo HIV ( MAJOR M ; 1991) .

Um outro estudo realizado por Kritski e colab. mostrou a repercussão da tuberculose e da infecção pelo HIV na cidade do Rio de Janeiro ( KRITSKI A; BARROSO EW; 1991)

### 4.3 História da Tuberculose

O bacilo da tuberculose descoberto por Robert Koch, em 1882, persiste atingindo a humanidade. Menções especiais devem ser feitas a médicos, muitas vezes nem nominados nas escolas médicas, talvez esquecidos pelo tempo, mas que realmente iniciaram as buscas a esta doença. Dr. Leonid Heifits, imigrado para os Estados Unidos da União Soviética em 1978, chegando ao Colorado, rapidamente desenvolveu a área clínica laboratorial desta era, reconhecendo a importância clínica do pronto e acurado diagnóstico. O mesmo foi o pioneiro nas técnicas de exames culturais. Demonstrou-se um pesquisador persuasivo em desenvolver sofisticados serviços laboratoriais industrializados e novos em desenvolvimento. Dr. John Sbarbano foi provavelmente a primeira pessoa nos EUA a compreender completamente as implicações e mudanças nos pacientes não complacentes com a quimioterapia. Ele desenvolveu programas de quimioterapia intermitentes e grupos de supervisão em Denver (ISEMAN MD; 2000).

Dr. Wallace Fox e Denis Mihchinson levaram um grupo marcável de clínicos, epidemiologistas e bacteriologistas no British Medical Research Council a conduzir uma série de elegantes *trials* de quimioterapia, que essencialmente definiram a moderna quimioterapia da tuberculose. Os *trials* foram aplicados largamente em cooperação com investigações em Madras, Índia, África, Hong Kong e Singapura. Eles resolveram brilhantemente questões sobre as regras das drogas individuais, requisitos da duração da terapia e ritmos convenientes para facilitar o tratamento diretamente observado. Seus nomes têm sido sinônimos de tratamento de curso rápido ou de curta duração e deveriam ser reconhecidos como dois dos mais importantes cientistas da medicina global na última metade do século XX (ROM WN; 1996).

Dr. George Comstock, com seu treinamento epidemiológico, teve grande cooperação nos programas de saúde pública dos EUA nos últimos 40 anos. Em colaboração com Shirley Woolfert e Carroll Palmer, foram um trio de extraordinária combinação em estudos realizados sobre a doença e a adoção da quimioterapia preventiva, mais do que da vacinação, como modelo básico preventivo de Saúde Pública (ROM WN; 1996).

Dr. Comstock, com manuscritos e cartas, ajudou gerações de jovens estudantes a inflar a chama do entusiasmo para combater e compreender esta complexa doença. A história da tuberculose é extremamente rica em ensinamentos e dúvidas. Entre a imensa capacidade intelectual de revisar a doença, estão as bizarras histórias e explicações das causas desta moléstia, as desesperadas pesquisas para o encontro de remédios que oferecessem resultados, muitos sem nenhum benefício e ganho sobre a doença e a explosão do conhecimento do agente etiológico e efetivo tratamento da mesma. É uma história marcada por alguns dos mais heróicos avanços cientistas, bem como as dos mais arrogantes charlatanismos.

A tuberculose surgiu nas remotas civilizações, como na cultura Egípcia, com achados de representações gráficas de deformidades em giba, mostrando a evidência da tuberculose óssea em múmias. Também os chineses demonstraram muito da doença. Referências existem também de publicações da civilização Hindu-Índio Ariana. As mais detalhadas e específicas referências à tuberculose ocorreram com a civilização Grega.

Kleur observou a evolução da medicina Grega em três fases:

- 1) Mitos, Legendas, Aescularis : cura pelo Apolo;
- 2) As idéias fisiológicas pessoais como as de Pitágoras;

3) A rica era de Hipócrates, cerca de 460-375 AC, com ciência médica e prática.

Nas escritas Hipocráticas estão as primeiras referências a *PHTISIS* - “I am wasting”. Surpreendentemente agora uma nova doença, a AIDS, tem também a denominação de Wasting Staging (1989).

A microscopia foi fundamental para a compreensão da doença: a histopatologia das lesões teciduais identificando as características respostas celulares; o reconhecimento do bacilo nos tecidos pelo Dr. Koch, em 1882. Foi o criador das placas de gelatina para o crescimento dos patógenos, revolucionando a ciência da bacteriologia. Koch levou 217 dias para que a sua descoberta fosse aceita. Isto, provavelmente, refletia a antipatia de Virchow - *DEAN of GERMANY PATHOLOGY* no tempo, à mensagem de Koch, que correu contrária às exposições de Virchow 20 anos antes.

Koch então afirmou:

1) O ciclo de vida do bacilo da tuberculose depende da contaminação inter-humana, não havendo reservatório especial ambiental: os micróbios são verdadeiros e não ocasionais parasitas;

2) Os pulmões são a porta de entrada e a fonte dos bacilos são os pacientes com a doença cavitária que expectoram um número imenso dos mesmos;

3) O tuberculoso não pode infectar o corpo através de uma pequena solução de continuidade, como o faz o bacilo do Anthrax; para a propagação da infecção, o material infeccioso necessita de uma posição protegida e onde se localizar;

4) Tuberculose tem sido habitualmente considerada uma manipulação da miséria social, e tem havido esperança em que a melhoria das condições sociais reduza a doença.

O primeiro caso de cura foi descrito em Minesotta, quando uma jovem mulher recebeu Estreptomicina. Um ano após, Sigrid, outra jovem, com pneumonia tuberculosa



foi tratada e curada com PAS. Ela recebeu a droga em 1944 e foi submetida à ressecção de cavidade do lobo superior direito. A era da quimioterapia da tuberculose havia começado.

Em 1839, Johann Lukas Schoenlein descreveu a palavra “TUBER”, pequeno como tomate, lesão endurecida e encontrada na doença (ROM WN; 1996).

#### 4.4 Estrutura Molecular e Bioquímica da Parede Celular da Micobactéria

As micobactérias contêm em torno de 60% de lipídeos em suas paredes celulares.

Ultraestruturalmente, são compostas por camadas ( Figura 2).

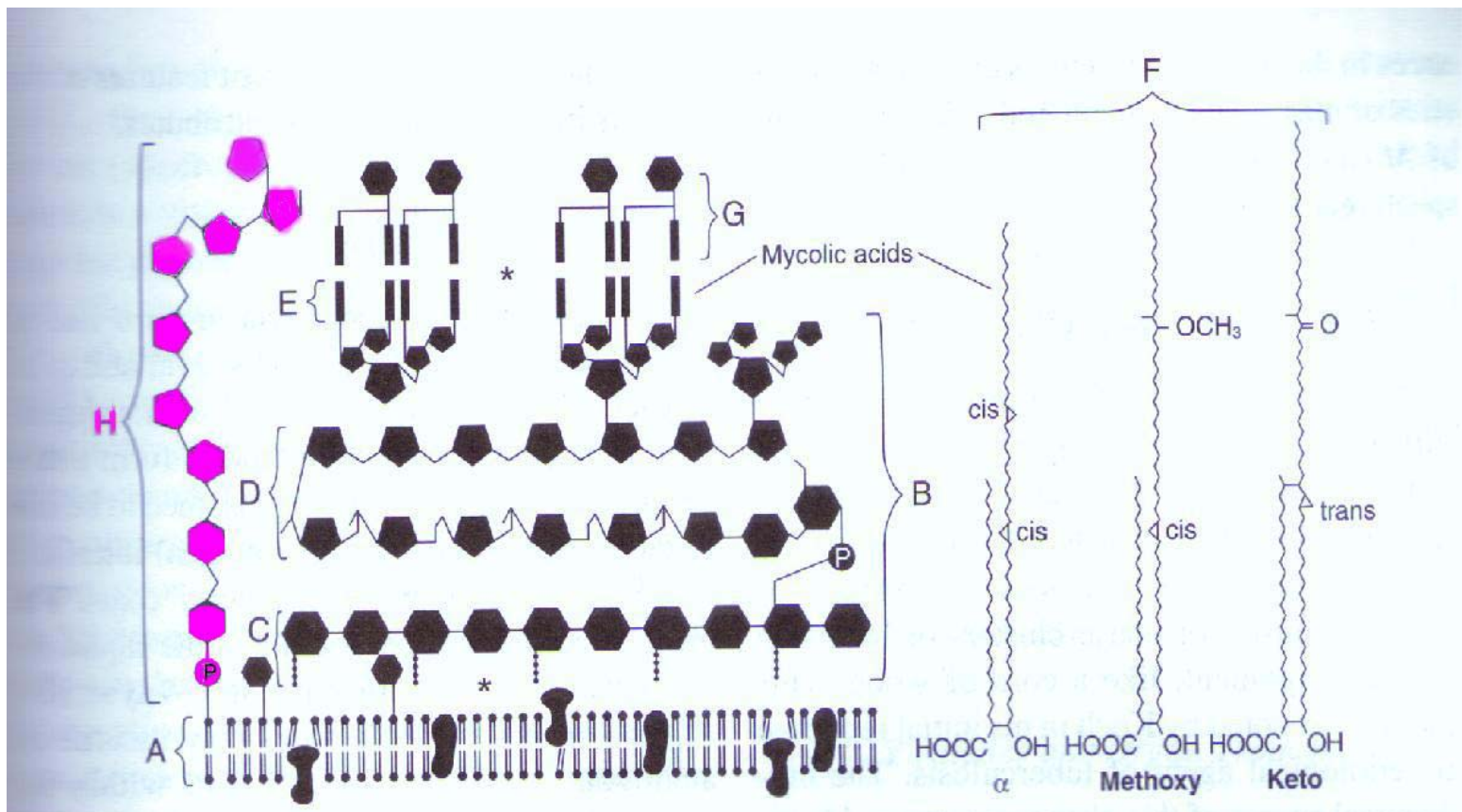


Figura 2 Estrutura da parede do *Mycobacterium tuberculosis*

O delineamento dos constituintes químicos e arquiteturas da parede da micobactéria tuberculosa leva ao desafio de compreensão da patogênese, imunidade, desenvolvimento de vacinas e desenho de novas drogas.

Brennan e seus colegas, na Universidade do Estado do Colorado, têm recentemente conduzido uma série de elegantes estudos desses tópicos (BRENNAN PJ; 1991).

Historicamente a ultraestrutura da parede das células micobacterianas consiste em um número de camadas. Há uma região condensada e intercalada com uma camada externa da membrana plasmática. A próxima camada é de transparência elétrica. A camada densa aparece da mesma forma como em todas as espécies micobacterianas analisadas. Periféricamente a essas camadas, estão variáveis extratos que também contêm materiais eletrôn-densos e parecem ser distintivos das diferentes espécies.

Estudos bioquímicos têm indicado que o maior esteio ou esqueleto da parede das micobactérias consistem de três macromoléculas: peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos. Os peptidoglicanos são semelhantes aos das outras bactérias. Os ácidos micólicos são achados quase que exclusivamente entre as micobactérias e os ácidos graxos, acredita-se que sejam essenciais, mas não a única fonte, das propriedades de ácido-resistência das micobactérias.

Os menos bem caracterizados componentes da parede microbiana são os arabinogalactanos. Recentemente, significantes avanços têm mostrado o delineamento, a bioquímica e os fatores de arquitetura dos arabinogalactanos e seus coelementos na parede celular. Entre os mais significantes aspectos do modelo estrutural é o potencial patogênico nas doenças micobacterianas de dois lipopolissacárides: LIPOARABINOMANNAN (LAM) e LIPOMANNAN. Baseado no papel do LAM em diretamente dirigir a função do

macrófago, sua capacidade de inibir o processamento de proteínas e peptídeos micobacterianos pelos antígenos presentes nas células e sua indução à produção do fator de necrose tumoral, o mesmo tem correntemente sido considerado por alguns autores um importante fator de virulência micobacteriano. Recentes análises por Brennan e colab. tem identificado diferenças bioquímicas nas estruturas terminais dos LAM de bacilos classicamente avirulentos e virulentos do *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente, Erdmann e H 37 Ra (BRENNAN PJ; 1991).

#### **4.5 Características do Crescimento**

O bacilo é de lento crescimento, que varia de 12 a 24 horas, dependendo de variáveis ambientais e microbianas. Uma característica, mas não distinta propriedade do *M. tuberculosis* é a tendência de formar cordões ou densas colônias de bacilos e em alinhamentos paralelos como cordão. A fonte bioquímica deste fenômeno foi identificada por Bloch em 1950 e intitulado de Fator Cordão. Suas propriedades de virulência são discutíveis (KRASNOW I; 1955). Evidências a favor da virulência do fator cordão foi desenvolvido por Kato, que mostrou que ratos imunizados contra o componente, foram menos susceptíveis a mudanças com o bacilo virulento (KATO M; 1973).

#### **4.6 Fisiologia**

Consideráveis investigações das propriedades fisiológicas do *M. tuberculosis* têm sido conduzidas nesse século. Fatores consistentes do bacilo incluem os seguintes atributos:

##### **4.6.1 Aeróbicos:**

O crescimento das micobactérias *in vivo* e *in vitro* parece intimamente ligado à quantidade de oxigênio disponível. No crescimento no meio líquido, sem agitação ou detergente, o bacilo tende a formar uma fina película na superfície; isto é presumido ser devido à proliferação da interface ar-oxigênio, bem como de suas camadas hidrofóbicas. O bacilo que se localiza no fundo do líquido permanece viável mas não replicável. Wayne sugeriu que tais elementos podem assumir um estado análogo em lesões crônicas no corpo humano e demonstrou que tais bacilos assumem sua replicação logo após sua exposição ao oxigênio (WAYNE; 1986).

#### 4.6.2 Não formador de esporos

Devido às suas camadas que limitam a perda do fluido através da membrana celular, micobactérias permanecem viáveis por muito mais tempo do que outras bactérias no ar ou em estado de exposição. Porém, isso não é uma verdadeira esporulação.

#### 4.6.3 Variação do crescimento *in vivo*

Há vários pontos vitais na patogênese e história natural da tuberculose que relacionam a fisiologia aos ciclos de vida micobacterianos. De grande importância biológica na significância da tuberculose clínica incluem as paredes celulares deficientes, as formas não-ácido-resistentes e o trofismo pelos órgãos.

**4.6.3.1 Deficiente parede celular das formas não-ácidos-resistentes (CWD-NAF)**

Em 1908, Much chamou atenção e detectou minutas, variantes granulares do bacilo tuberculoso que não se coravam pelo método de Ziehl-Nielsen. Muitos grânulos dessas formas ficaram desconhecidos, têm permanecidas controversias em estudos de doenças micobacterianas desde então. Mattman e colegas descreveram “L-forms” de micobacterias em uma série de relatos de 1960 a 1970. Subseqüentemente, Ratnam e Chandrasekhar publicaram dois estudos deste tópico. Em 1976, eles relataram as formas deficientes de paredes, denominadas esferoplastos do *M. tuberculosis* que persistiram em um estado viável depois da injeção em porcos, mas não produziam doença ou consistente reatividade tuberculínica por um período de cinco semanas. Porém, animais observados entre dez ou dezesseis semanas manifestavam substanciais recidivas de reatividade tuberculínica, tuberculose demonstrada por autópsia ou morte prematura de tuberculose. Os autores mostraram que os esferoplastos reverteram às formas convencionais de *M. tuberculosis* e que este fenômeno foi associado com morbidade nesses porcos. Eles especularam que tuberculose tipo reativação poderia envolver persistência tecidual das formas esferoplásticas. Sessenta anos mais tarde, publicaram estudos dessas formas (CHANDRASEKHAR; 1992). Em outro relato, os autores descreveram um método melhorado mostrando que em animais imunodeficientes havia reativação da doença. Chandrasekhar e Ratnam observaram que os macrófagos de componentes de hospedeiros foram capazes de desnudar os bacilos tuberculosos de suas paredes celulares, formando novas variantes. A real significância desses achados se relacionam ao fenômeno da persistência enquanto o bacilo tuberculoso continua a sobreviver em tecidos apesar de concentrações microbicidas de antibióticos e à reativação de tuberculose anos ou décadas depois da infecção inicial. (GRANGE JM; 1992).

Khomenko's relatou uma forma "ultrafina" de *M. tuberculosis* que foi invisível às técnicas de coloração convencionais, mas podem ser consistentes com o fenômeno CWD-NAF. Nas paredes das lesões cavitárias eles acharam formas filtráveis à microscopia eletrônica onde não havia paredes celulares; o número dessas formas ultrafinas aumentou durante a introdução da quimioterapia. Essas formas invisíveis foram ditas serem capazes de reverter as típicas formas bacterianas em recultivo cuidadoso. Essas CWD-NAF e formas ultrafinas podem, possivelmente, estar relacionadas à persistência e recrudescência da tuberculose.

#### 4.6.3.2 Virulência e tropismo pelos órgãos

A bacteriologia é repleta com amostras de microorganismos que sofrem adaptações para a sobrevivência ou virulência. Segal e Bloch mostraram que uma espécie de *M. tuberculosis* crescia *in vitro* e apresentava diferentes propriedades do que os organismos da mesma espécie que passaram através de ratos; entre as distinções notadas, foi aumentada a virulência e diminuída a imunogenicidade para o bacilo tuberculoso (SEGAL, BLOCH; 1965). Provavelmente relacionado a tais adaptações, onde as observações feitas por Collins os organismos extraídos dos pulmões dos animais, depois de um tempo latente, tenderam a selecionar coletivamente os pulmões dos animais subsequentes quando injetados intravenosamente (COLLINS; 1976). As culturas mostraram desenvolvimento similar nos pulmões. Baseado nessas variações especulou-se que há alterações nos sulfolípidios da micobactéria, que potencialmente poderiam ter sido responsáveis pelas mudanças na virulência e no tropismo pelos órgãos. Este desafio poderia representar a transmissão e virulência por décadas. Baseados nessas e outras observações, uma plausível causa pode ser especulada que as espécies de *M. tuberculosis* que têm passado através de certos

hospedeiros ficam mais transmissíveis, provavelmente por estabelecer infecções em indivíduos expostos ou mais virulentos ou por produzirem clinicamente doença ativa nesses infectados.

#### **4.7 Estudo da Imunidade**

O ressurgimento da Tuberculose em todo o mundo, tem intensificado as investigações para examinar a defesa do hospedeiro e dos mecanismos patogênicos que estão envolvidos na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

Até o presente momento não existem métodos confiáveis para a detecção de uma infecção latente e mesmo em pacientes com infecção ativa poderá não estar confirmada esta infecção (LALVANI A, PATHAN AA; 2001).

##### *4.7.1 Resposta imune ao *Mycobacterium tuberculosis**

A história natural da tuberculose é completa. A infecção primária ocorre em pessoas sem imunidade específica, geralmente crianças saudáveis e adultos jovens, ainda não expostos ao bacilo da tuberculose; a doença primária ocorre nos primeiros cinco anos da infecção inicial, a qual estimula a imunidade específica, demonstrada pelo surgimento de uma resposta cutânea positiva ao derivado protéico da tuberculina (Reação de Mantoux).

Mesmo que os sintomas primários sejam frustrados, a detecção e o tratamento são importantes para prevenir a disseminação e a reativação da doença, posteriormente. Com o avanço e conhecimento da infecção primária, aumentam também as probabilidades de termos vacinas novas e eficazes em futuro próximo (MILBURNHJ;2001).

A habilidade do microorganismo para manter uma infecção crônica e de causar doença em um grupo de indivíduos infectados, depende de fatores de virulência, dentre outros, que capacitam aos microorganismos a entrada e a sobrevivência indefinidamente nas células fagocíticas mononucleares, subvertendo os mecanismos celulares antimicrobianos. ( RILEY,RW;1995). A resposta à infecção por micobactérias é o exemplo clássico de uma resposta imune mediada por células de um parasito celular facultativo ( DANIEL TM;1993).

As micobactérias, dentro dos fagócitos, são capazes de evadir as respostas humorais e manter viabilidade por longo período de tempo. As células T ativam e regulam os macrófagos e, subsequentemente, afetam o controle e o crescimento micobacteriano. A resposta TH1 constitui a resposta imune protetora à doença, encontra-se controlada pelas interleucinas -1 e 12 mediadas por células T CD4 que secretam interleucina -2 e interferon-  $\gamma$  e algumas células T CD4 se diferenciam e se convertem em células T de memória de longa vida, expressando um fenótipo de memória.

Na imunidade antimicobacteriana estão implicadas diferentes grupos de células: as células T CD4 alfa, beta, as células T CD8 alfa e beta, e as células T, gamma e delta. Ambos os fagócitos e os microorganismos sintetizam proteínas para facilitar a sua sobrevivência. Dados recentes mostram uma forte correlação entre a produção de gama-interferon ( TNF- $\alpha$  ) nas células T gamma-delta e a manifestação da tuberculose pulmonar primária, o qual é consistente com a hipótese de que estas células têm um efeito imune protetor na infecção. (YOSHIDA N; 2001).

As células T CD8 são protetoras pela secreção de citocinas, mais que uma atividade lítica direta da célula CD8. Sua ação é prolongar a sobrevivência do hospedeiro infectado. A resposta imunológica controla, porém, não elimina o patógeno. Na maioria dos casos de



infecção por tuberculose o indivíduo permanece assintomático e não infeccioso. Esta latência clínica se estende durante toda a vida do indivíduo. Entretanto, a reativação da infecção latente pode ocorrer em resposta a alterações da resposta imune, produzindo doença ativa. A infecção pelo HIV, DM, uso de imunossuppressores, o envelhecimento e o abuso de drogas e álcool aumentam o risco potencial de reativação da enfermidade latente.

O *Mycobacterium tuberculosis* persiste nos macrófagos, dentro de um granuloma nos hospedes infectados. O granuloma consiste em macrófagos e células gigantes, células B e fibroblastos. Nas infecções latentes, se desconhece o estado de atividade da bactéria dentro do granuloma ou tubérculo. O microorganismo pode estar em estado inativo, sem replicar-se; replicando-se ativamente, porém, limitado pela resposta imune; ou metabolicamente alterado com ciclos replicativos infreqüentes ou limitados.

A alteração da resposta imune é capaz de prevenir a enfermidade ativa na maioria das pessoas, porém, não elimina a infecção. O microorganismo se desenvolve por mecanismos evadindo a resposta imune mediada pelas células. Uma das estratégias da geração de vacinas é poder incrementar a resposta imune natural produzida pela micobactéria.

As alterações encontradas são diversas:

- funções antimicobacterianas efetoras dos macrófagos (FLYNN JL;2001);
- fusão fagolisossomal (MELLMANN I, FUCHS R; 1986);
- mecanismos antimicobacterianos baseados em radicais livres. Óxidos de nitrogênio (sintetase do óxido nítrico) (CHAN J, FLYNN JL; 1999); (WANG CH; 1998);
- espécies reativas de oxigênio; reporta-se que os componentes micobacterianos lipoarabinomannan (LAM) e o fenolicoglicolípido-I (PGL-I) são potentes destruidores dos radicais do oxigênio;

- os receptores *Toll-like* e a imunidade inata da tuberculose (UNDERHILL DM; 1999);

- citocinas: interleucina-12 (IL-12) (macrófagos) (LOWRIE DB; 1999);

interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ): chave no controle da infecção por tuberculose (LALVANI A et als; 1998);

interleucina- 4 (IL-4) (FENHALLS G; 2000)

fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ): necessário para gerar a resposta granulomatosa e para uma imunidade mediada por células efetiva. Induzida pelos macrófagos, células dendríticas e células T necessárias para o requerimento do controle da infecção aguda. (MOREIRA AL;1997)

interleucina-10 (IL-10): considerada antiinflamatória. Seu papel na resposta imune protetora é inconclusiva, estando na espera de resultados posteriores. (ROJAS M; 1999)

interleucina-6 (IL-6): apresenta múltiplos papéis na resposta imune, incluindo inflamação, hematopoiese e diferenciação das células T. (LADEL CH; 1997)

fator transformador de crescimento TGF- $\beta$ : essa citocina antiinflamatória está implicada na supressão das células T em pacientes com tuberculose. (ROJAS RE; 1999);

- células T: controlam e eliminam a micobactéria nos seus mecanismos efetores nas células. (RANDHAWA OS; 1990);

- células T CD4: tem-se demonstrado em pacientes com infecção por HIV que a perda de células T CD4 positivas aumenta importantemente a susceptibilidade da tuberculose aguda ou da reativação. (SELWYN PA; 1989);

- moléculas apresentadoras de antígenos MHC Classe I, Classe II e CD1: macrófagos infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* parecem ter diminuída sua capacidade para apresentar antígenos às células T CD4 positivas. O microorganismo poderia inibir o reconhecimento dos macrófagos pelas células T CD4. (MAZZACARO RJ; 1996);

- células T CD8 positivas: para serem efetivas necessitam responder a macrófagos infectados ou com secreção de IFN- $\gamma$  ou com respostas citotóxicas. (SERBINA NV; 1999)

- células T CD8 + MHC Classe I restringidas: os estudos incluem antígenos reconhecidos por células T CD8 positivas dos infectados sem tuberculose ativa e se oferecem como candidatos atrativos para a geração de novas vacinas. (SUGITA M; 1999);

- células T CD8 não-classicamente restringidas: existem dados inconclusivos destas células na contribuição potencial desse subgrupo de proteção. (MOODY DB; 2000);

- funções efetoras de células T CD8 positivas: há evidência de um papel maior direto das células T CD8 positivas no controle da infecção pelo *M. tuberculosis*, restringindo o número de bactérias intracelulares. (LAOCHUMROONVORAPONG P; 1997);

- migração celular e formação de granuloma: resposta inflamatória do hospedeiro contra os microorganismos, requer uma coordenação precisa de muitos elementos imunológicos. Vários estudos existem sobre esses achados. (ORME IM; 1999).

Da revisão dos estudos imunológicos em contatos de pacientes com tuberculose ativa pode-se sugerir que:

1. a produção do IFN- $\gamma$ , em resposta a antígenos micobacterianos é significativamente maior nos contatos de pacientes com tuberculose ativa, em comparação com as quantidades encontradas em controles comunitários ou indivíduos não expostos ao *M. tuberculosis*;

2. a resposta imune dos contatos PPD positivos é uma resposta protetora dada pela exposição recente ao microorganismo;
3. a resposta imune elevada com produção de IFN- $\gamma$  que se observa nos contatos de tuberculose ativa é independente da condição de BCG do indivíduo. Quando se compara a resposta entre contatos expostos e controles não-expostos BCG positivos, a resposta dos últimos é significativamente menor;
4. questiona-se se esta produção de IFN-  $\gamma$  é sempre protetora.

OBS: Além dessas conclusões é evidente que a investigação da resposta imune à infecção com *M. tuberculosis* dos correlatos de imunidade protetora à micobactéria em humanos, significa uma probabilidade futura de testar novas vacinas.

#### **4.8 Diagnóstico laboratorial**

- 4.8.1 Pesquisa direta no escarro espontâneo (2 amostras);
- 4.8.2 Método do escarro induzido;
- 4.8.3 Exame cultural pelo Método Lowenstein- Jensen (LJ);
- 4.8.4 BACTEC ;
- 4.8.5 Tipificação da Micobactéria ;
- 4.8.6 Teste de sensibilidade às drogas ;
- 4.8.7 Teste tuberculínico pela Reação de Mantoux;
- 4.8.8 Adenosina Deaminase (ADA);
- 4.8.9 *Fingerprinting* para a identificação da micobactéria ou *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP);

4.8.10 *Polymerase Chain Reaction* (PCR);

4.8.11 Biologia Molecular;

4.8.12 Hemocultura;

4.8.13 Pesquisa do ácido tuberculoesteárico;

4.8.14 Testes Sorológicos.

#### 4.8.1 Bacterioscopia do Escarro

As limitações da microscopia são em relação à sensibilidade e à especificidade, porém até que novas técnicas de biologia molecular estejam mais desenvolvidas, a microscopia permanece como de primeira linha para o diagnóstico da tuberculose .

#### 4.8.2 Escarro Induzido

Método de excelente valia para o diagnóstico da tuberculose no paciente que não apresenta expectoração espontânea. Devem ser realizados exames diretos e culturais, onde os últimos mostram maior chance de positividade. Deve-se indicar este exame antes da realização de fibrobroncoscopia. O exame é feito em cabine especial pressurizada com nebulização ultrassônica.

#### 4.8.3 Métodos Culturais- LJ:

Apresentam maior sensibilidade em relação à microscopia. Apesar dos métodos culturais não tipificarem as micobactérias, entre os pacientes cujo perfil epidemiológico

para adoecer por tuberculose apresenta um alto risco, um exame de escarro positivo para micobactéria deve ser considerado como tuberculose até que exames culturais ou outras técnicas provem o contrário.

O cultivo *in vitro* do agente etiológico tem sido essencial para a identificação das espécies, teste de sensibilidade às drogas e monitorização da resposta à terapia.

O lento crescimento do bacilo tem sido uma frustração e um problema para a maioria das autoridades médicas públicas. Mesmo 110 anos mais tarde, a maioria dos laboratórios dos Estados Unidos e do mundo ainda empregam este método de cultura que requer de 3 a 6 semanas para demonstrar o crescimento do bacilo.

4.8.4 4.8.5 4.8.6 BACTEC - meio líquido; Tipificação da Micobactéria e Teste de Sensibilidade às drogas

As novas técnicas rápidas de cultura, sistema radiométrico empregando o meio líquido 7 H- 12, oferece considerável vantagem na identificação e tempo de crescimento do bacilo em relação aos meios sólidos convencionais.

Incidentalmente, este meio foi desenvolvido pelos esforços de Gardner Middle-Brook, uma vítima da tuberculose precocemente na sua carreira médica.

Para facilitar o tratamento, tais meios deveriam ser mais utilizados, sendo que o sistema radiométrico mostra o crescimento das micobactérias em 7 a 15 dias, dependendo do tamanho do inóculo e vitalidade do mesmo. O método permite identificar as espécies e avaliar a sensibilidade às drogas.

O método BACTEC, que contém uma substância, o Para-nitro-alfa-acetilamina-hidroxiopropiofenona (NAP), seletivamente, suprime o crescimento das espécies do *Mycobacterium tuberculosis* e é de muita importância. Se uma sub-cultura falha em

mostrar o crescimento no NAP, isto é presuntiva evidência para a espécie do *Mycobacterium tuberculosis*. Permite, então, a identificação da micobactéria e a realização do teste de sensibilidade aos tuberculostáticos.

#### 4.8.7 O teste tuberculínico pela Reação de Mantoux

Utiliza a tuberculoproteína RT 23 do bacilo *Mycobacterium bovis*. Representa o contato ou a infecção primária com o bacilo da tuberculose. Não representa doença. Os macrófagos alveolares que fagocitam o bacilo da tuberculose durante as fases iniciais da infecção não são ativados e são geralmente muito permissivos para a replicação micobacteriana. Entretanto, eles têm um papel central no início da resposta imune do indivíduo. Subseqüentemente, macrófagos derivados dos monócitos e células dendríticas são células primoefetoras. A Reação de Mantoux positiva poderá ocorrer por infecção natural ou artificial através da vacinação pelo BCG intradérmico. Entretanto, a reação provocada pela vacina normalmente é menor do que a provocada pela infecção natural, sendo, em média, de 6 a 8 mm.

Recentes avanços no diagnóstico imunológico da tuberculose, incluindo o teste do Mantoux e o sorodiagnóstico foram revistos. Novas tuberculinas (T1327, T1456) foram relatadas ser mais específicas que a convencional RT 23. Também, tuberculinas de micobactérias atípicas (PPD-B, PPD-Y, PPD-F) foram analisadas como úteis armas para o diagnóstico das Micobacterioses Atípicas. O método é medido através do Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A duração da doença é importante para a compreensão dos resultados. Anticorpos IgM aumentam no estágio agudo da doença e são potentes candidatos para um diagnóstico clínico (MORISHITA M; 1994).

Em um relato, as respostas tuberculínicas foram quantificadas pela endureção da parede, em 125 pacientes com tuberculose e 39 controles. Os diâmetros das respostas tuberculínicas foram maiores nos pacientes que apresentavam HLA-DR15 positivos do que nos HLA-DR15 negativos. A densidade da infiltração de células CD4 positivas mostrou uma correlação positiva com a endureção em indivíduos HLA-DR15 negativos. A fração de pacientes DR15 positivos proporcionou grandes respostas tuberculínicas,  $\geq 15$  mm, mas com poucas células CD4 positivas no sítio do teste (menos de 500/mm<sup>2</sup>); esses pacientes tinham uma maior porcentagem de células no infiltrado difuso dérmico do que na região perivascular, maiores velocidades de fluxo sanguíneo na resposta tuberculínica, possuíam frequentemente títulos mais altos de IgG e anticorpos específicos antibacterianos comparados aos pacientes DR15 positivos. Se o infiltrado inflamatório nos pulmões se assemelha ao do teste tuberculínico na pele, a falta de células imunocompetentes e a hipóxia tecidual poderiam permitir cavitação pulmonar e explicar a associação dos HLA-DR15 com tuberculose bacilífera (WEBSTER CT, GORDIN FM; 1995).

#### 4.8.8 Adenosina Deaminase (ADA)

A ADA é uma enzima secretada pelos linfócitos em várias situações como lesões inflamatórias, lesões neoplásicas e lesões infecciosas. A ADA é dividida em ADA 1 e ADA 2. Os resultados são mais fidedignos quando se relacionam ADA1/ADA2. Tem indicação para o diagnóstico da tuberculose pleural onde existe uma correlação com a população de linfócitos CD4, refletindo uma resposta celular imune. Ela não é específica para o pleurite tuberculoso, podendo estar elevada também no empiema e em algumas neoplasias como o



linfoma. Porém, relatos subsequentes indicam que este teste não apresenta ainda especificidade completamente definida.

#### 4.8.9 *Fingerprinting*

É um método mais rápido e identifica as espécies através de sondas genéticas, que, por técnicas de amplificação do RNA, pode identificar espécies ou grupos de micobactérias. Os resultados são obtidos em média de 7 a 12 dias.

O primeiro estudo realizado para a compreensão da transmissão da tuberculose, usando DNA *fingerprinting* foi realizado em uma comunidade isolada do Canadá Ártico. Foram isoladas 21 espécies de *Mycobacterium tuberculosis* e analisados pelo método do DNA *fingerprinting*. As amostras de DNA *fingerprintings* foram identificadas pela técnica *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), com subsequente prova usando a repetitiva inserção do segmento IS610. Os resultados puderam ser divididos em três tipagens de DNA. Isto sugere que um simples caso foi o início de três *clusters*, mais provavelmente devido a reativação. ( KUNIMOTO D, CHEDORE P;2001).

#### 4.8.10 Reação de Cadeia em Polimerase (PCR)

Apesar da sua enorme utilidade em diagnosticar várias infecções a PCR com sua cadeia IS6110, uma seqüência de DNA única para o *Complexo Mycobacterium tuberculosis*, apresenta dificuldades econômicas pelo seu alto valor, sua possibilidade de contaminação laboratorial e também por poder apresentar falsos-positivos para pacientes já tratados ou que apresentaram infecção pelo bacilo da tuberculose. Deve ser sempre interpretada à luz dos exames clínicos, laboratoriais e principalmente microbiológicos.

Consiste na amplificação dos fragmentos bacilares do DNA que é achado em espécimes diagnósticas. O teste aprovado para uso é o sistema Amplicor. Devem ser usadas espécimes que são positivas ao exame direto ou que estão crescendo no meio de cultura. A sensibilidade deste método diminui em várias séries estudadas quando realizados em amostras com baciloscopia negativa (95-96% a 48-53% ).

Um Workshop da ATS, modificado por Barm, recomenda empregar o MTD- GEN PROBE ou Amplicor ou PCR teste, considerando julgamento clínico empregado, incluindo classificação de risco dos pacientes, achados radiológicos e necessidade ou não de terapia empírica. Não se recomenda os testes de amplificação direta em pacientes que estão em alto risco para a tuberculose e que tem escarro positivo; estes deveriam receber terapia empírica.

As técnicas de amplificação não têm sido aprovadas oficialmente nos Estados Unidos em outros espécimes do que as secreções respiratórias , mas em futuro próximo, refinados métodos estarão disponíveis para o diagnóstico da tuberculose extrapulmonar.

A PCR constitui em uma arma promissora para o rápido diagnóstico de uma variedade de infecções pulmonares, e parece ser um grande avanço na prática clínica diária em um futuro muito próximo. Porém, muitos estudos realizados são limitados pela pequeno número de amostras incluídas nas séries e pela falta de uniformidade em definir o papel da mesma nas diferentes situações clínicas. Pneumologistas, infectologistas e microbiologistas deveriam concordar em realizar protocolos para a avaliação desta técnica, para a qualidade dos métodos de pesquisa e para a interpretação dos resultados. Custo-efetividade deveria ser muito contemplado nestes estudos, pois a técnica requer pessoal especializado e reagentes caros.

A técnica de Ziehl-Nielsen, culturas e teste de sensibilidade às drogas nos meios LJ e BACTEC são ainda os testes de referências diagnósticas para a tuberculose. Porém, o

crescimento lento das micobactérias, a severidade da doença e a falta de esquemas para estudos epidemiológicos tem aperfeiçoado na tuberculose uma aplicação para técnicas moleculares. As quatro maiores técnicas diagnósticas de áreas moleculares têm sido aplicadas: rápida identificação das micobactérias cultivadas; subtipos de espécies pelo método de DNA *fingerprinting*; rápida detecção de resistência antimicrobiana pela seqüência do DNA; análise de polimorfismo de espécies (PCR-SSCP) ou ensaio de linhas de prova (LIPA); detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em materiais clínicos complexos (GROSSET J; 1996).

Também a técnica de hibridização do IS6110, que é simples e reproduzível tem sido estandarizada nos laboratórios de biologia molecular (VAN EMBDEN JD, CAVE MD;1993).

Em New York foi feito um estudo da utilidade clínica da PCR no diagnóstico da tuberculose. O exame foi positivo em 37 pacientes e negativo em 28. Quando correlacionados com escarros, culturas, patologia e história clínica a sensibilidade da PCR para diagnóstico de tuberculose ativa foi de 100%. Porém, a especificidade para diagnóstico de tuberculose ativa foi de 70%, o que se explicaria por pacientes anteriormente tratados ou por infecção tuberculosa assintomática. Concluiu-se que a PCR para tuberculose é extremamente sensível mas perde em especificidade para o diagnóstico de tuberculose ativa. Seu papel na prática clínica deverá ser limitado a situações bem definidas, tais como pacientes HIV positivos com adenopatias intratorácicas e poderá ser mais útil em excluir a tuberculose do que considerá-la em pacientes selecionados. Dado ao custo do exame e as necessidades laboratoriais, este método não deve ser parte de avaliação inicial de rotina de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar (SCHLUGER NW, KINNEY D; 1994).

#### 4.8.11 Hemoculturas

A epidemia e o surgimento desta terrível doença devastadora revolucionou o pensamento lógico da Medicina sobre vários aspectos: infecções concomitantes no mesmo hospedeiro, infecções ainda não presenciadas e tratadas pela comunidade médica, difícil diagnóstico das mesmas e falhas na terapia convencional.

Entretanto, um dos mais intrigantes e fascinantes achados foi a possibilidade de se detectar no sangue, por métodos culturais as micobactérias, ou seja, estamos vivendo uma era de micobacteremia, até então apanágio das bactérias!

Em um estudo realizado a bacteremia pelo *Mycobacterium tuberculosis* foi estudada e descrita nesta população. As conclusões do trabalho mostraram que a micobacteremia ocorreu em 83% de pacientes com doença disseminada e em 8 % quando a forma da doença não era disseminada.

Estes achados demonstram a freqüente ocorrência de micobacteremia em hemoculturas, e adicionam este procedimento como auxiliar nos testes diagnósticos da tuberculose. Tais achados não são apanágio da mesma, podendo ocorrer também muito freqüentemente nas Micobacterioses Atípicas e denotando um cunho mais grave da evolução destes pacientes ( SHAFER,R; GOLDBERG,R; 1989).

No sul da África, o mesmo se detectou com o achado de 22% de hemoculturas positivas nos sédéticos, sendo que 10% das culturas foram positivas para o *Mycobacterium avium Complex* (MAC). ( GOTTBORG,A; SACKS,S; 2001)

#### 4.8.12 Pesquisa do Ácido Tuberculoesteárico (TBSA)

A pesquisa do TBSA em aspirados e lavados broncoalveolares tem se mostrado útil para o rápido diagnóstico da tuberculose pulmonar ativa em pacientes suspeitos. O TBSA (ácido [R]-10 methyloctadecanóide) é um componente estrutural da micobactéria e não está presente em tecidos humanos normais. A detecção do mesmo em espécimes clínicos como escarro e Líquido Cefalorraquidiano (LCR) pelo método da cromatografia gasosa e espectrometria de massa selecionará o íon monitor que tem sido rápido, sensível e específico para o diagnóstico da tuberculose (FRENCH GL, CHAN CY; 1987).

#### 4.8.13 Técnicas de Biologia molecular

Para esclarecer os usos apropriados e as suas limitações, o CDC e a ATS apresentam normas determinadas para o seu uso adequado.

##### GEN- PROBE ( *Ribotyping* )

MTD - teste direto de amplificação da micobactéria, de San Diego, California, emprega fragmentos do RNA ribossomal que são tipicamente presentes em múltiplas cópias e são característicos para o *Complexo Mycobacterium tuberculosis*. Ocorre amplificação por transcrição - mediação.

A original metodologia foi intitulada de ACCUPROBE e tem sido seguido por um mais rápido sistema, o MTD. O método MTD tem sido aprovado somente para uso em espécimes de escarro que são positivas ao exame direto e confirmam o *Complexo Mycobacterium tuberculosis*.

Se o teste for capaz de detectar o bacilo da tuberculose em amostras que são negativas ao exame direto, uso judicioso e selecionado, em casos de alto risco, podem ser considerados de utilidade clínica.

#### 4.8.14 Testes Sorológicos

Historicamente o primeiro teste imunodiagnóstico foi o teste tuberculínico (GRANGE JM; 1984).

Um indivíduo desenvolve tuberculose após a inalação de partículas contaminadas pelo bacilo da tuberculose. O bacilo desenvolve uma lesão primária nos alvéolos e envolve linfonodos locais. O crescimento do bacilo nos macrófagos alveolares não pode ser inibido; porém, até que o hospedeiro desenvolva imunidade celular e humoral (CANETTI G.;1955 ).As micobactérias são ricas em antígenos que estimulam a produção dos anticorpos e linfocinas ( CHAPARAS SD; 1981 ).Esta progressão de eventos levou Youmans a concluir que tuberculose é realmente uma doença do sistema retículoendotelial. ( YOUMANS GP;1979 )

Com sensíveis e específicos testes, podemos ser capazes de detectar uma significativa resposta ao antígenos do bacilo tuberculoso.

O desenvolvimento destes testes é, porém, problemático. Primeiro, a complexidade das micobactérias leva à reatividade cruzada entre os antígenos que podem conter combinação de carboidratos, proteínas e lipídeos. Portanto estes testes baseados em reações sorológicas necessitam ser precisos , sensíveis e específicos para os antígenos do bacilo tuberculoso.

Além disso, as respostas antigênicas podem variar dependendo do método usado para liberar o antígeno, a forma na qual o antígeno é apresentado, e a via pelo qual o mesmo é liberado (JANICKI BW, 1973).

Um teste precisa claramente diferenciar pessoas saudáveis daquelas com precoce tuberculose, daquelas com tuberculose avançada, de outras micobacterioses e daquelas com reações de hipersensibilidade a qualquer espécie de micobacterioses sem doença ativa.

O teste tuberculínico tem sido útil em definir estes grupos, mas testes mais específicos são necessários e que provém o resultado mais rapidamente. (THOMPSON NJ;1979).

Testes baseados em ELISA e de radioimunoensaio, têm sido estudados para a aplicação do diagnóstico da tuberculose com resultados pouco aceitáveis. Radin e associados relataram que pacientes com tuberculose ativa tinham níveis mais altos de IgG contra os antígenos mistos no derivado protéico purificado da tuberculina do que outras imunoglobulinas; então, a detecção de IgG com atividade específica contra os antígenos mistos é a base de muitos testes (RADIN RC; 1983). Zeiss e colegas usaram um método de ELISA para testar amostras séricas de pacientes com tuberculose ativa e amostras de pacientes saudáveis para os anticorpos IgG através do PPD. Valores obtidos do soro de pessoas com tuberculose foram claramente separados dos obtidos do soro de pessoas saudáveis ou de pessoas com Teste de Mantoux negativo. O mesmo autor demonstrou que o ELISA identificou 67% dos pacientes com cultura positiva (sensibilidade) e 79% dos com cultura negativa (especificidade) (ZEISS CR; 1984). Em outro estudo o mesmo grupo achou que o teste de ELISA poderia não facilmente diferenciar doenças causadas por fungos ou Micobacterioses Atípicas da tuberculose (KALISH SB; 1983). O método parece melhor quando o anticorpo IgG no LCR é quantificado como um método diagnóstico

adicional na meningite tuberculosa, mas uma completa avaliação do uso desse procedimento não tem sido reportada.

Chau concluiu que o valor diagnóstico do ELISA para a tuberculose ativa foi limitado (CHAU PY; 1987).

Outros estudos sugerem, porém, que o ELISA pode ser suficientemente sensível e específico para o diagnóstico da tuberculose de antígenos purificados usados na detecção do anticorpo. Daniel estudou o antígeno 5 e outros antígenos micobacterianos usando o método de ELISA. Embora o antígeno seja bem caracterizado, o mesmo não é originalmente específico (DANIEL TM; 1978 , DANIEL TM; 1987).

Testes sorológicos que usam anticorpos monoclonais para a detecção do antígeno apresentam outros problemas. Os testes que são designados para detectar anticorpos são positivos somente depois que mecanismos imunes têm sido estimulados e a resposta tenha começado. A resposta pode ser incompleta, quantitativamente insuficiente ou qualitativamente com larga reação, o que não é específico.

Shinnick e colab. identificaram um antígeno purificado denominado 65 kDa do *Mycobacterium leprae* que também é detectado por anticorpos monoclonais em outras espécies de *Mycobacterium sp.* Esta mistura de antígenos comuns estimula o desenvolvimento de um teste sorológico mais difícil devido ao fato de que diferentes antígenos precisam ser selecionados (SHINNICK TM; 1988).

Este método de particular interesse e importância, nas formas paucibacilíferas e extrapulmonares da doença, devido às suas particularidades diagnósticas.

Diferentemente de muitas outras doenças infecciosas nas quais o sorodiagnóstico tem se confirmado uma arma diagnóstica poderosa, a tuberculose tem apresentado largamente, tentativas e esforços em desenvolver uma metodologia que seja sensível, específica e de uso clínico prático.



O maior problema e dilema se concentram na escolha do antígeno a ser testado . Não menos importante é determinar a especificidade que distingue entre o estado de infecção e o estado de doença. A vacina pelo BCG intradérmico representa um outro intrigante fator questionador.

Estes dados seriam particularmente verdadeiros em nações em desenvolvimento, onde um simples teste sorológico seria de grande utilidade; em tais regiões, aproximadamente, 40% da população apresenta infecção latente e em necessidade de terapia empírica, com o objetivo de controle epidemiológico da doença, diminuição da sua morbidade e mortalidade. Não se recomendam os testes de amplificação direta em pacientes que apresentam alto risco para adoecimento por tuberculose e que tem escarro positivo; tais pacientes deveriam iniciar terapia empírica o mais breve possível.

Um número substancial de estudos tem sido utilizado em pacientes vacinados com *M. Bovis*, BCG, um membro do *Complexo Mycobacterium tuberculosis*, com resultados ainda indefinidos.

Outro significativo problema representa a distinção entre infecção atribuível às outras espécies de micobactérias, denominadas Micobactérias Atípicas (MOTT). Neste sentido , o importante seria considerar a epidemiologia da região, onde haverá menor incidência de tuberculose, principalmente nos países desenvolvidos e maior prevalência de micobactérias da espécie não tuberculosa, as denominadas MOTT.

Variados estudos e análises do sorodiagnóstico da tuberculose indicam que há uma variedade de antígenos potencialmente envolvidos, que existem diferentes respostas imunes associadas com diferentes formas de tuberculose, como doença cavitária, formas não cavitárias e extrapulmonares da doença. Curvas de Bayesian influenciam a utilidade dos testes entre as diferenciadas populações.

Antígenos variados têm sido utilizados nas pesquisas.

#### 4.8.14.1 Antígeno de 38 kilodaltons (38kDa)

Em alguns estudos foi positivo em 73% de formas extrapulmonares e em 70% de casos pulmonares com exame direto negativo, apresentando uma especificidade de 98% (ISEMAN M D; 2000).

Em outro estudo foi utilizado o Antígeno 38 kDa, juntamente com outros antígenos, em pacientes portadores de tuberculose pulmonar. Nas formas pulmonares bacilíferas, os resultados mostraram uma sensibilidade de 80% e especificidade de 10%. Por outro lado, constatou-se que a grande maioria dos testes sorológicos, nos pacientes com exame direto de escarro negativo, mostraram uma sensibilidade de apenas 15%.

A combinação do Ag 38 kDa com outros antígenos aumentou a sensibilidade para 64% e a especificidade para 95%. Entretanto, a complexidade e os custos desta metodologia são substancialmente menos atrativos e práticos para aplicação em larga escala.

#### 4.8.14.2 Antígeno 5

Vários estudos têm objetivado examinar o papel do Antígeno 5 no diagnóstico imunológico da tuberculose.

A maioria das investigações tem demonstrado uma sensibilidade marginal da técnica.

Em 1985 , um estudo utilizando o método de ELISA, em uma população com prevalência da doença em torno de 15%, um cenário altamente favorável para o emprego

do teste, mostrou resultados cuja sensibilidade variou de 45,8% a 63,4% e uma especificidade em torno de 98,3% a 91,5%, dependendo do título *cut-off* de 1:80 a 1:40.

Em um estudo realizado na Bolívia, a sensibilidade alcançada foi de 69% para pacientes com tuberculose pulmonar ativa e a especificidade foi de 88% (STEELE B, DANIEL TM; 1991).

Uma análise posterior deste estudo foi conduzida, considerando-se cinco possíveis opções diagnósticas :

- 1) Apenas o exame direto de escarro positivo;
- 2) Baciloscopia positiva e Rx compatível;
- 3) Baciloscopia seguida de exame radiológico se exame direto negativo
- 4) Baciloscopia negativa e teste de ELISA;
- 5) Somente o teste de ELISA.

As situações 2 e 3 apresentaram a maior probabilidade de diagnóstico correto, 95%, e o teste de ELISA isolado foi de 81%.

A conclusão obtida deste estudo foi que o método de ELISA não adicionou acréscimo ao diagnóstico, quando havia a possibilidade da realização de exame de escarro.

Na Argentina, realizou-se um estudo em 21 crianças, na faixa etária de 1 a 14 anos de idade, com tuberculose confirmada bacteriologicamente, comparando com 19 indivíduos controles, todos com BCG intradérmico. Os autores calcularam nesta população, uma média de prevalência da doença de 52,5%. O método mostrou sensibilidade de 85,7%, especificidade de 100%, uma acurácia de 92,5%, um valor preditivo positivo de 100% e um valor preditivo negativo de 86,4%. Os autores examinaram cuidadosamente o poder do Antígeno 5 quando os resultados foram negativos, excluindo então a presença de tuberculose.

**4.8.14.3 Antígeno 60**

O principal termoestável componente da tuberculina PPD é referido como Antígeno 60. Tal antígeno foi observado em bactérias do gênero *Nocardia* e *Corinebacterium*, como uma espécie micobacteriana.

Foi primeiramente empregado na Europa, avaliando níveis de IgM e IgG contra o antígeno 60.

Em 83 pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa, a sensibilidade, especificidade e o valor preditivo positivo para o IgM foram de 76%, 98% e de 95%, respectivamente, e para o IgG foram de 48%, 71% e 50%, respectivamente.

Analisando a combinação do IgG e do IgM, a sensibilidade foi de 68%, a especificidade de 100% e valor preditivo positivo de 100%. Neste estudo confirmou-se a tuberculose por exames de escarro. Os controles não foram bem caracterizados. A conclusão dos autores mostrou que os níveis de IgM, que refletiam mais recente experiência imunológica, foram mais úteis do que os níveis de IgG, anticorpos que mais provavelmente, representam infecção antiga.

Na China, em um estudo subsequente, utilizando o Antígeno 60, entre 560 pacientes com formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar foi comparado com 734 controles não infectados

Os resultados mostraram o seguinte:

- 1) Tuberculose Primária Ativa: IgM 80% e IgG 36%
- 2) Tuberculose Ativa Pós-primária: IgM 31% e IgG 88,5%
- 3) Tuberculose Inativa: IgM 0% e IgG 41%
- 4) Tuberculose Ativa Extrapulmonar: IgM 30% a 61%, IgG de 69% a 86%.

Entre 529 indivíduos saudáveis , a maioria com história de vacinação pelo BCG e 287 dos quais foram reatores, observou-se menos do que 1% de resultados falsos positivos. Nos casos de meningoencefalite tuberculosa, maiores concentrações de anti- A60 IgG foram encontradas no LCR, em relação ao soro, sugerindo a potencial utilidade deste método para o diagnóstico da meningoencefalite tuberculosa. Nenhum dos pacientes desta série era portador do vírus HIV.

Um estudo em Taiwan, com o Antígeno 60 mostrou resultados de sensibilidade de 80,8% e especificidade de 88,4% , com valores preditivos negativos e positivos de 93% e 71%.

O performance do Antígeno 60 foi melhor quando comparado com o do AG 38-Kd e Kp 90 , quando foram testados simultaneamente.

Combinando os antígenos testados, não houve vantagens significativamente diferentes entre os mesmos, quanto à sensibilidade e especificidade. Os autores concordam, em geral, que 80% de sensibilidade e especificidade foi a melhor performance do antígeno, fazendo-o um pobre teste confirmatório da doença.

#### 4.8.14.4 Antígeno 88 Kilodaltons

Recentemente foi identificado um novo grupo de antígenos que se acredita apresentarem potencial para o sorodiagnóstico da tuberculose.

Após análise, os autores acharam que proteínas secretadas contendo os antígenos contra respostas humorais foram mais comumente previsíveis durante a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

Particularmente, eles identificaram o antígeno 88KD que elicitou uma forte resposta de anticorpos em uma alta proporção de pacientes com tuberculose pulmonar.

Em indivíduos HIV infectados estes anticorpos foram presentes no soro de 74% dos casos, de 1,5 a 6 anos antes das manifestações clínicas da tuberculose; curiosamente, porém, os anticorpos estavam presentes em apenas 66% dos pacientes no tempo em que a tuberculose foi diagnosticada.

Isto sugere que a capacidade para produzir anticorpos esteja diminuída no tempo da tuberculose ativa, diminuindo a utilidade do sorodiagnóstico. Estes resultados apontaram para *screening* de população HIV infectados com Antígeno 88-KD, com resultados positivos, para serem precoces candidatos à quimioprofilaxia com Hidrazida. Não foram analisados dados de comparação com Reação de Mantoux.

Porém, em um estudo similar na Itália, anticorpos séricos para 2 antígenos, chamados anti-PPD e anti-diacyl-tretalon estavam presentes um ano antes do diagnóstico da tuberculose em 11 de 16 (69%) dos HIV infectados e destes somente 41 de 16 (25%) eram reatores ao PPD.

#### 4.8.14.5 Análise de Multi-antígenos

Em 1993, um grupo da Alemanha, realizou um estudo sorológico para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. Noventa e um casos de tuberculose foram comparados com 17 pacientes com tuberculose em tratamento e com 220 controles. O grupo controle incluiu indivíduos de áreas endêmicas de tuberculose, pacientes com Sarcoidose e Doença de Crohn e 100 indivíduos saudáveis. Os autores empregaram seis diferentes antígenos purificados com pesos moleculares de 10.000; 16.000;24.000;30.000; 38.000 e 70.000 kDa para os quais o teste de Elisa foi realizado. O anticorpo monoclonal TB 72 foi também testado, comparando-o com o método de Elisa.

Enquanto a especificidade dos resultados positivos para os antígenos individuais foi alta, variantes de 95% a 98%, os achados de sensibilidade foram baixos (29% a 51%).

Os melhores resultados foram obtidos quando se testou a combinação dos testes utilizando antígeno 16.000 kDa e anticorpo monoclonal TB 72, mostrando uma sensibilidade de 65% e especificidade de 96%. O valor preditivo positivo variou em relação à prevalência da doença na população estudada. Se usada num grupo de pacientes com prevalência de 30% de tuberculose, os valores preditivos positivos para os vários antígenos foram de 81% a 91%, mas se usados em um grupo de baixa prevalência, por exemplo 1%, o valor preditivo positivo não mostrou utilidade. Neste estudo não havia micobactérias não-tuberculosas, e, no grupo controle e entre os HIV infectados e tuberculose ativa, os resultados dos testes sorológicos foram substancialmente reduzidos.

#### 4.8.14.6 ANTÍGENO LIPOARABINOMANNAN (LAM)

O antígeno LIPOARABINOMANNAN -LAM- representa um importante constituinte da parede celular micobacteriana, possivelmente relacionado à virulência do bacilo tendo sido estudado primeiramente no México.

Em resultados iniciais, anticorpos IgG contra LAM foram medidos em 66 pacientes com tuberculose pulmonar, linfática e pleural, comparando com grupo controle de saudáveis, grupo de pacientes com Histoplasmose e com um grupo de pacientes com doenças pulmonares não infecciosas micobacterianas. Na análise dos autores, o teste do Antígeno LAM mostrou uma sensibilidade de 73% e uma especificidade de 92%, resultados considerados satisfatórios e entusiasmantes em um primeiro momento. Curiosamente, a mais baixa sensibilidade foi observada em pacientes com tuberculose

pleural ( 43%), possivelmente indicando infecção adquirida recentemente , com baixos títulos. Em alguns estudos seguintes, o antígeno LAM foi estudado em pacientes com tuberculose ativa, bacilífera, com resultados variados de sensibilidade e especificidade.

O método mostrou sensibilidade de 88%, em média, em tuberculose bacilífera, 67% em tuberculose não-bacilífera, por exame direto ou cultural. Em pacientes com tuberculose e AIDS, a sensibilidade foi mais baixa, em torno de 57%. No grupo controle e em pacientes portadores de outras doenças pulmonares a especificidade do teste foi de 100%. Os autores especulam que o LAM que foi testado neste estudo, representou a maioria complexos antígeno-anticorpo circulantes. Na primeira pesquisa os autores mediram apenas o anticorpo.

Apesar dos baixos níveis de LAM encontrados nos pacientes portadores de AIDS e tuberculose, eles concluíram que o LAM que é liberado como produto do bacilo do tubérculo é degradado pelos macrófagos e, devido, às defesas diminuídas do hospedeiro, haveria menor quantidade deste antígeno carbohidratado liberado na circulação.



## **5. Objetivos**

### **5.1 Gerais**

Determinar o valor de um método humoral para o diagnóstico da tuberculose, através de um teste de reação antígeno-anticorpo IgG.

### **5.2 Hipótese de Trabalho**

O desafio antigênico representado pela parede celular da micobactéria poderia desencadear uma reação antígeno-anticorpo que expressaria atividade da infecção tuberculosa, e se constituiria em recurso diagnóstico adicional da tuberculose doença.

## **6. Material e Métodos**

### **6.1 Delineamento do estudo**

O presente estudo tem o propósito de avaliar um método sorológico na Tuberculose, explorando o papel e a importância da imunidade humoral, através um estudo de delineamento de teste diagnóstico.

### **6.2 População de Estudo**

A série estudada compreendeu 173 pacientes portadores de tuberculose pulmonar e extrapulmonar. Da série analisada, a tuberculose foi confirmada em 160 casos. A doença não foi confirmada por método bacteriológico ou anatomopatológico em 13 casos, mas os mesmos foram incluídos na série e considerados como portadores de tuberculose através de critérios clínicos, radiológicos e de seguimento após tratamento específico. Formas pulmonares exclusivas compreenderam 88 casos, sendo que destes, 81 apresentaram baciloscopia direta do escarro positiva com os seguintes resultados: 42 com BAAR +, 17 com BAAR++ e 26 com BAAR +++.O exame cultural nestas amostras foi positivo em 25 casos. Em 7 casos, o exame baciloscópico foi negativo, sendo a cultura positiva em 3 casos. Formas extrapulmonares compreenderam 71 casos e formas combinadas de tuberculose pulmonar mais extrapulmonar ocorreram em 14 casos.

O grupo controle compreendeu 77 indivíduos, todos submetidos ao teste MycoDot, com a seguinte distribuição: 41 indivíduos hígidos; 16 eram portadores de lesões residuais

de tuberculose; 6 indivíduos sadios sem BCG ID; 6 indivíduos sadios com BCG ID e 8 pacientes com outras comorbidades, exceto tuberculose.

### **6.3 Tempo de Duração do Estudo**

Este estudo foi realizado de janeiro de 1995 a dezembro de 1997

### **6.4 Local do Estudo**

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com pacientes internados em enfermarias e provenientes do ambulatório de Tuberculose. A minoria dos casos foi recrutados do Posto de Saúde Modelo e um pequeno número de pacientes foram oriundos do Complexo Hospitalar Santa Casa e do Hospital Sanatório Partenon. O grupo controle constituiu-se de pacientes hospitalizados no HCPA e além dos 53 indivíduos sadios, sendo a maioria representada por acadêmicos do curso de Medicina da UFRGS.

### **6.5 Realização do Teste**

O teste MycoDot foi realizado em toda série estudada, coletando-se amostras séricas dos pacientes e procedendo-se, após a coleta, a realização do teste pela própria autora. A interpretação foi feita pela mesma e por mais três acadêmicos de medicina. Nenhum dos quatro examinadores obteve informações prévias dos pacientes ou das amostras séricas durante o período de interpretação do teste. O teste utilizado foi o MycoDot cujo antígeno

foi o LIPOARABINOMANNAN ( LAM ), considerado como altamente purificado, que faz parte da membrana celular do bacilo, adquirido de Cambridge, MA, USA.

### **6.6 Descrição do Teste**

O mesmo utiliza o antígeno LAM que se apresenta ligado aos pentes que acompanham o KIT. Quando os pentes são incubados e diluídos no sangue ou soro, específicos anticorpos anti-LAM do soro do paciente, se presentes, se ligarão ao antígeno. Os pentes são então lavados para remoção dos anticorpos não específicos e incubados em uma suspensão de partículas coloridas que se ligarão aos anticorpos anti-LAM. Se suficiente quantidade de anticorpos específicos estão presentes na amostra de soro examinada, uma mancha colorida de tonalidade vermelha se formará quando o antígeno ligado ao pente estiver presente.

A sensibilidade do teste é calibrada sendo que somente casos de doença micobacteriana ativa, como a tuberculose gerarão uma mancha colorida, que é tão ou mais forte que a mancha mais fracamente colorida apresentada no pente de referência, comprovando a natureza positiva do teste, como um guia para a interpretação dos resultados do mesmo, realizados através da leitura direta do examinador, macroscopicamente.

### **6.7 Procedimento do Teste**

O teste se constitui nos seguintes passos:

1. Colocar 5 gotas da amostra diluente, em 8 colunas alternadas na placa específica para cada amostra a ser testada, e também para o soro controle positivo e negativo. Amostras de controles negativos e positivos foram rigorosamente testadas prévio à realização de cada teste a ser examinado.

2. Adicionar 4 gotas da amostra reagente às colunas adjacentes na placa de cada amostra sérica a ser testada.

3. Adicionar 10 microlitros de soro ou plasma a cada amostra do diluente. Deve-se então misturar o conteúdo através de uma pipeta de laboratório. Este procedimento deve ser feito várias vezes, com movimentos circulares.

4. Remover o pente acondicionado em invólucro fechado e mergulhá-lo no espaço até acima dos dentes, com o número apropriado para cada amostra sérica a ser testada.

5. Aguardar 6 minutos, segurando o pente verticalmente, com os respectivos dentes apontados para baixo, colocar o pente, na primeira coluna das amostras diluídas e esperar o tempo adequado. Cuidadosamente remover o pente com movimentos anteriores e posteriores por 8 a 10 vezes.

6. Passados 6 minutos, remover o pente e colocar os respectivos dentes, cuidadosamente, em um papel absorvente, a fim de remover o excesso de líquido. Colocar somente as pontas dos respectivos dentes para evitar contaminação. Colocar os dentes do pente em tampão diluído, fazendo movimentos anteriores e posteriores com o pente através

da solução tampão por 10 vezes. Novamente, colocar os dentes no papel absorvente e novamente remover o excesso de líquido.

7. Aguardar 10 minutos, colocar os dentes do pente na solução reagente e esperar 10 minutos. Neste período, gentilmente, mover o pente 8 a 10 vezes.

8. Ao término dos 10 minutos, remover o pente e repetir os passos do item 6. A solução de tampão diluída necessita ser trocada depois de dois pentes utilizados.

9. Retirar o excesso de líquido e colocar o pente ao ar seco. Para determinar o resultado de cada amostra, colocar o pente em uma superfície sólida e seca e fazer a leitura de maneira perpendicular ao pente. Evitar luz fosforescente para eliminar dados contraditórios da leitura final. Comparar as intensidades das reações do teste, tendo como referência o pente padrão que acompanha o kit. Evitar muita iluminação no pente ou observá-lo em um ângulo que poderá tornar a interpretação da leitura difícil. Colocar o pente contra uma superfície clara e branca para tornar mais fácil a interpretação da leitura.

10. Interpretar os resultados como positivos(+) ou negativos(-)

11. Quando o pente estiver seco, o mesmo deve ser coberto com um adesivo transparente, servindo para a sua conservação permanente.

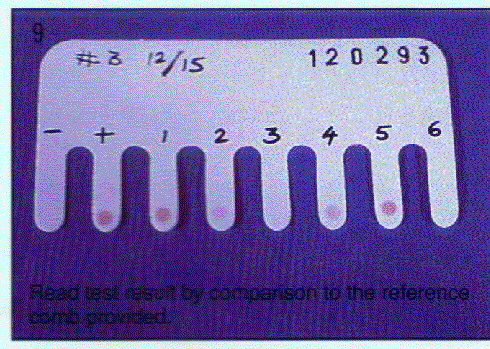
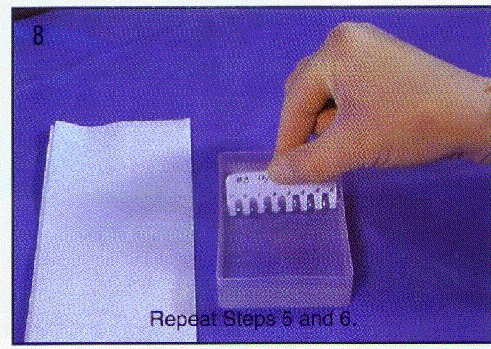
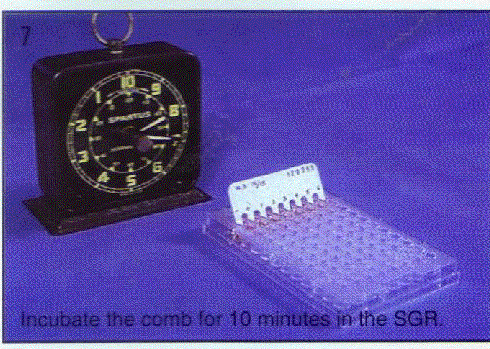
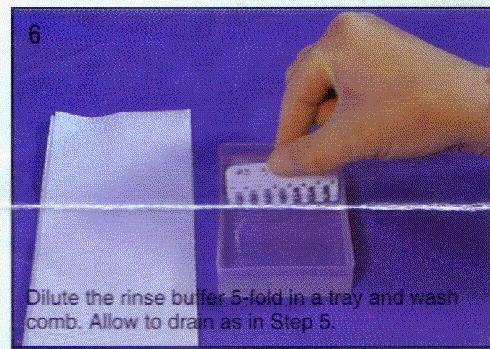
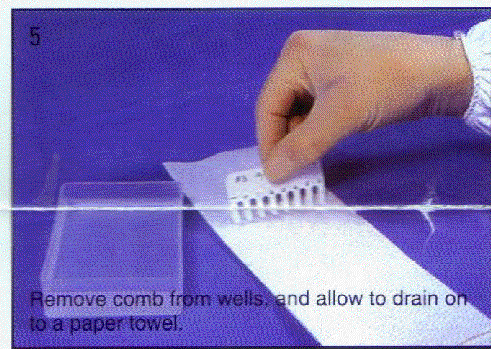
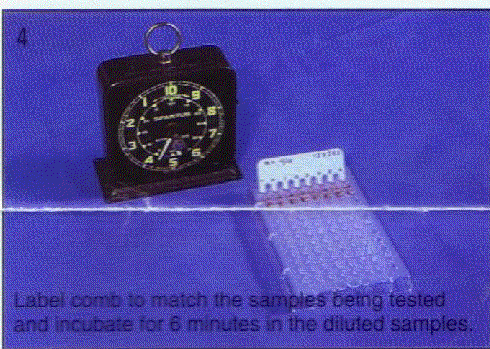
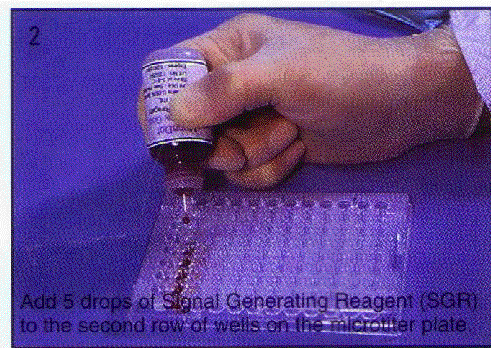
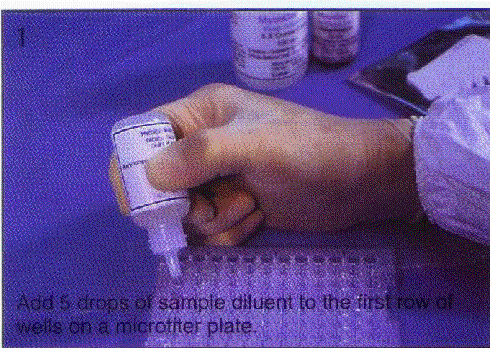


Figura 3 Procedimento do Teste

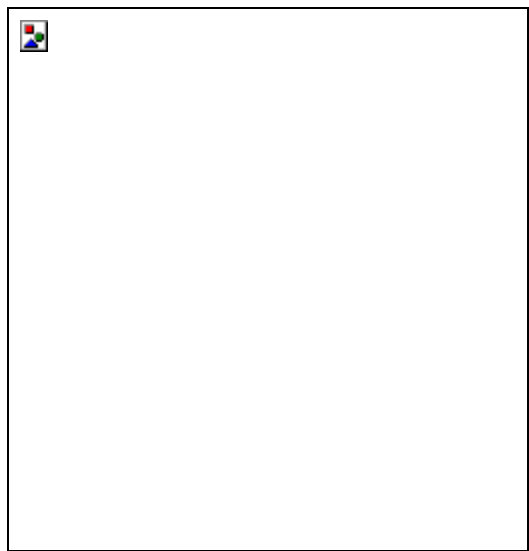


Figura 4 Leitura do Teste MycoDot

### **6.8 Interpretação dos Resultados:**

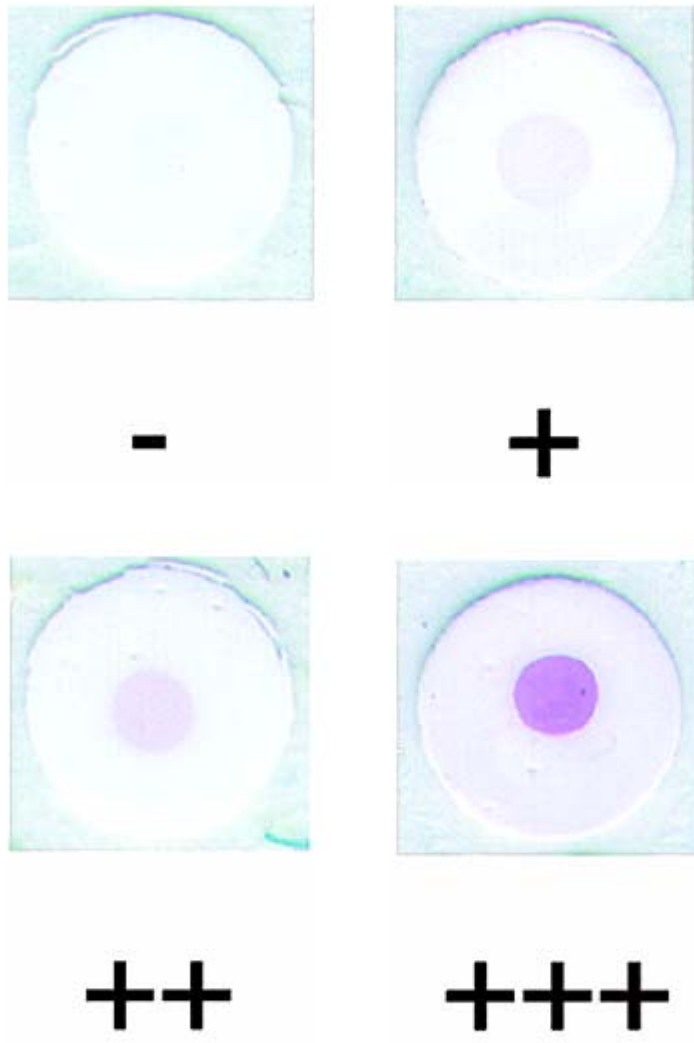
Para se realizar a interpretação da reação gerada pelo teste MycoDot, deve-se sempre utilizar o pente de referência que acompanha o kit do teste. O achado de uma mancha tão intensa, ou mais intensa do que a mais fracamente colorida mancha do pente kit, padrão, deve ser considerada uma reação positiva. O achado de uma mancha com coloração mais fraca que a mais fraca do teste pente padrão ou o achado de nenhuma coloração, indicará o teste como negativo. Para reações consideradas *borderline*, recomenda-se que após 2 a 4 semanas uma nova amostra sérica seja retestada.

O teste MycoDot foi realizado de acordo com as normas padrão, tendo sido realizadas pela própria autora e lidas por três pessoas que desconheciam os respectivos pacientes e amostras. A própria autora teve comportamento cego na leitura dos resultados. Cada amostra de kits permitiu a realização de 36 testes.

### **6.10 Leitura do Teste MycoDot**

A figura abaixo demonstra a interpretação e leitura do Teste MycoDot, sendo as colorações de intensidade maior ou menor interpretadas como positivas e as sem coloração como negativas.





*Figura 6.3 Interpretação do Teste MycoDot*

### **6.11 Padrão-Ouro**

Foi considerado como padrão-ouro o diagnóstico de tuberculose. Nos casos onde pode ser realizada a cultura obtendo-se os resultados culturais através do método de Lowenstein-Jensen, a mesma foi considerada como caso confirmado. Na época da pesquisa não era disponível em nosso meio hospitalar a técnica do método BACTEC.

Da série total de 173 casos foram realizadas 145 culturas.

Nos casos onde não se conseguiu detectar o BAAR, a clínica, os exames radiológicos e a evolução após tratamento permitiram incluí-los na casuística.

### **6.12 Acompanhamento dos Pacientes com Exames Diretos e Culturais**

#### **Negativos:**

Os casos ditos como prováveis casos de tuberculose foram acompanhados por 60 dias e observou-se dados clínicos e radiológicos, podendo considerá-los também como casos índices da pesquisa em estudo e incluí-los na amostra.

### **6.13 Banco de Dados**

O Banco de Dados foi elaborado através do programa Epiinfo SPSS e através do qual foram geradas tabelas de frequência e *crossables* com as variáveis analisadas.

#### **6.14 Análise Estatística**

Foi realizada pela apresentação dos dados obtidos em valores absolutos e percentuais- análise descritiva.

Foram realizados os cálculos dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo com os respectivos intervalos de confiança que foram de 95%.

#### **6.15 Protocolo da Pesquisa**

O protocolo em anexo foi aplicado a todos os pacientes da série estudada.

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA TUBERCULOSE**

1. Nome do Paciente: \_\_\_\_\_
2. Registro no HCPA: \_\_\_\_\_
3. Nº de inscrição na SSMA: \_\_\_\_\_ -
4. Endereço Completo \_\_\_\_\_
5. Telefone (contatos): \_\_\_\_\_
6. Idade: \_\_\_\_\_
7. Sexo: M ( ) F ( )
8. Cor: B ( ) P ( ) M ( )
9. Forma de Tuberculose: ( a ) Pulmonar: ( ) bacilífera ( ) não-bacilífera  
(b) Extrapulmonar Especificar: \_\_\_\_\_  
(c) Ambas Especificar: \_\_\_\_\_
10. Método Diagnóstico: ( a ) BAAR –Exame direto no escarro ( ) + ( ) ++ ( ) +++  
( b ) Cultural positivo escarro e outros materiais  
Especificar: \_\_\_\_\_  
( c ) Fibrobroncoscopia: Exame Direto ( )  
Exame Cultural ( )  
Biópsia Transbrônquica (BTB) ( )  
(d) Outros AP de biópsia: Especificar: \_\_\_\_\_  
(e) Outro método: Especificar: \_\_\_\_\_

**11. Exame Radiológico do Tórax**

Descrição:

---

---

---

12. Reação de Mantoux:

Reator Forte

Reator Fraco

Não-reator

Não realizado

13. BCG  SIM  NÃO  SEM INFORMAÇÃO

14. DOENÇAS ASSOCIADAS:

SIDA

Diabete Mellitus

Neoplasia

Outras Especificar: \_\_\_\_\_

15. TUBERCULOSE CONFIRMADA  SIM  NÃO

Método: \_\_\_\_\_

16. TUBERCULOSE PROVÁVEL Especificar: \_\_\_\_\_

17. RESULTADO DO MYCODOT:  POSITIVO

NEGATIVO

18. MOMENTO DA REALIZAÇÃO DO TESTE:

No diagnóstico

Após 15 dias de tratamento

Após 30 dias de tratamento

**6.16 Casuística**

A população estudada compreendeu uma série de 173 pacientes, portadores de tuberculose pulmonar, tuberculose extrapulmonar isolada e ambas as formas pulmonar e extrapulmonar concomitantemente.

Foram estudados 173 pacientes com a seguinte distribuição quanto ao sexo: 115 do sexo masculino, o que representou 66,5% da série e 58 do sexo feminino o que representou 33,5%.

*Tabela 6.1 Distribuição da casuística em relação ao sexo*

<i>Sexo</i>	<i>Frequência</i>	<i>(%)</i>
Masculino	115	66,5
Feminino	58	33,5
Total	173	100

Quanto às características étnicas, 131 indivíduos eram da raça branca, 18 mistos e 24 negros, com as respectivas porcentagens de 75,7%, 10,4% e 13,9%.

*Tabela 6.2 Distribuição da casuística em relação à raça*

<i>Raça</i>	<i>Frequência</i>	<i>(%)</i>
Branca	131	75,7
Preta	24	13,9
Mista	18	10,4
Total	173	100

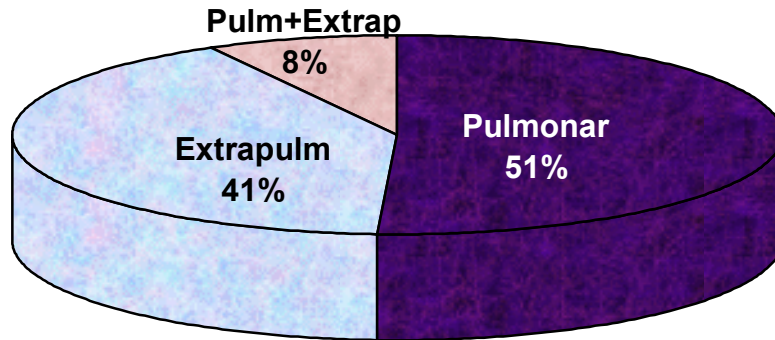
O estudo foi prospectivo, com coleta de dados completos de cada paciente. A casuística preencheu rigorosamente os critérios de tuberculose doença, definidos pelos autores. Estes compreenderam exames baciloscópicos –BAAR direto – positivos +, ++, +++; exames culturais pelo método tradicional de LJ – Lowenstein- Joenhsen , biópsias de sítios extrapulmonares compatíveis com exame anatomo-patológico, demonstrando doença granulomatosa e/ou com a realização da pesquisa de BAAR na peça. Da série analisada foram realizadas 145 exames culturais.

Em 28 casos o diagnóstico foi sugerido por criteriosa avaliação clínica, radiológica , com seguimento clínico- radiológico após início de tratamento, em um período aproximado de 60 dias, sendo considerados também como casos índices.

Todos os pacientes foram submetidos a um protocolo de investigação, devidamente elaborado. Após a coleta dos dados necessários e preenchendo os critérios de inclusão para o estudo, foi colhida 3 ml de amostra sanguínea, devidamente acondicionada para a realização do teste MycoDot no tempo devido. A coleta do material sangüíneo foi realizada após consentimento formal do paciente, no momento do diagnóstico da doença. Todos os pacientes eram virgens de tratamento, portanto, sem história prévia do mesmo.

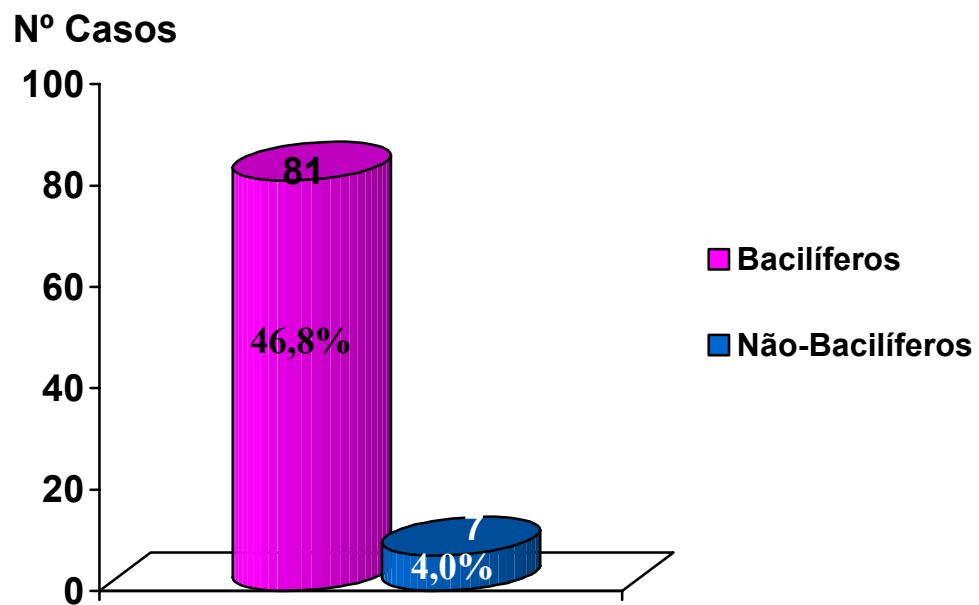
Quanto à distribuição das formas da doença, a freqüência foi a seguinte:

Formas pulmonares com pesquisa de BAAR positiva em 81 casos, o que representou 46,8% do total; formas pulmonares com baciloscopia do escarro negativa em 7 casos (4%); formas extrapulmonares da doença em 71 casos ( 41%) e em 14 casos as formas foram combinadas, o que representou 8,1% da série total. A figura abaixo mostra a distribuição dos pacientes de acordo com as formas da doença. Em 89 casos o exame foi positivo para BAAR, em vários espécimes examinados, o que representou 51,4% do total dos casos.



*Figura 1: Tuberculose: Formas da doença na casuística*

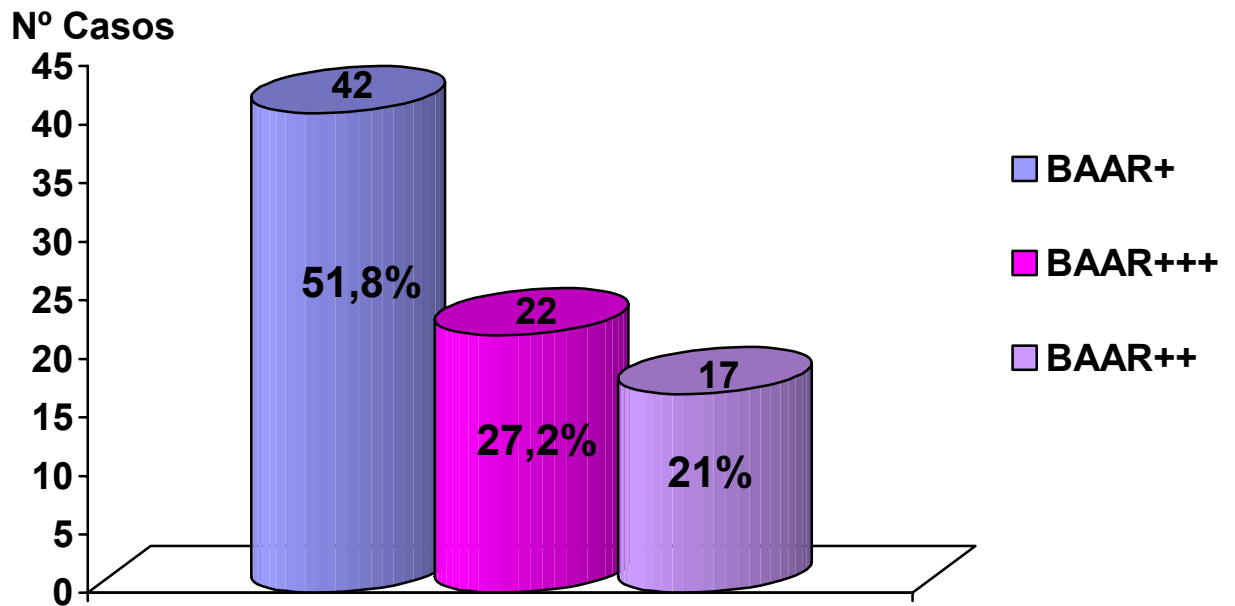
6.16.1 Formas Pulmonares



*Figura 6.5 Casuística: Bacilíferos e Não bacilíferos*



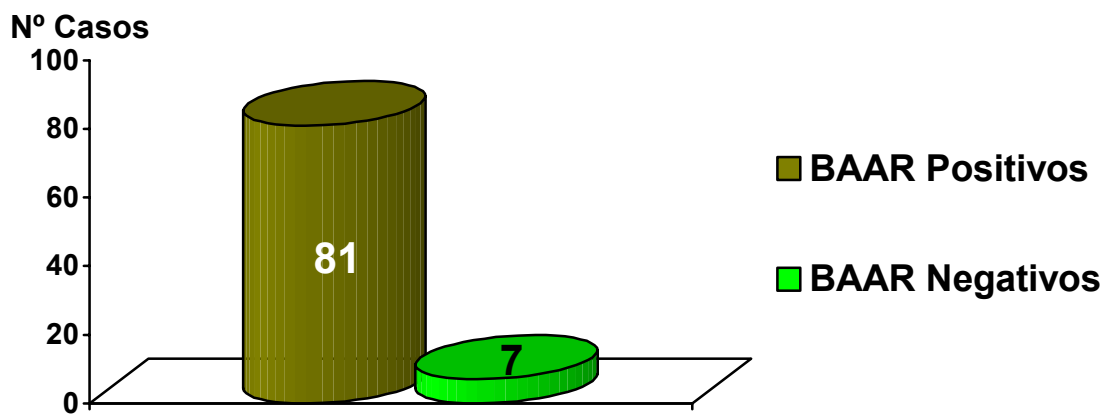
Entre as formas pulmonares exclusivas, 81 casos foram positivos à pesquisa do BAAR, representando 46,8% da série. Em 7 casos a pesquisa do BAAR foi negativa, o que representou 4,0%. Entre os bacilíferos, a distribuição foi a seguinte: o achado de +++ foi encontrado em 22 casos, o que representou 27,2% da série; ++ foi encontrado em 17 casos, 21% da série e + ocorreu em 42 casos, representando 51,8% da série.



*Figura 6.6 Distribuição dos Bacilíferos em relação à baciloscopia*

6.16.2 Formas Pulmonares com Pesquisa Direta de BAAR Negativa

Da série analisada, apenas 7 pacientes apresentaram baciloscopia direta negativa

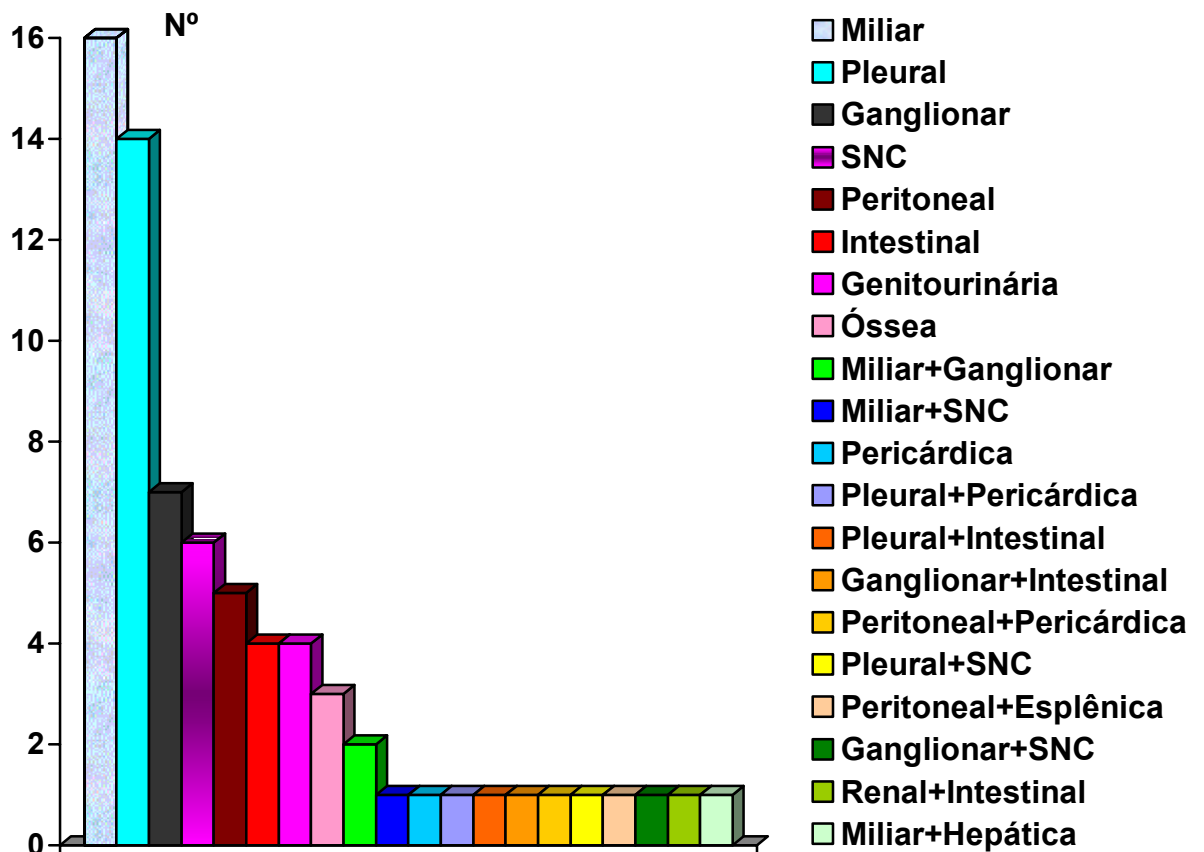


*Figura 6.7 Distribuição da série em relação à baciloscopia*

(4% da série total).

**6.16.3 Formas Extrapulmonares**

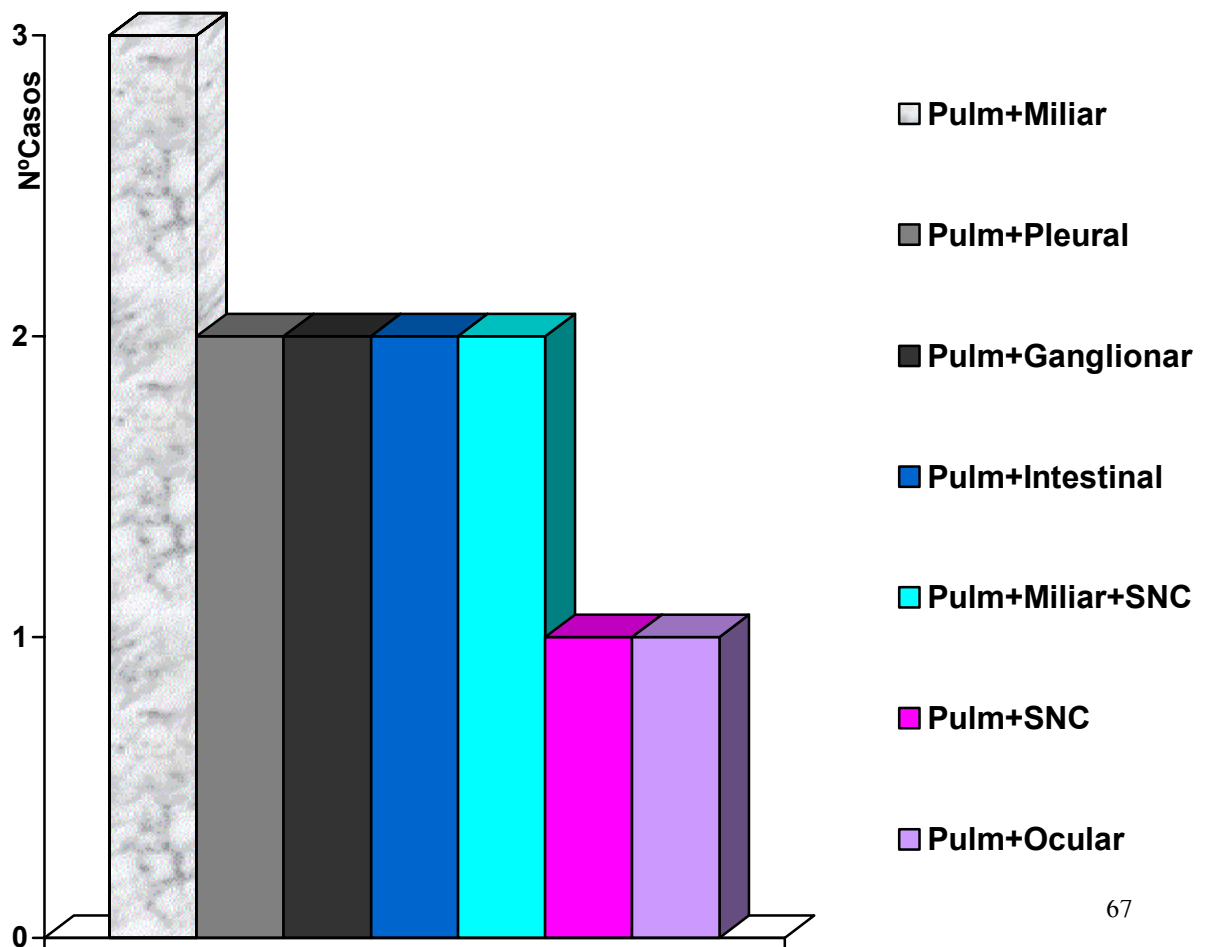
Compreenderam 71 casos com as seguintes apresentações: forma miliar em 16 casos ( 22,5%); ganglionar em 7 casos (9,8%); pleural em 14 casos (19,7%); intestinal em 4 casos (5,6%); SNC em 6 casos (3,4%); pericárdica em 1 caso (1,4%); óssea em 3 casos (4,2%); sistema genito-urinário em 4 casos ( 3,6%); miliar e ganglionar em 2 casos (2,8%); pleural mais pericárdica em 1 caso (1,4%); peritoneal em 5 casos (7%); pleural mais intestinal em 1 caso (1,4%); ganglionar mais intestinal em 1 caso (1,4%); peritoneal mais pericárdica em 1 caso (1,4%); pleural mais SNC em 1 caso ( 1,4% ); peritoneal mais esplênica em 1 caso (1,4%); ganglionar mais SNC em 1 caso (1,4%); renal mais intestinal em 1 caso ( 1,4%); miliar mais hepática em 1 caso (1,4%).



*Figura 6.8: Casuística: Formas Extrapulmonares*

6.16.4 Formas Pulmonares mais Extrapulmonares:

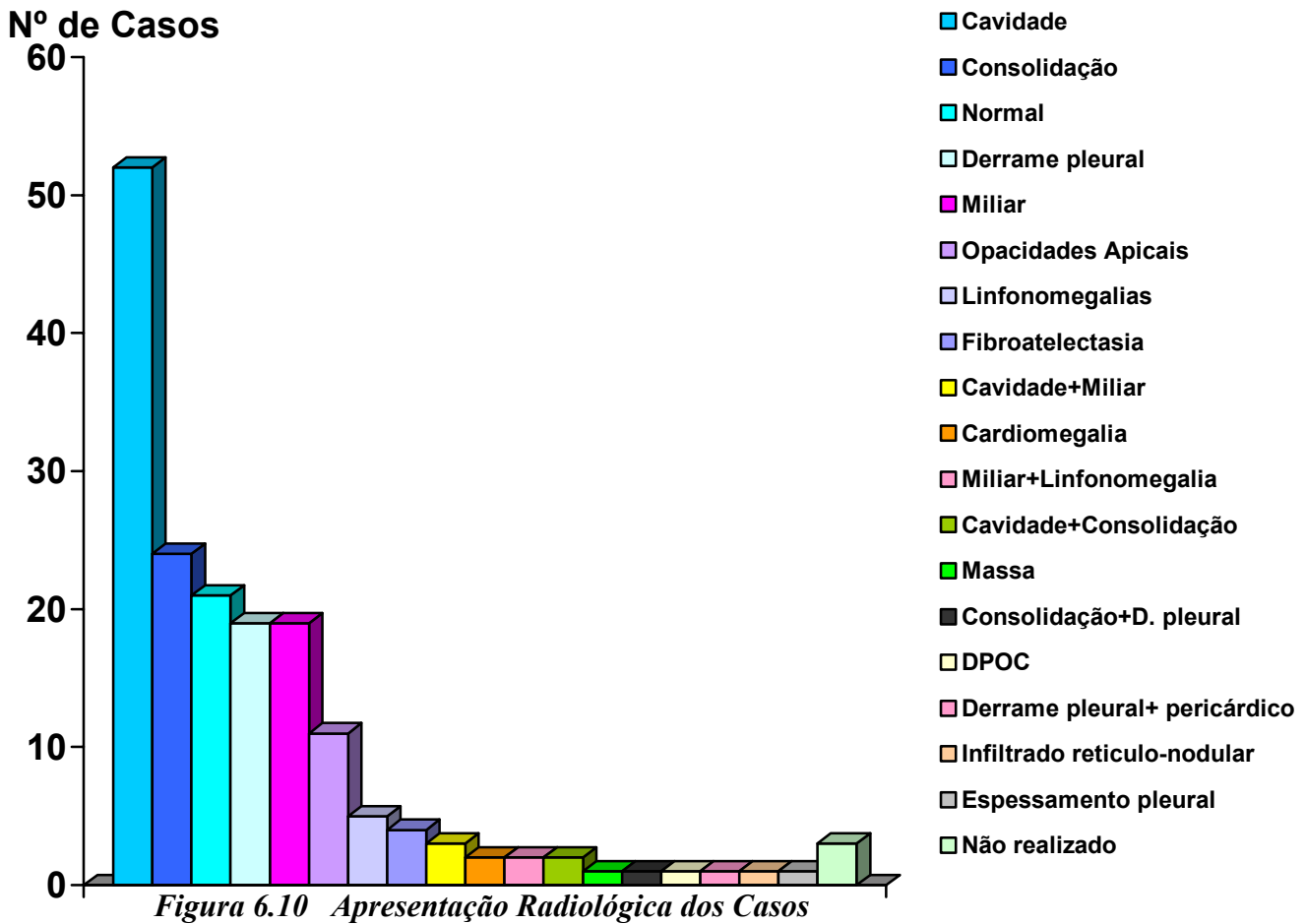
Compreenderam 14 casos (8,1%) da série total. A apresentação se constitui em: forma pulmonar mais miliar em 3 casos (21,4% ); pulmonar mais ganglionar em 2 casos (14,2%); pulmonar mais pleural em 2 casos (14,2%); pulmonar mais intestinal em 1 caso (7,1%); pulmonar mais SNC em 1 caso (7,1%); pulmonar mais óssea em 1 caso (7,1%); pulmonar, miliar e SNC em 2 casos (14,2%); pulmonar mais intestinal em 1 caso (7,1%) e pulmonar mais ocular em 1 caso (7,1%).



**Figura 6.9 Formas Pulmonares mais Extrapulmonares**

#### 6.16.5 Achados Radiológicos:

O exame radiológico de tórax foi realizado em 170 pacientes da série. Os achados radiológicos encontrados foram os descritos abaixo e visualizados na figura a seguir. Lesões escavadas ocorreram em 52 casos (30,1%); em 24 casos havia achados de consolidação (13,9%); 21 casos não demonstraram anormalidades radiológicas, sendo o exame considerado como normal (12,1%); em 19 casos o exame mostrava derrame pleural ( 11,0%); achados compatíveis com pulmão miliar foi encontrado em 19 casos ( 11,0%); em 11 casos foram descritas opacidades apicais ( 6,4%); fibroatelectasia encontrou-se em 4 casos ( 2,3%); achado de lesão em massa ocorreu em apenas 1 caso ( 0,6%); consolidação e derrame pleural em 1 caso ( 0,6%); padrão miliar e cavidade em 3 casos ( 1,7%); padrão miliar e linfonomegalias em 2 casos ( 1,2%); cavidade e consolidação em 2 casos(1,2%); achados de DPOC em 1 caso (0,6%); cardiomegalia em 2 casos ( 1,2%); derrame pleural e derrame pericárdico em 1 caso (0,6%); infiltrado reticulo-nodular em 1 caso (0,6%) e espessamento pleural em 1 caso (0,6%) .



6.12.6 Materiais Biológicos Examinados :

O exame do escarro foi realizado em 90 casos ( 52,0 %); exames diretos e culturais do lavado broncoalveolar ( LBA ) em 5 casos (2,9%); líquido pleural em 8 casos ( 4,6%); biópsia de pulmão em 2 casos ( 1,2%); biópsia de linfonodo em 16 casos ( 9,2%); exame do LCR em 8 casos ( 4,6%); biópsia pleural em 7 casos ( 4,0%); biópsia e culturais de medula óssea em 3 casos ( 1,7%); biópsia hepática em 4 casos ( 2,3%); exame do líquido pericárdico em 1 caso ( 0,6%); exame de fezes em 1 caso (0,6%); exame do escarro mais líquido pleural em 1 caso (0,6%); exame do líquido peritoneal em 2 casos ( 1,2%); biópsia de peritônio em 3 casos ( 1,7%); biópsia óssea em 3 casos ( 1,7%); cultural da urina

## Resultados

## Antígeno LAM

em 3 casos ( 1,7%); fezes mais escarro em 1 caso (0,6%), escarro mais linfonodo em 1 caso (0,6%); biópsia renal em 1 caso (0,6%); biópsia de endométrio em 1 caso (0,6%), cultural do lavado gástrico em 2 casos (1,2%); líquido pericárdico e líquido pleural em 1 caso (0,6%); biópsia de peritônio e líquido pericárdico em 1 caso (0,6%); biópsia de peritônio mais punção aspirativa de baço em 1 caso (0,6%); biópsia de ceco em 1 caso (0,6%); lavado gástrico e biópsia hepática em 1 caso (0,6%); exame de escarro e de LCR em 2 casos (0,6%); exame de escarro mais exame cultural e PCR em 1 caso (0,6%).

Na próxima página, apresenta-se a figura dos espécimes avaliados no estudo.

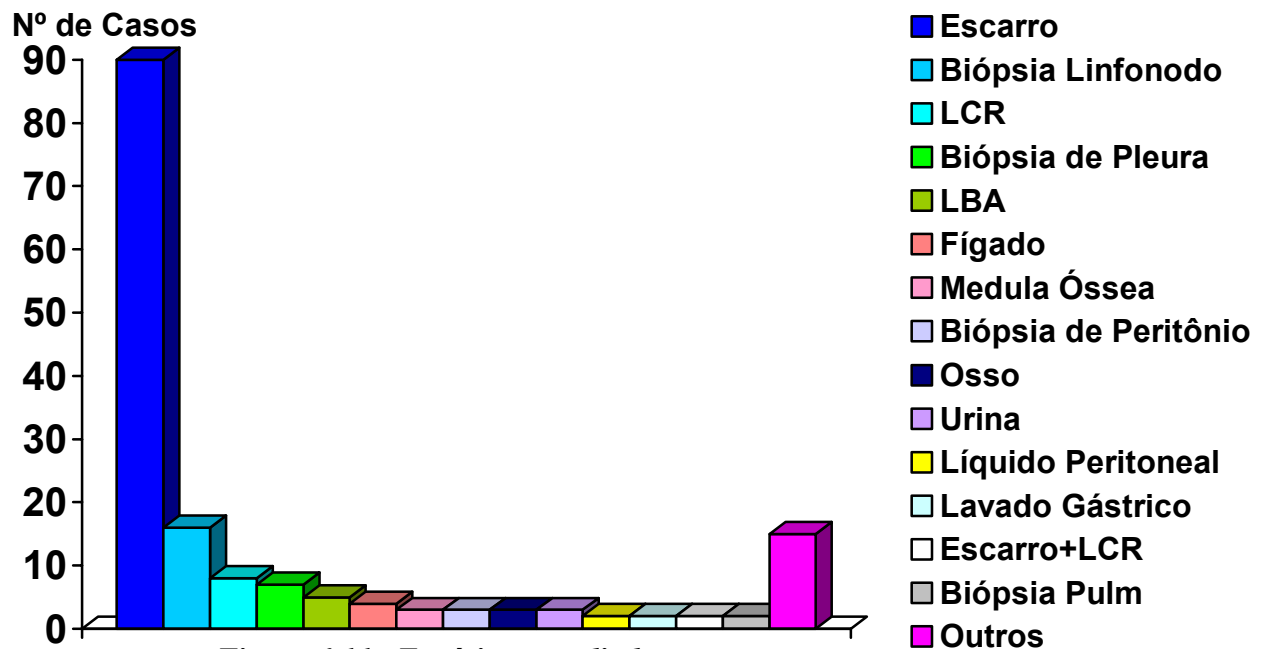
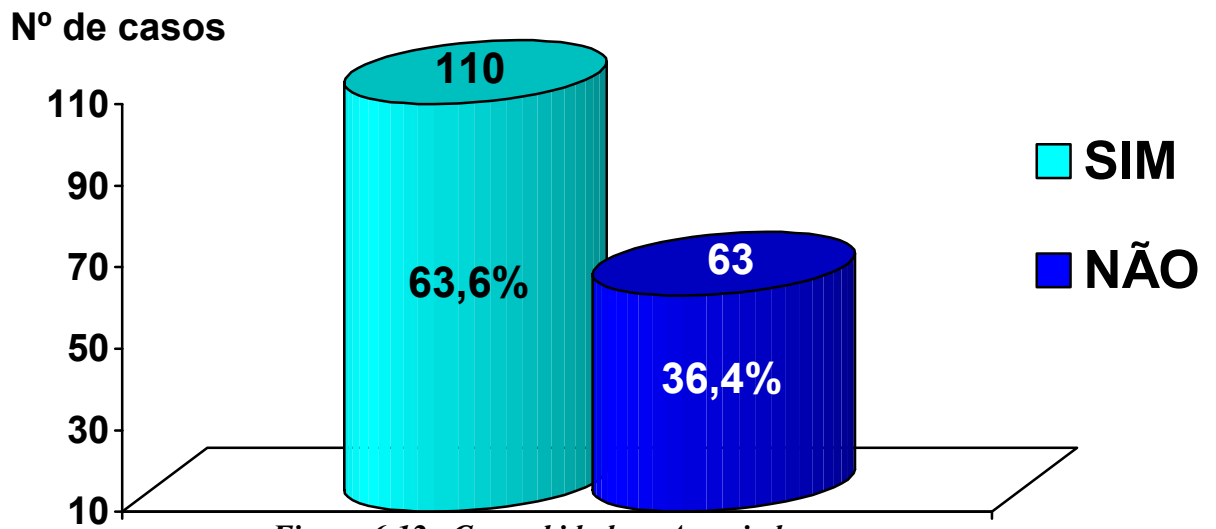


Figura 6.11 Espécimes avaliados

#### 6.16.7 Comorbidades Associadas :

Do total da série analisada, 55 pacientes eram HIV reagentes, o que representou (31,2%); em 1 deles foi feito o diagnóstico concomitante de Tálcoose Pulmonar; 11 tinham *Diabetes Melittus* (DM) ( 6,4%); em 5 casos havia neoplasia ( 2,9%); em 10 casos alcoolismo (5,8%); cardiopatia em 4 casos (2,3%); nefropatia em 3 casos (1,7%); alcoolismo e DM em 2 casos (1,2%); DPOC em 8 casos ( 4,6%); Artrite Reumatóide em 1 caso ( 0,6%); Hipertensão Arterial Sistêmica em 2 casos (1,2%); Doença de Addison em 1 caso (0,6%); tabagismo em 2 casos ( 1,2%); Esquizofrenia em 1 caso (0,6%); Lupus Eritematoso Sistêmico em 1 caso (0,6 %); Leucemia Mielocítica Crônica em 1 caso (0,6 %); Demência em 1 caso (0,6%); Asma em 2 casos (1,2%).

De toda a série estudada, 63 pacientes doentes de tuberculose não apresentavam comorbidades associadas ( 36,4%) e 110 pacientes apresentavam doenças associadas (63,6%).

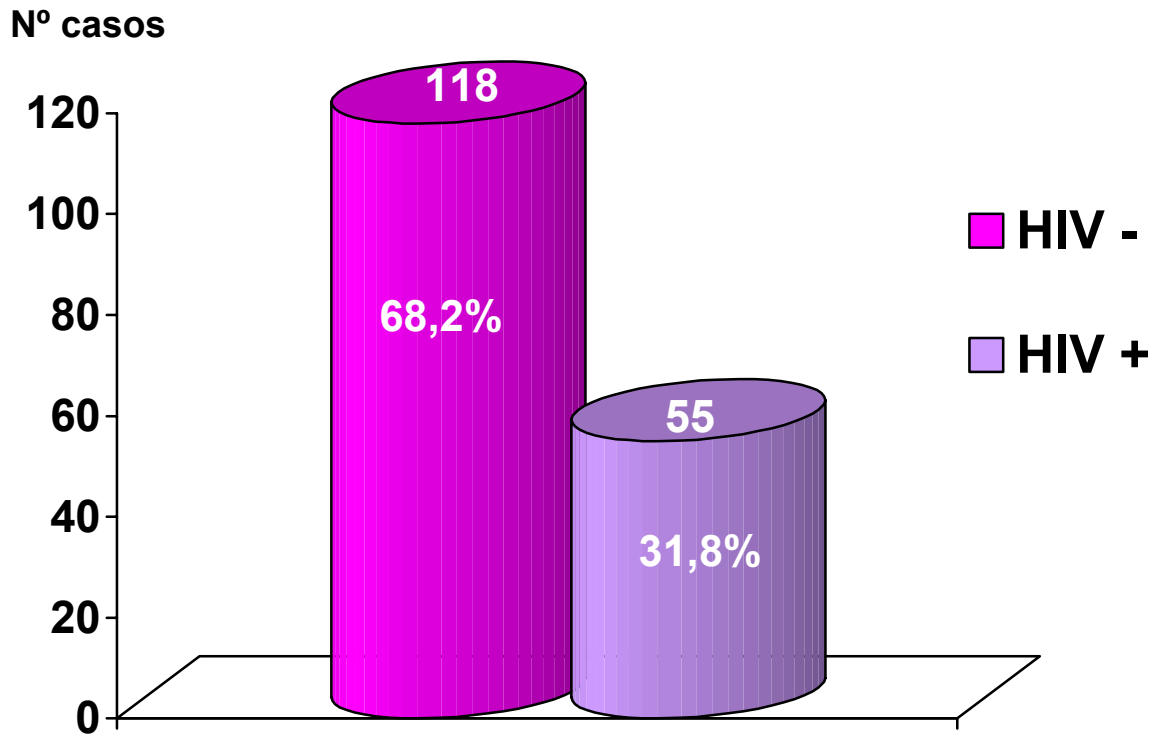


*Figura 6.12 Comorbidades Associadas*

6.12.8 HIV positivos

Na casuística total, 118 pacientes eram HIV negativos, o que representou 68,2% e 55 pacientes eram HIV positivos (31,8%).

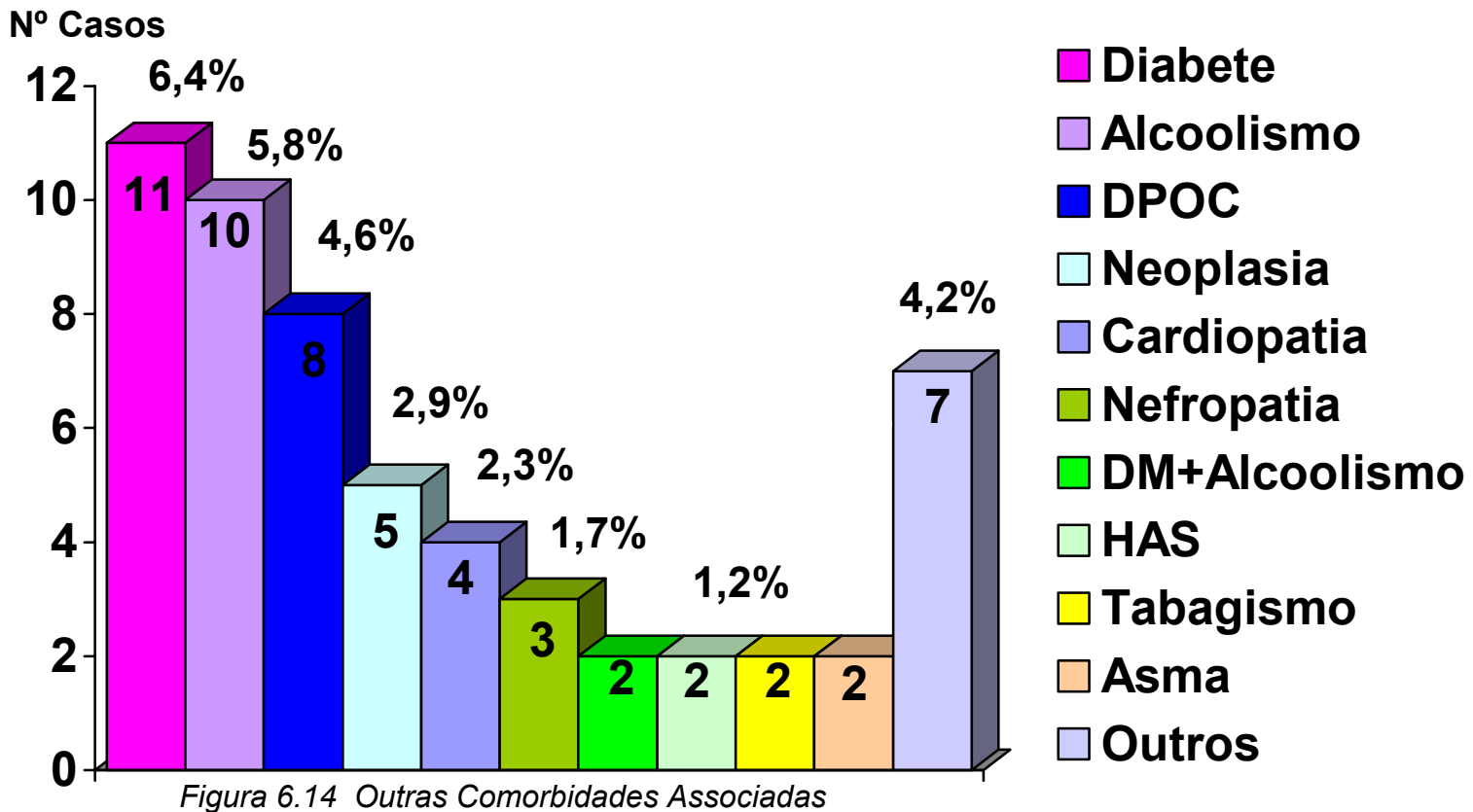




*Figura 6.13 Pacientes HIV Soropositivos e Soronegativos*

#### 6.16.9 Outras Comorbidades:

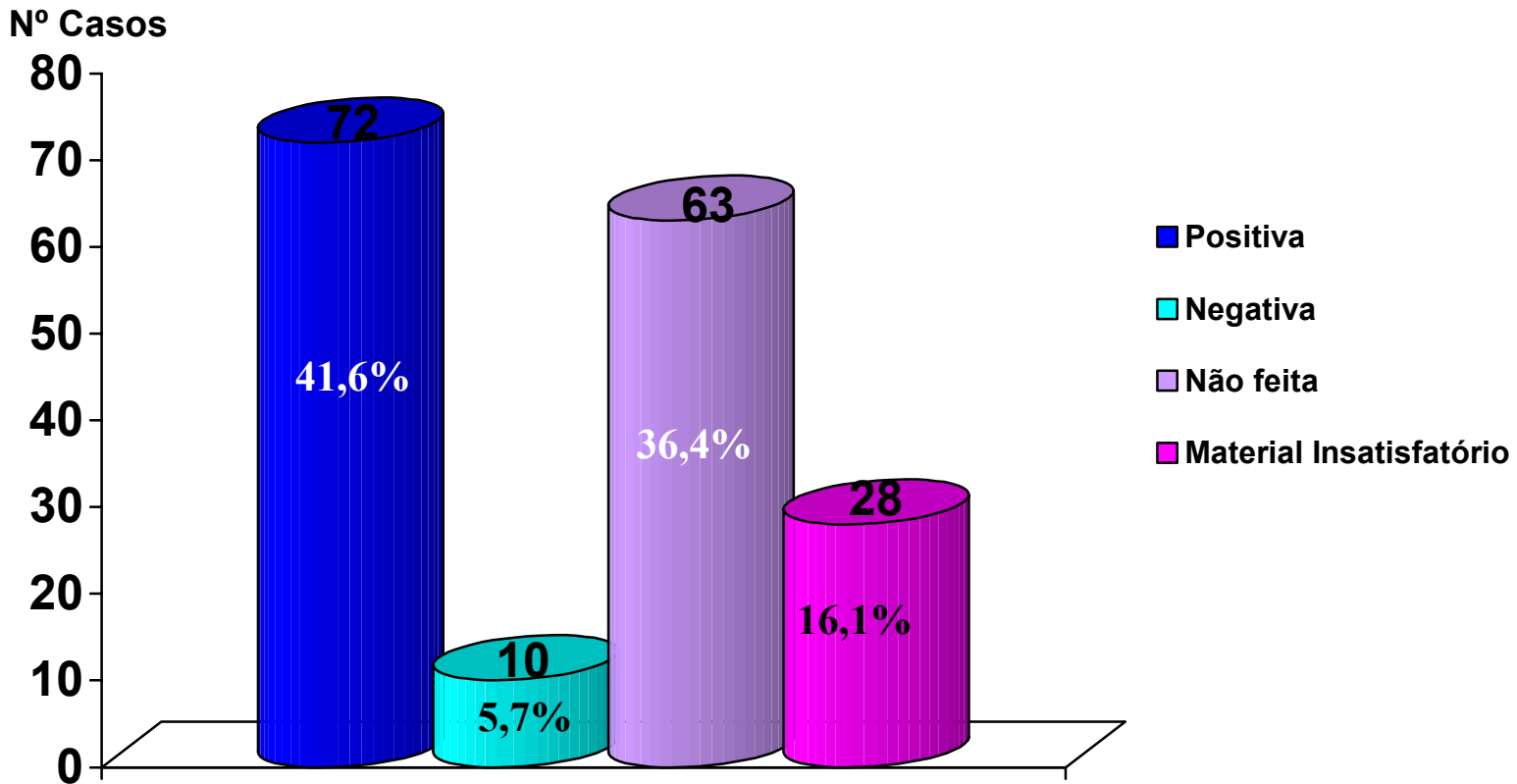
Da casuística estudada, 11 pacientes apresentavam DM o que representou 6,4%; 10 pacientes apresentavam alcoolismo (5,8%); 8 eram portadores de DPOC (4,6%); 5 apresentavam neoplasia concomitante (2,9%); 4 casos de cardiopatia (2,3%); 3 casos de nefropatia (1,7%); 2 casos de DM mais alcoolismo (1,2%); Hipertensão Arterial Sistêmica em 2 casos (1,2%); tabagismo em 2 casos (1,2%); Asma em 2 casos (1,2%). As demais comorbidades foram Artrite Reumatóide, Doença de Addison, Esquizofrenia, Lupus Eritematoso Sistêmico. Leucemia Mielocítica Crônica, Demência, encontradas isoladamente em 1 caso (0,6%).



#### 6.16.10 Resultados dos Exames Culturais-LJ:

O exame cultural pelo método LJ foi realizado em 145 pacientes. Em 72 casos a cultura foi positiva para *Mycobacterium sp.* ( 41,6%). Em 10 casos a cultura mostrou-se negativa ( 5,8%). Devido a dificuldades técnicas o exame cultural não foi realizado em 63

casos ( 36,4%). Em 28 casos os exames culturais não puderam ser concluídos por problemas técnicos laboratoriais (16,2%).



*Figura 6.15 Resultados dos Exames Culturais na Casuística*

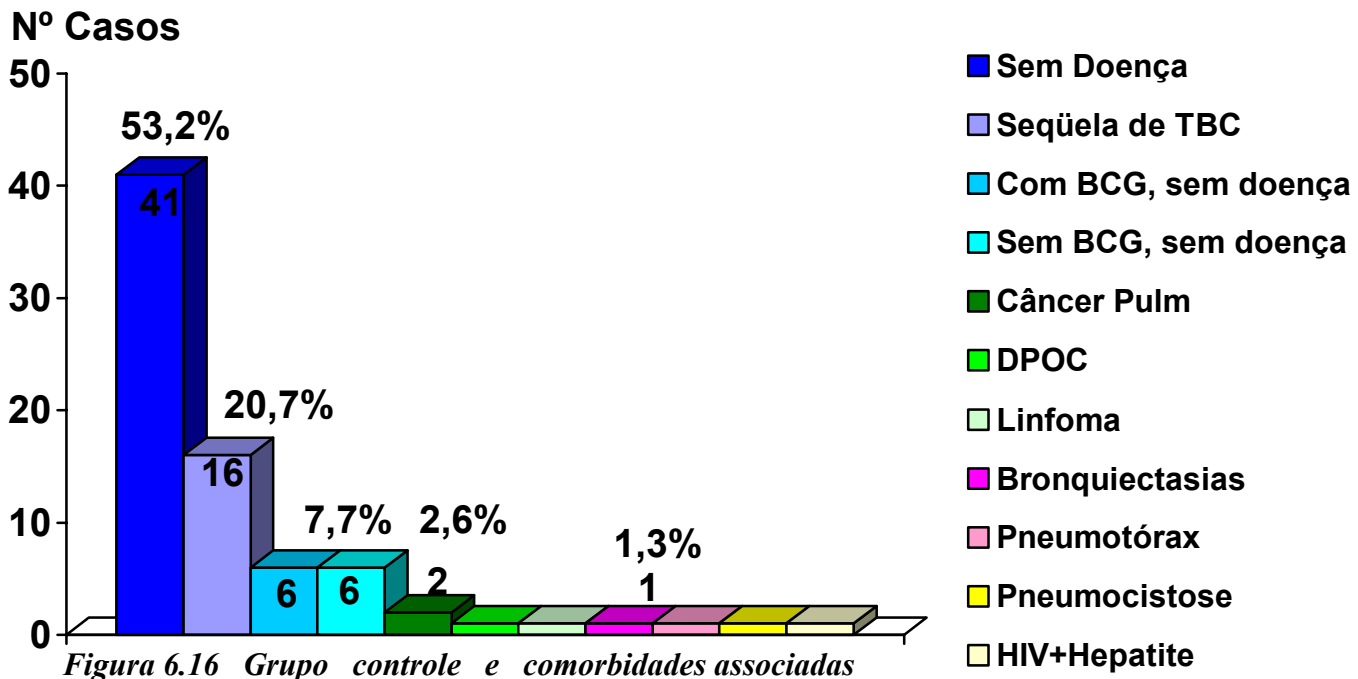
### 6.17 Grupo Controle

O grupo que constituiu a série controle compreendeu 77 indivíduos. Quarenta e um eram indivíduos sadios (53,2% do total dos controles), 16 pacientes eram portadores de lesões residuais de tuberculose (20,8%), 6 indivíduos sadios com BCG prévia (7,8%) e 6 indivíduos sadios sem BCG prévia, 7,8%.

No grupo controle havia 2 casos de pacientes portadores de neoplasia de pulmão (2,6%), DPOC em 1 caso (1,3%), Hepatite associada a HIV positivo em 1 caso (1,3%), Linfoma em 1 caso (1,3%), bronquiectasias em 1 caso (1,3%), Pneumotórax em 1 caso (1,3%) e um caso de Pneumocistose (1,3%), diagnosticada em paciente portador neoplasia hematopoiética, HIV negativo.

Na série controle do estudo havia um único paciente portador do vírus HIV e que não apresentava tuberculose. Setenta e seis pacientes da série controle eram HIV negativos, o que representou 98,7% da série.

A figura abaixo ilustra a distribuição da série considerada controles

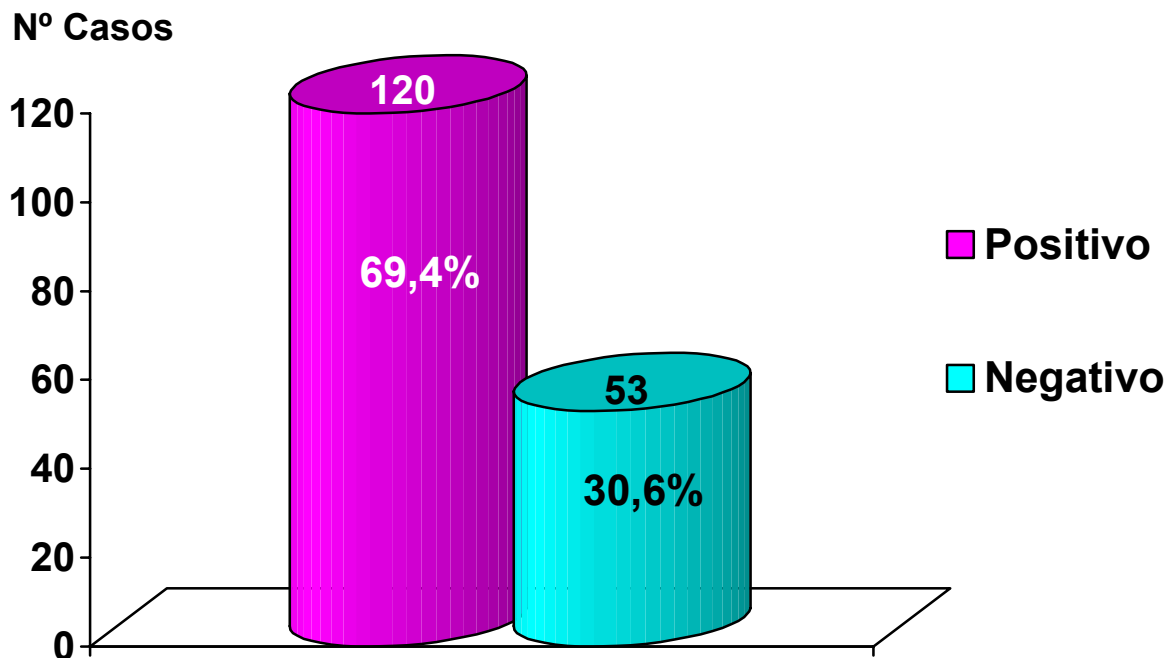


## 7. Resultados

### 7.1 TESTE DO MYCODOT na Casuística Total

O teste MycoDot foi positivo em 120 pacientes estudados, o que representou 69,4% da casuística, sendo esta, então, a sensibilidade do teste.

O teste MycoDot foi negativo em 53 casos, o que representou 30,6% da casuística total submetida ao mesmo.



*Figura 7.1 Resultados do Teste MycoDot na Casuística*

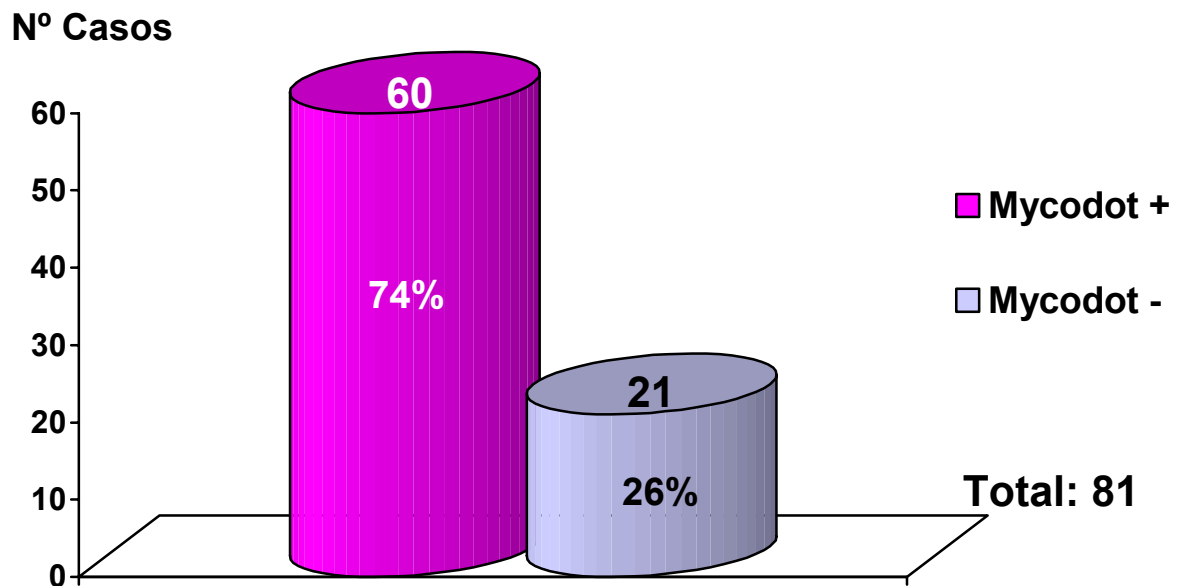
**SENSIBILIDADE DO MYCODOT NA CASUÍSTICA : 69,4%**

## 7.2 Resultados do MycoDot em Relação às Formas da Doença

### 7.2.1 Forma Pulmonar Bacilífera

Nos pacientes testados que apresentavam formas pulmonares bacilíferas (81), o teste do MycoDot foi positivo em 60 casos, o que representou 74%. O teste do MycoDot foi negativo em 21 casos (26%).

SENSIBILIDADE DO TESTE MYCODOT NAS FORMAS PULMONARES BACILÍFERAS: 74,1%

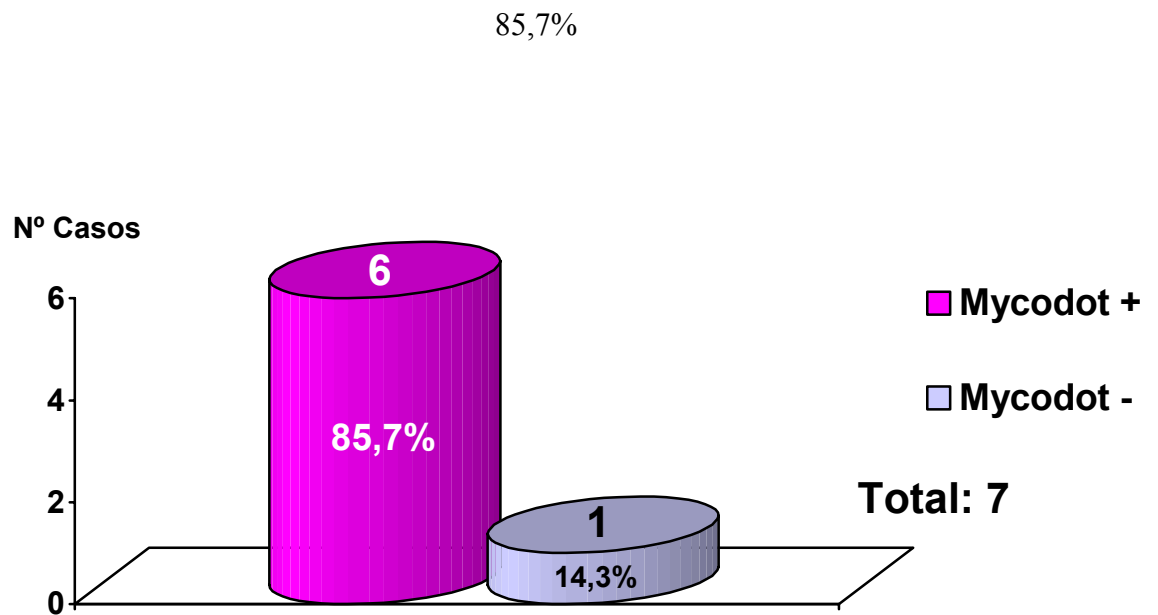


*Figura 7.2 Forma Pulmonar Bacilífera e Resultados do Mycodot*

## 7.2.2 Forma Pulmonar Não Bacilífera

Nos pacientes nos quais o resultado do exame de escarro direto para BAAR foi negativo (7), o teste do MycoDot foi positivo em 6 casos ( 85,7%) e negativo em 1 caso (14,3%).

SENSIBILIDADE DO TESTE MYCODOT NAS FORMAS PULMONARES NÃO BACILÍFERAS:

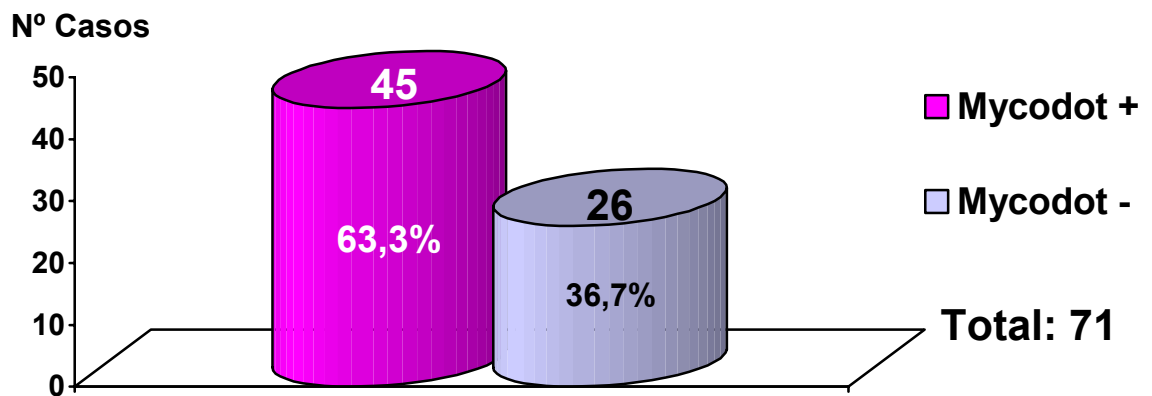


*Figura 7.3 Forma Pulmonar Não Bacilífera e Resultados do Mycodot*

Considerando as formas pulmonares, o teste do MycoDot foi positivo em 67 casos, o que representa mais do que 50% do total das formas pulmonares; em 22 casos o mesmo foi negativo, 21 entre as formas bacilíferas e em apenas 1 caso o mesmo mostrou-se negativo nas formas pulmonares não bacilíferas.

### 7.2.3 Formas Extrapulmonares

Nas formas extrapulmonares de tuberculose os resultados do teste MycoDot mostraram-se ser positivos em 45 casos o que representou 63,3% e o resultado foi negativo em 26 casos, representando 36,7% do total de casos extrapulmonares.



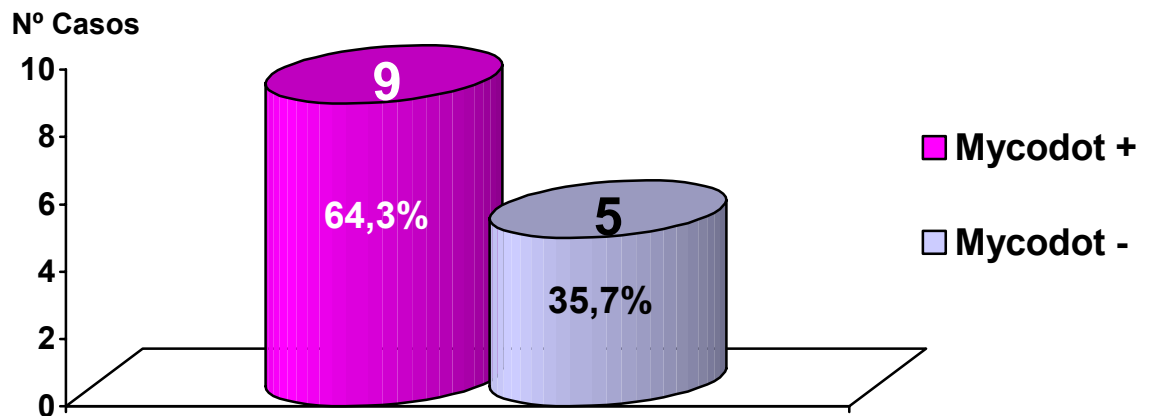
*Figura 7.4 Formas Extrapulmonares e Resultados do MycoDot*

### 7.2.4 Formas Pulmonares mais Extrapulmonares

Considerando-se formas pulmonares mais formas extrapulmonares da doença que ocorreram em 14 casos, o que representou 8,1% da série total dos casos, o resultado do teste MycoDot foi positivo em mais do que 50% dos casos, ocorrendo em 9 casos (64,3%) e mostrou seu resultado negativo em 5 casos, 35,7% do total das formas combinadas da doença.



SENSIBILIDADE DO TESTE MYCODOT NAS FORMAS PULMONARES MAIS EXTRAPULMONARES: 64,3%



*Figura 7.5 Formas Pulmonares mais Extrapulmonares e Resultados do Mycodot*

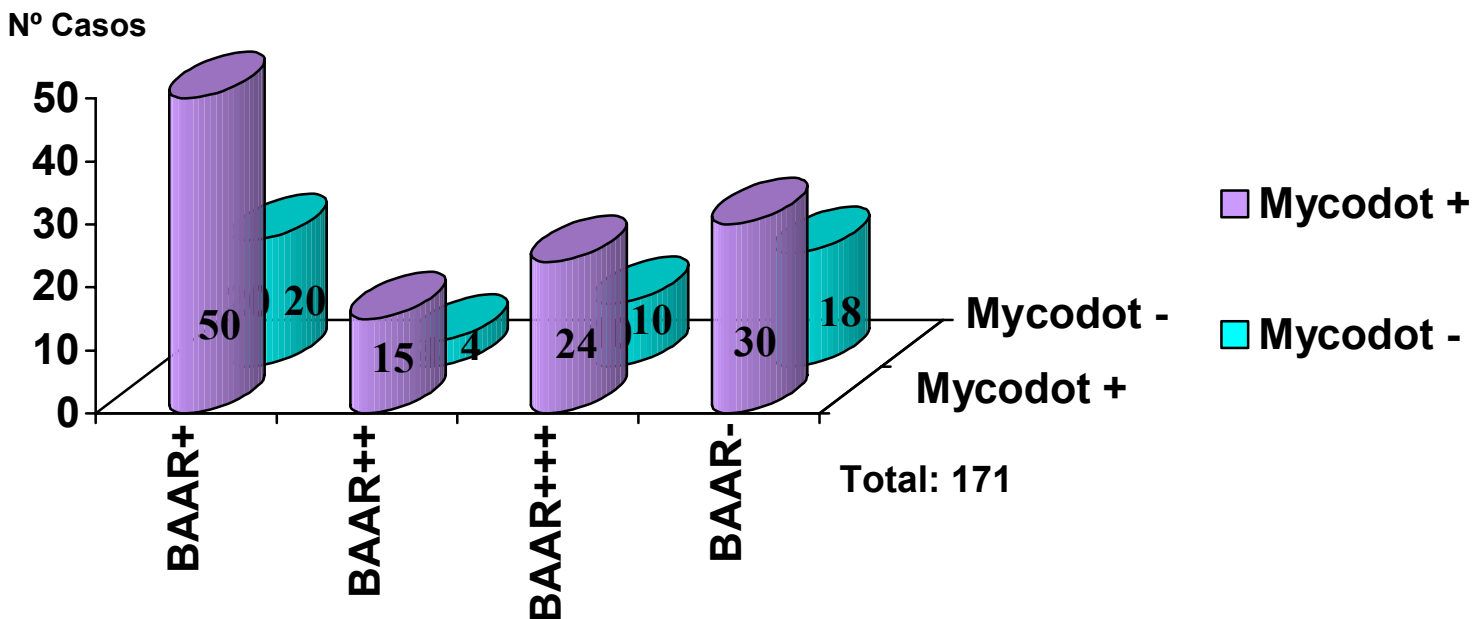
### 7.3 Resultados da Baciloscopia e Teste do MycoDot

Onde a pesquisa de BAAR direta foi positiva +, obtida de diversos espécimes que representou 70 casos, em 50 casos o teste do MycoDot mostrou-se positivo (71,4%). Nos 20 casos adicionais com BAAR+ o teste do MycoDot foi negativo (28,6%)...Em 19 casos onde a pesquisa direta de BAAR foi igual a ++, obtida de diversos espécimes, o teste do MycoDot foi positivo em 15 casos (78,9%) e seu resultado foi negativo em 4 casos (21,1%). Em relação ao resultado da baciloscopia igual a +++, obtida, também, de diversos

espécimes, cujo número total foi de 34 casos, o teste do MycoDot foi positivo em 24 casos (70,6%) e em 10 casos o mesmo foi negativo (29,4%).

Em 48 espécimes a amostra direta do BAAR foi negativa, mostrando o teste do MycoDot uma positividade em 30 casos (62,5%) e uma negatividade em 18 casos, o que representou 37,5%.

Constata-se, assim, uma maior positividade do teste em casos onde a pesquisa do microorganismo direta foi positiva; em 123 casos com baciloscopia positiva, o teste do MycoDot foi positivo em 89 casos (72,3%). Nos 48 casos de espécimes onde a pesquisa de BAAR direta foi negativa, o teste do MycoDot foi positivo em 30 casos, o que representou 62,5%.



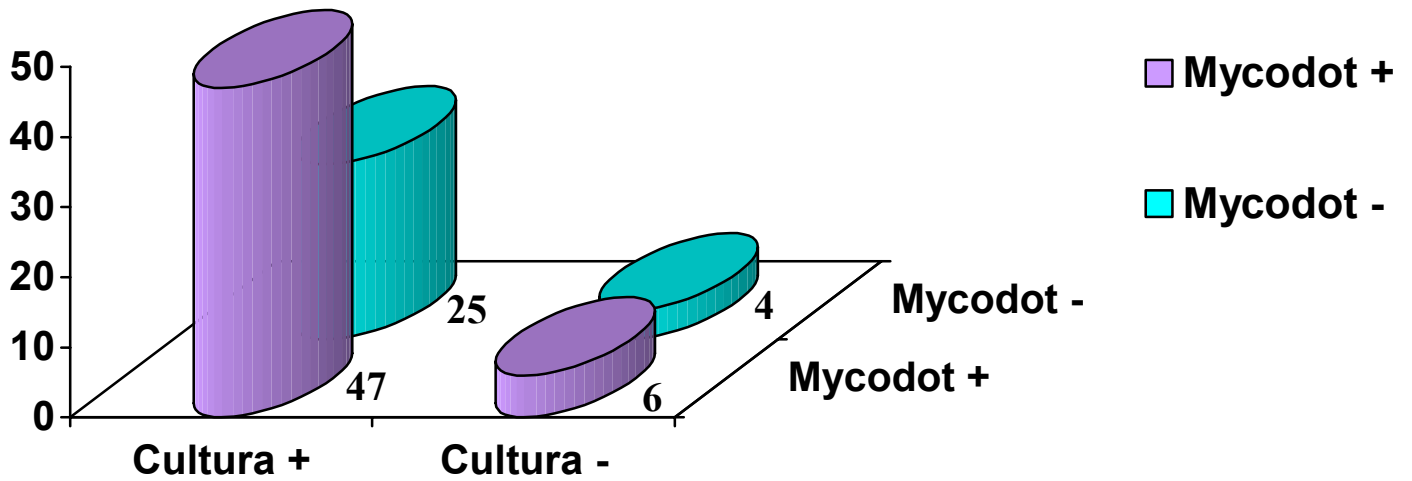
*Figura 19 Resultados das baciloscopias e Teste do Mycodot*

**7.4 Resultados do teste MycoDot nos materiais examinados**

O teste do MycoDot sérico foi positivo em vários materiais examinados com os seguintes resultados: 68 amostras de escarro, 11 biópsias de linfonodos, 5 derrames pleurais, 5 biópsias de pleura, 3 biópsias hepáticas, 2 LCR, 2 biópsias pulmonares, 2 biópsias ósseas, 2 exames de urina, 2 lavados gástricos, 2 escarros mais LCR, 1 LBA, 1 cultura de fezes, 1 cultura de medula óssea, 1 líquido pericárdico, 1 escarro mais líquido pleural, 1 líquido peritoneal, 1 biópsia de peritônio, 1 exame de escarro mais biópsia de linfonodo, 1 exame de escarro mais cultura de fezes, 1 biópsia renal, 1 biópsia de endométrio, 1 líquido pericárdico mais pleural, 1 biópsia de peritônio mais líquido pericárdico, 1 biópsia de peritônio mais baço e 1 biópsia de ceco.

**7.5 Resultados do MycoDot em Relação aos Exames Culturais Realizados**

Em 72 exames culturais positivos realizados o teste do MycoDot foi positivo em 47 casos (65,3%) e negativo em 25 casos (34,7%). Em 10 exames culturais negativos, o teste do MycoDot foi positivo em 6 casos (60%) e negativo em 4 casos (40%). Em 63 exames culturais não realizados, o teste do MycoDot foi positivo em 46 casos e negativo em 17 casos.



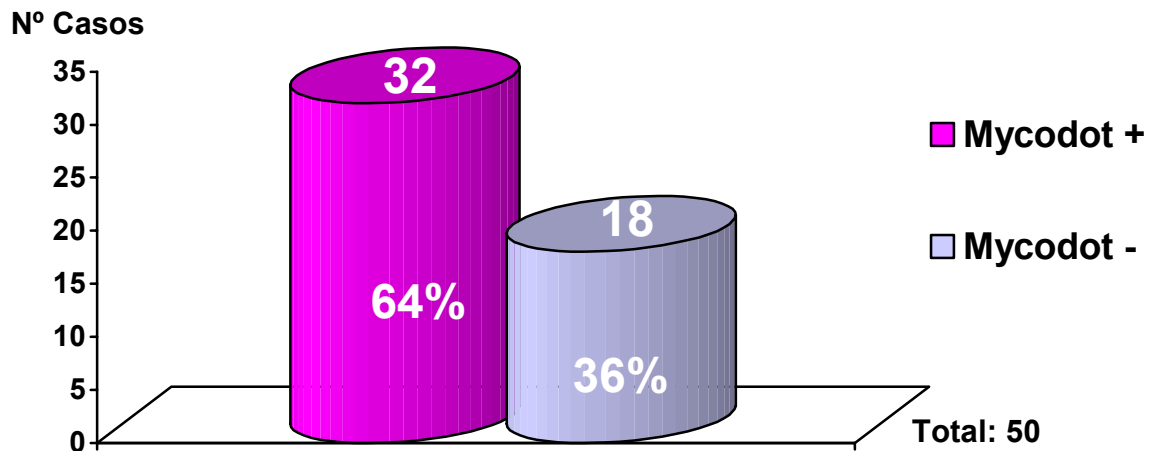
*Figura 14: Resultados do MycoDot e Testes Culturais*

### 7.6 Resultados do Teste MycoDot e Anatomopatológicos de Biópsias

Na série estudada foram realizadas 50 biópsias de órgãos diversos. Em 123 casos a mesma não foi realizada. O resultado do teste MycoDot mostrou-se positivo em 32 casos de amostras variadas submetidas a exame anátomo-patológico, o que representou 64%. O resultado do teste foi negativo em 18 casos de exames anatomopatológicos (36%).

Dos casos onde o Mycodot foi positivo, as biópsias foram obtidas de diversos órgãos. As biópsias foram 11 de linfonodos, 7 de pleura, 2 de fígado, 2 biópsias ósseas, 2 biópsias pulmonares, 1 de medula óssea, 1 de pericárdio, 1 de pericárdio mais pleura, 1 de peritônio mais baço, 1 peritônio isolado, 1 biópsia de ceco, 1 biópsia renal e 1 biópsia de endométrio.

O teste do Mycodot foi negativo em 5 biópsias de linfonodos, 3 biópsias de pleura, 2 biópsias transbrônquicas (BTB), 2 medulas ósseas, 2 biópsias hepáticas, 2 de peritônio, 1 óssea e 1 intestinal.

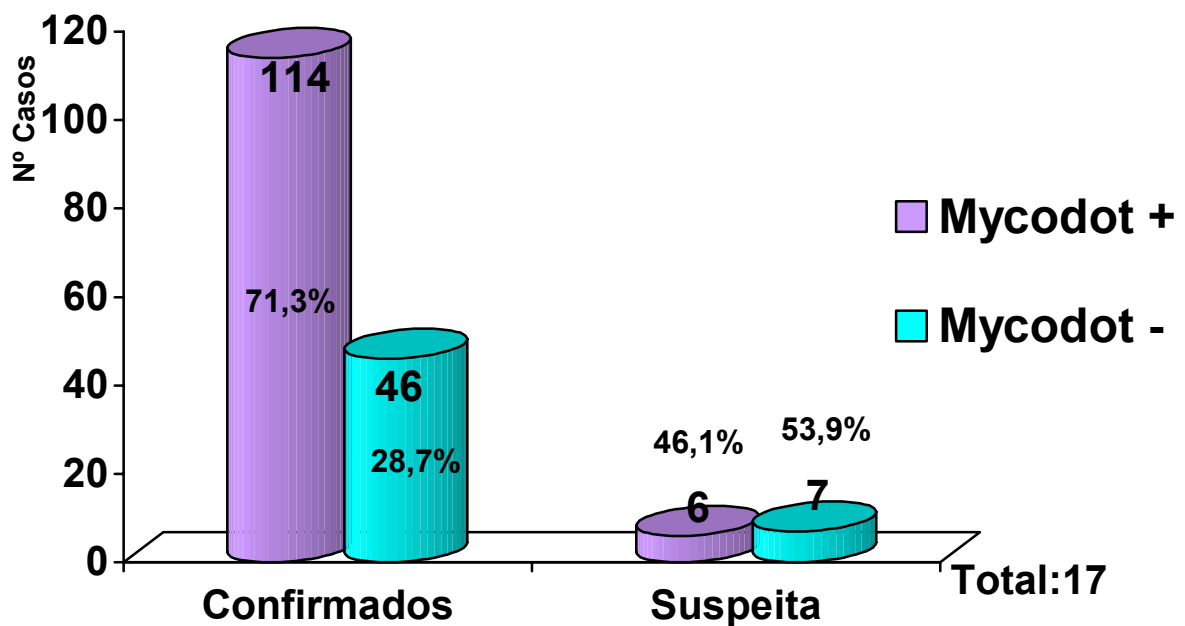


*Figura 20: Resultados dos Exames Anatomopatológicos e do Teste MycoDot*

### **7.7 Resultados do Teste Mycodot nos Casos Confirmados e Suspeitos de Tuberculose**

Nos casos onde a tuberculose foi confirmada, 160 casos, independente do método diagnóstico utilizado, o teste do MycoDot foi positivo em 114 casos (71,25%) e negativo em 46 casos (28,75%).

Em 13 casos a doença não foi confirmada por nenhum método diagnóstico, mas apresentou as características clínicas, radiológicas e de evolução e acompanhamento rigorosamente avaliadas, podendo incluí-los na série estudada e considerados na casuística. Os resultados do teste MycoDot encontrados foram: positivos em 6 casos (46,1%), e negativos em apenas 7 casos (53,9%) da série total dos testes realizados.

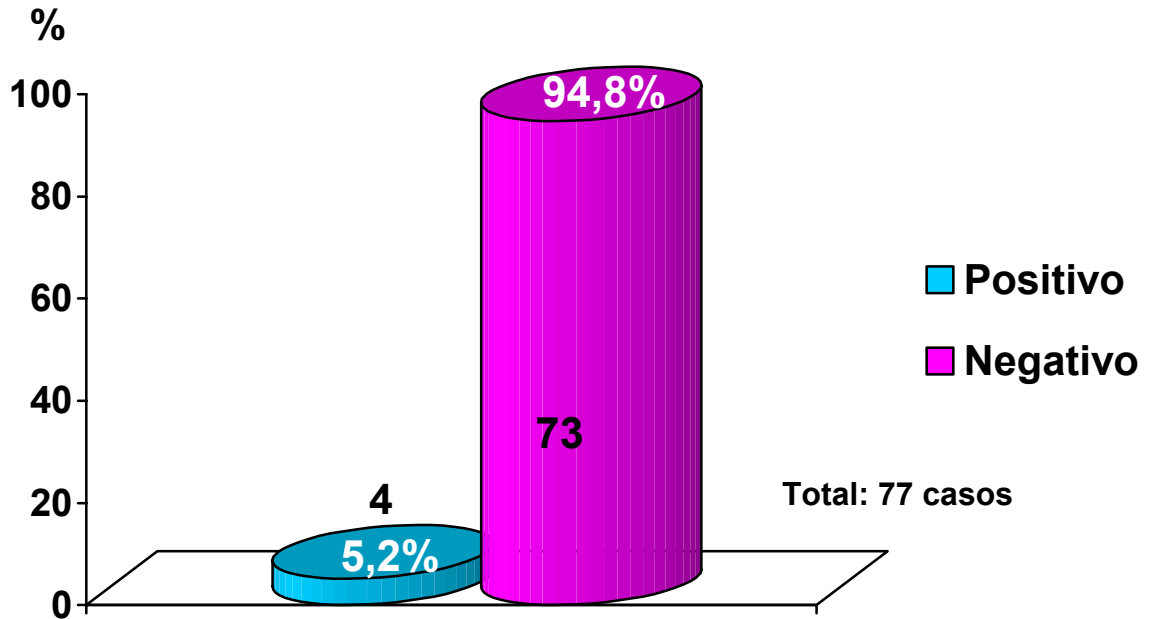


*Figura 21 Casos confirmados e suspeitos: Resultados do Mycodot*

### 7.8 Resultados do Teste MycoDot nos Controles

No grupo de controles o teste MycoDot foi aplicado em todos os casos. Os resultados mostraram que o teste do MycoDot foi negativo em 73 casos, o que representou

94,8% do grupo controle e em 4 casos o teste do MycoDot se mostrou positivo, representando 5,2%.



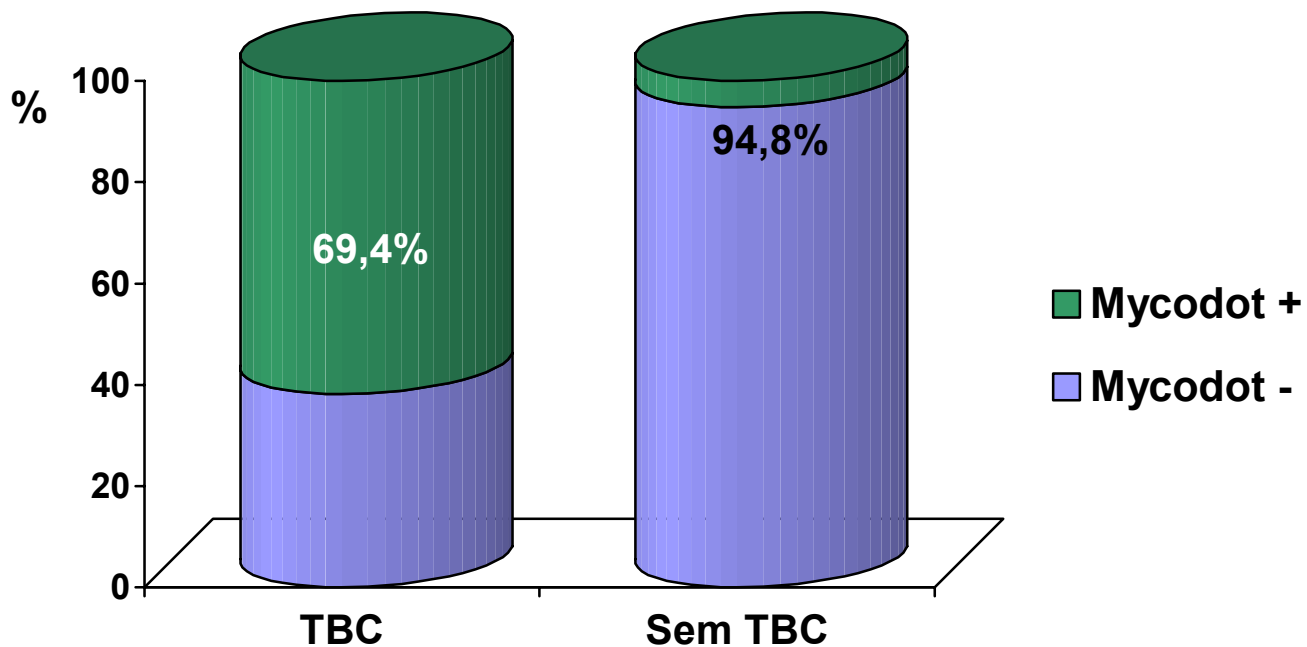
*Figura 27: Resultados do teste MycoDot nos Controles*

## 7.9 Resultados Finais

### 7.9.1 Sensibilidade e Especificidade do Teste MycoDot na Casuística

Os nossos resultados finais mostraram que a **SENSIBILIDADE do Teste MycoDot** foi de **69,4%**.

A **ESPECIFICIDADE do Teste MycoDot** na série estudada foi de **94,8%**.



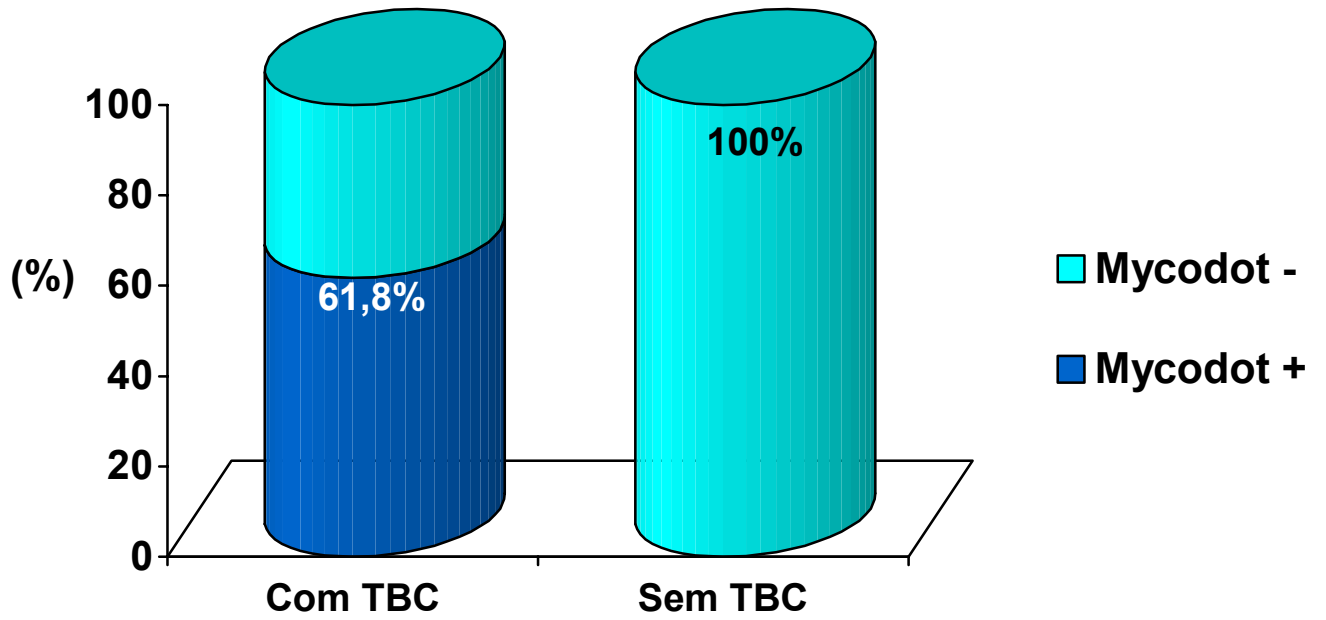
*Figura 28 Teste do Mycodot: Sensibilidade e Especificidade*

#### 7.9.2 Resultados do Teste Mycodot nos Pacientes HIV positivos e HIV negativos

Considerando-se apenas os pacientes HIV positivos da série, com e sem tuberculose, observamos que a sensibilidade do teste MycoDot foi de 61,8% e a especificidade do teste MycoDot foi de 100%.

A figura abaixo ilustra estes resultados.





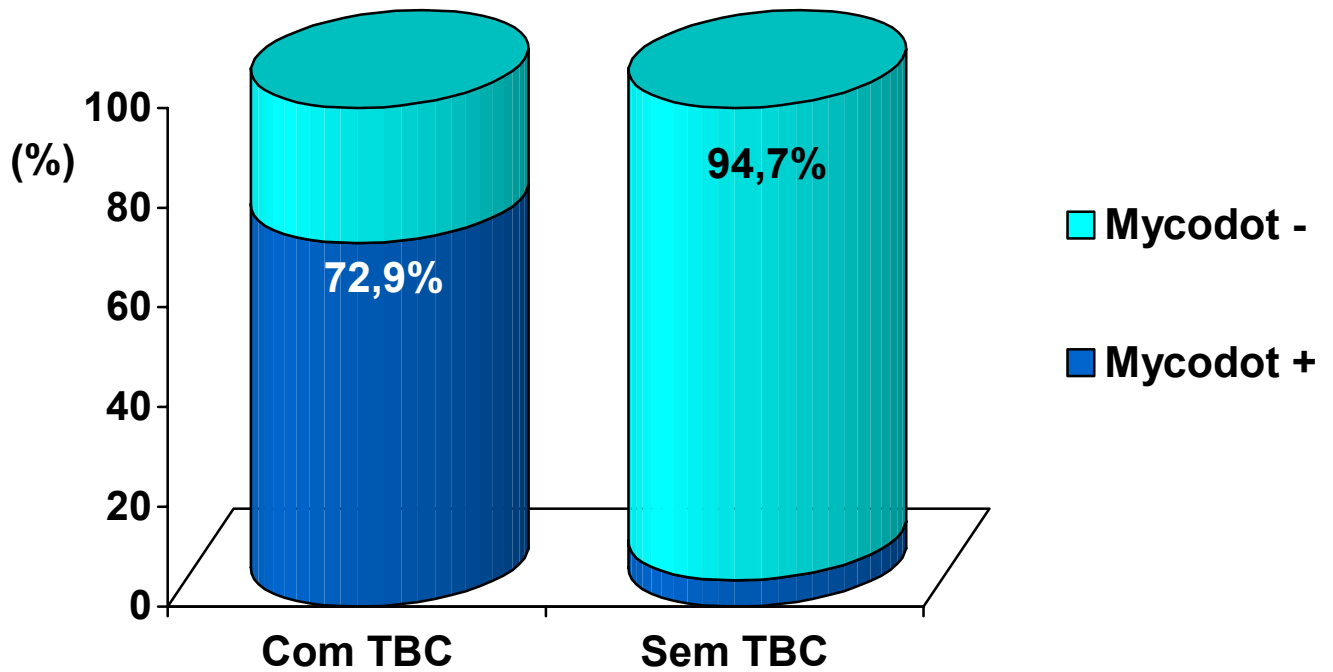
*Figura 29 Sensibilidade e Especificidade nos Pacientes HIV Positivos*

## Resultados

## Antígeno LAM

Nos pacientes HIV negativos, a sensibilidade do teste MycoDot foi de 72,9% e a especificidade do teste MycoDot foi de 94,7% .

A figura abaixo demonstra estes resultados.



*Figura 30 Sensibilidade e Especificidade nos Pacientes HIV Negativos*

**7.9.3 ANTÍGENO LIPOARABINOMANNAN : RESULTADOS FINAIS**

Os resultados finais do trabalho demonstraram uma **SENSIBILIDADE DE 69,4%; ESPECIFICIDADE DE 94,8%; VALOR PREDITIVO POSITIVO DE 96,8%** e **VALOR PREDITIVO NEGATIVO de 57,9%**.

**TESTE DO MYCODOT NA CASUÍSTICA: 173 CASOS DE TUBERCULOSE**

**SENSIBILIDADE: 69,4%**

**ESPECIFICIDADE : 94,8%**

**VPP: 96,8%**

**VPN: 57,9%**

*Tabela 4: Teste do Mycodot: Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo*

			Pacientes	Controles
<b>Mycodot</b>	<b>Positivo</b>	<b>N°</b>	<b>120</b>	<b>4</b>
			<b>96,8%</b>	<b>3,2%</b>
			<b>69,4%</b>	<b>5,2%</b>
	<b>Negativo</b>	<b>N°</b>	<b>53</b>	<b>73</b>
			<b>42,1%</b>	<b>57,9%</b>
			<b>30,6%</b>	<b>94,8%</b>



***SENSIBILIDADE***



***VALOR PREDITIVO POSITIVO***



***ESPECIFICIDADE***



***VALOR PREDITIVO NEGATIVO***

## **8. Discussão**

### **8.1 Introdução**

A compreensão do papel da imunidade celular na tuberculose tem sido bem estudada e avaliada há muitos anos. Entretanto o valor e a responsabilidade da imunidade humoral na tuberculose permaneceram esquecidos e sem maior importância há muito tempo. Desta doença fantástica, ameaçadora, muitas vezes mortal, o verdadeiro valor da imunidade humoral permanece intrigante, um labirinto a ser descoberto, um desafio a ser explorado e estudado pela mente humana, uma floresta cheia de encantos e surpresas que o ser humano ainda não conhece.

Os métodos sorológicos para o diagnóstico da tuberculose tem sido perseguidos através do século XX. Particular interesse tem sido focalizado sobre as formas extrapulmonares da doença que, muitas vezes, representam um verdadeiro dilema para a medicina. Incui-se também as formas paucibacilíferas da doença e a importante explosão representada pelo vírus HIV, que revolucionou a doença, dando-lhe características ainda não conhecidas e desvendadas pela mente humana, como a existência de formas múltiplas, com acometimento de vários órgãos concomitantemente. Trouxe entre nós a micobacteremia, até então apanágio das bactérias e de outros parasitas. Interesse em desenvolver um método que nos desse, indiretamente, através do achado de um marcador sérico, um anticorpo, realmente seria de extrema utilidade para a detecção da doença, principalmente, em algumas formas onde é muito difícil de conseguir amostras para o

diagnóstico laboratorial, lembrando ainda das dificuldades que os mesmos oferecem, em relação ao tempo de conclusão dos resultados.

Porém, diferentemente de outras infecções para as quais o diagnóstico por métodos sorológicos se encontra bem determinado, representando uma arma de valor inquestionável, a tuberculose tem perseguido largamente esforços para desenvolver uma tecnologia que seja sensível, específica e de uso prático clínico.

O maior problema com a especificidade encontra-se em distinguir entre o estado de infecção e o estado de doença da tuberculose; outra questão que se constitui, também, problemática, é a reação sorológica pelo BCG ID. Isto é de particular importância e relevância nos países em desenvolvimento, onde um simples teste sorológico seria de grande utilidade para o diagnóstico da doença; em tais regiões, aproximadamente 40% da população tem infecção latente tuberculosa e um número substancial de indivíduos são vacinados pelo BCG ID. Outro problema que se apresenta é a diferenciação entre patógenos atípicos, as mycobacterioses atípicas, MOTT. Esta situação se encontra mais em populações desenvolvidas, onde a prevalência das atípicas é de maior significância. Outro questionamento no emprego da sorologia na doença é a seleção satisfatória de antígenos a serem utilizados para o teste sorológico, que deveria ser o mais purificado possível, de alta especificidade para a doença, não apresentando falsas reações com outras morbidades. A escolha do antígeno a ser estudado é o que representa, sem dúvida, o principal questionamento quando se avalia a imunidade humoral da tuberculose.

A análise de muitos e variados estudos do sorodiagnóstico da tuberculose realizados na Índia foram realizados, empregando uma diversidade de antígenos potencialmente envolvidos nas respostas imunológicas, conseqüentemente, com uma vasta e extensa diversidade das respostas antigênicas associadas a diferentes formas da doença, como

formas pulmonares cavitárias e não cavitárias e formas extrapulmonares ( ISEMAN M;2000).

Atualmente há mais de 84 espécies de antígenos envolvidos e estudados na antigenicidade da resposta humoral, cujos resultados estatísticos se diferenciam.

A tuberculose é considerada um flagelo para a humanidade. No passado, dizimava milhares de pessoas pela inexistência de um tratamento eficaz. No presente, pelas más condições de saúde, pelos programas públicos de controle da mesma, desorganizados e mesmo alguns em extinção

Representa a doença infecciosa que mais mortes acarreta no mundo. Ocorrem dez milhões de casos novos ao três milhões de mortes ,anualmente, no mundo inteiro.

Além destes fatores, a coinfeção pelo vírus HIV veio trazer uma conotação mais drástica ao cenário desta doença.

Conhece-se a sua etiologia, sua fisiopatologia, suas manifestações clínicas e aspectos radiológicos, sabe-se diagnosticá-la e tratá-la com alto índice de cura, mas ainda permanece sendo uma verdadeira chacina para a humanidade.

Os seus métodos diagnósticos são conhecidos, mas a sua imunidade humoral, o real e verdadeiro papel da mesma permanece ainda desconhecido, representando um desafio ao ser humano!

No grupo de pacientes HIV positivos, há progressiva queda na imunidade, principalmente dos linfócitos CD4 , que pode declinar significativamente antes do valor que se associe com a maioria das infecções oportunistas. Esta disfunção é caracterizada por queda da habilidade do reconhecimento de vários antígenos e pode ser detectada *in vitro* pela perda das respostas imunológicas aos antígenos, caracterizando anergia. Em

adição e talvez ligada a esta anergia, é o desvio funcional em favor de respostas TH2 que diminuem a produção do IFN- $\gamma$  e de interleucina -2.

Por exemplo, ambos o 65-kDa e o 70- kDa, genes familiares, são importantes nas assembléias de proteínas e complexos protéicos com células, talvez envolvendo interações reversíveis designadas a estabilizar mais novos polipeptídeos sintetizados. O termo chaperona tem sido usado para descrever esta classe de proteínas ( ELLIS J ;1987). A indução dessas proteínas durante o estresse pode refletir uma necessidade aumentada para a estabilização de proteínas intracelulares e complexos durante adaptação a um ambiente hostil ou alterado.

A inesperada relação entre maiores antígenos de proteínas de estresse , abre uma importante área de pesquisa no campo da patogênese microbiana e regulação dos sistema imune. A fim de acessar a significância dessas interações entre a resposta do estresse e a resposta imune, detalhada análise da indução e reconhecimento das proteínas envolvidas neste mecanismo, durante a infecção, serão necessárias .serem melhor analisadas. Propõe-se que uma análise sistemática dos gens que são autorregulados seguindo à fagocitose de micobactérias patogênicas pode levar à identificação de antígenos que serão importantes na patogênese da doença e que ainda não são valorizáveis nos testes diagnósticos.

A resposta imune à infecção micobacteriana é predominantemente celular (DANIEL T; 1980). A hiperssensibilidade tardia (DTH) representada pela reação ao derivado protéico purificado extraído do *Mycobacterium bovis* tem sido um método conveniente, de baixo custo e efetivo para acessar às repostas imunes mediadas pelas células a uma variedade de antígenos, começando com o derivado proteico da tuberculina (PPD) desde há 100 anos utilizado como um dos mais antigos testes usados na clínica diagnóstica, desenvolvido no século passado.(SNIDER; 1982) Também conhecido como teste de Mantoux , este método tem sido o padrão-ouro para o *screening* diagnóstico de detecção de novas ou



assintomáticas infecções por tuberculose. O inconveniente é que ele se positiva nas espécies micobacterianas, incluindo as atípicas (MOTT) e pela vacinação com o BCG ID , podendo também mostrar uma resposta falsa-negativa devido a doenças de base imunossupressoras (FRANCIS J; 1978). A resposta imune ao *Mycobacterium tuberculosis* é altamente dependente da produção do IFN- $\gamma$  pelos macrófagos e pelas células específicas T.

A produção do IFN- $\gamma$  em resposta à estimulação antigênica tuberculínica como teste de *screening* diagnóstico da infecção tuberculosa poderá substituir o clássico PPD (LEIN D; 1997).

A micobacteriologia clínica tem se beneficiado muito das técnicas de biologia molecular. A detecção e identificação precoce do *Mycobacterium tuberculosis* pode ser alcançada pela combinação do sistema BACTEC e das provas de DNA. PCR é ainda uma arma com muitos problemas e limitações. Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, no IPB-LACEN tentou-se melhorar a detecção da tuberculose através de novas tecnologias incluindo a PCR. A seqüência IS6110 para o *Mycobacterium tuberculosis* foi selecionada por amplificação por primers específicos e amplificada por produtos transferidas por membranas de nylon para serem detectadas pela prova biotilina relacionada ao DNA, usando conjugado de fosfatase alcalina para estreptavidina. Oitenta amostras clínicas foram avaliadas pelo PCR. A acurácia do método colorimétrico usando culturas de micobactérias como padrão-ouro, mostraram resultados de sensibilidade e especificidade obtidos, respectivamente, de 90% e 97% para o PCR AG e 95% e 97% para o PCR dot-blot. Os resultados preliminares mostraram que o PCR dot-blot é um rápido e acurado método de identificar tuberculose em espécimes clínicos, podendo ser usados na prática diária em regiões desenvolvidas( KRITSKI A, MELLO FCK, ROSSETI LR; 2002). Outras técnicas

promissoras para o rápido diagnóstico são pelo método ELISA, o teste direto do Gen-Probe por amplificação da micobactéria, a hibridização do DNA e sistemas de tubos e amplificação do crescimento das micobactérias. Essa descoberta de gens resistentes às drogas tais como o katG e apoB tem importantes implicações também para o desenvolvimento de novos testes que detectem rapidamente a resistência às drogas antituberculosas (LING ML; 1996).

Um estudo de relação entre a resposta imune celular e as manifestações clínicas em pacientes com tuberculose foi realizado observando a reatividade cutânea ao derivado protéico purificado (PPD) e níveis de anticorpos. Neste estudo foram investigados 122 adultos e 28 crianças com TBC. Níveis de IgG anti-PPD (medidos por ELISA) foram mais altos em pacientes adultos por mais do que um ano após a Tuberculose (N=38) e em pacientes com doença de menos que um ano (N=50), bem como nas crianças com Tuberculose disseminada. Os valores cut-off para crianças saudáveis e adultos foram 0,09 e 0,22 com absorção de 405nm. Em ambos, adultos e pacientes pediátricos, a reatividade cutânea ao PPD foi inversamente correlacionadas com os níveis de anticorpos. Os dados presentes provam que existam evidências adicionais para a existência de um espectro instável de resposta imune em pacientes tuberculosos nos quais as situações clínicas são dinâmicas (FONSECA LS, KRITSKI A; 1992). Outro estudo realizado em um centro do Rio de Janeiro isolou de pacientes atendidos na comunidade espécies de *Mycobacterium tuberculosis* através da técnica molecular *Fingerprinting* (OELEMAN MAC, KRITSKI A; 2002).

Apesar de um século de estudo é ainda surpreendente como os fatores de virulência do *Mycobacterium tuberculosis* são desconhecidos e como este patógeno estabelece uma persistente infecção dos tecidos do hospedeiro. Similarmente, nós sabemos pouco sobre as respostas do antígeno para a indução das respostas protetoras imunes, responsáveis no

hospedeiro infectado pela infecção apenas ou porque alguns indivíduos parecem incapazes em reconhecer esses antígenos e desenvolver doença progressiva. O processo pelo qual o hospedeiro previne o crescimento e a disseminação desse patógeno *in vivo* envolve a secreção de linfocinas estimuladas por antígenos, células T especificamente sensibilizadas em uma série de interações de complexos celulares com as lesões primárias e os linfonodos comprometidos.

Mesmo sob circunstâncias ideais, o melhor que estes macrófagos imunologicamente ativados podem alcançar contra um virulento bacilo tuberculoso é um prolongado período de bacteriostase, usualmente suficiente para proteger o hospedeiro dos efeitos letais do patógeno. Nós ainda sabemos muito pouco sobre os fatores responsáveis para o estabelecimento deste estado de carreador, em nível celular ou molecular.

Imunógenos liberados pelo bacilo da tuberculose são múltiplos nos tecidos e apresentados às apropriadas células T que drenam os linfonodos assim como induzem uma resposta humoral mediada por células, resposta que faz parte das defesas do indivíduo.

Os genes responsáveis pela produção dos antígenos protéicos da tuberculose, da lepra e da resposta ao BCG variam de homologia às assim chamadas proteínas de choque liberadas pelas células quando as mesmas são expostas a uma variedade de insultos ambientais. Essas proteínas de choque têm sido postuladas de apresentarem funções protetoras na célula estressada, embora a razão para sua atividade imunológica com o hospedeiro infectado não ser ainda perfeitamente compreendida. Recentes avanços em técnicas de DNA recombinante tornam possível que o clone de genes de *Mycobacterium tuberculosis* sejam os responsáveis pela produção desses antígenos protetores. Esses genes podem ser transferidos para outros vetores de expressão por meio de um plasmídeo alterado, assim permitindo o desenvolvimento de novas vacinas, mais protetoras, para serem utilizadas em humanos.

O mecanismo de defesa contra a tuberculose se baseia basicamente no macrófago. Porém, o microrganismo usa mecanismos de evasão para escapar, sendo mortos por macrófagos ativados. Os fagócitos mononucleares constituem um componente potente antimicrobiano da imunidade mediada pelas células. Também, a exclusão do próton-ATPase previne a acidificação dos vacúolos fagocíticos, assim prevenindo a destruição do microorganismo.

Embora o mesmo seja muito eficiente em invadir e infectar o macrófago humano, o ser humano possui poderosas defesas. O TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  sinèrgicamente provém um hostil ambiente para a micobactéria. Porém, eles ajudam a seqüestrar o patógeno e prevenir a sua disseminação.

Outros mecanismos de defesa ativados como a produção de RNIs podem suspender o crescimento e a multiplicação das bactérias *TB help kill*. Interleucinas e vitamina D3 também contribuem para as defesas humanas contra a infecção tuberculosa, aumentando a diferenciação celular imune e sua proliferação, agindo como um imune modulador. (BANKI A, RICHARDS G; 1996)

## **8.2 A Escolha do Antígeno Lipoarabinomannan ( LAM )**

Revisando os relatos da literatura e as propriedades bioquímicas e ultra-estruturais deste antígeno, que representa a maior proporção da parede da membrana do *Mycobacterium tuberculosis*, além de ser conhecido como um antígeno altamente purificado, com kit de procedência confiável, decidimos testá-lo no nosso meio.

Em um estudo, o teste do LAM foi realizado em pacientes com tuberculose ativa. Os resultados mostraram sensibilidade de 88 % nos pacientes bacilíferos, 67% nos pacientes com baciloscopia direta negativa, mas com exames culturais positivos; 575 eram

pacientes portadores de coinfeção HIV associada a tuberculose. O grupo controle utilizou pessoas com outras doenças inespecíficas e indivíduos saudáveis. Para comparação o teste do LAM demonstrou uma especificidade de 100% (SADA E; 1990).

Os autores especulam que o LAM é liberado pelos bacilos tuberculosos que são degradados pelos macrófagos, o que explicaria a baixa sensibilidade nos pacientes HIV positivos, por serem paucibacilíferos, e devido às baixas defesas do hospedeiro que apresentariam menor concentração de carboidratos circulantes, liberando assim menores quantidades do antígeno para a circulação, para serem detectados em amostras séricas colhidas.

Conhecido como componente da estrutura e bioquímica da parede bacteriana, é reconhecido como o mais purificado e, portanto, até o momento, ideal para os estudos sorológicos da doença. Comercializado como Antígeno MycoDot é proveniente de Cambridge, MA, Estados Unidos.

Outro estudo realizado, utilizando o MycoDot, como estudo teste diagnóstico, um total de 1602 amostras foram avaliadas em três regiões. Os testes foram realizados em 564 pacientes com tuberculose pulmonar e os resultados mostraram 396 reagindo positivamente ao teste MycoDot, chegando-se a uma sensibilidade de 70.2%. Dos 564 portadores de formas pulmonares, 328 foram testados para o HIV. Dos 28 HIV positivos, 21 reagiram ao teste, mostrando uma sensibilidade de 75%. Dos 1038 com tuberculose e que eram HIV negativos, 51 reagiram positivamente ao teste, com uma especificidade de 90.5%. Entre os falsos-positivos retores, a tuberculose ativa não foi afastada, ou outras doenças ativas micobacterianas. O grupo controle compreendeu 120 pacientes nos quais foi afastada a tuberculose ativa. Somente quatro pacientes no grupo controle reagiram positivamente ao teste, com uma especificidade de 96,7%. No grupo controle, 82 eram vacinados pelo BCG

ID . Neste grupo, somente 5 reagiram como falso positivos com uma especificidade nesta população de 97,3% ( SADA E;1992 ).

Na maioria dos casos, o diagnóstico da tuberculose foi realizado pela combinação de exames diretos, culturais, adicionados aos resultados dos exames radiológicos e sintomatologia clínica. Em alguns pacientes tuberculosos com doença ativa, os anticorpos antibacterianos foram detectados nestes indivíduos que reagiram como falsos-negativos. Especula-se se complexos antígeno-anticorpos podem reduzir o título de anticorpos detectáveis ( SADA, E; TORRES , 1992).

Um estudo utilizando o antígeno LAM, importante constituinte da parede celular da micobactéria, muito possivelmente relacionado à virulência, foi empregado em estudos no México. Os anticorpos IgG contra o LAM medidos em 66 pacientes com formas de tuberculose pulmonar, ganglionar e pleural foram comparados com um grupo de jovens controles, constituindo-se de pessoas saudáveis. Incluiu-se também nesse grupo portadores de histoplasmose e doenças pulmonares não micobacterianas: a análise dos autores mostrou uma sensibilidade de 63% e uma especificidade de 92%. Curiosamente, a baixa sensibilidade foi em pacientes com tuberculose pleural 13%, indicando infecção recentemente adquirida e portanto, baixos títulos de anticorpos (SADA E,TORRES;1990 e SADA E, AGUILAR D, 1992).

A análise dos anticorpos séricos oriundos de pacientes sugerem que a resposta imune dos indivíduos é focada em antígenos particulares. Geralmente é possível distinguir bandas ou *western-blots*, por exemplo, resultados indicando reconhecimento preferencial de limitados sítios de proteínas. Comparando os resultados de diferentes pacientes, porém , revela-se muitas variações individuais, achados indicando que fatores tais como os genéticos, infecções prévias e estados de doença têm uma influência na relativa imunodominância de diferentes antígenos ( YOUNG D, MEHLERT A ; 1989).

Um estudo da literatura utilizou o antígeno LAM para a detecção da tuberculose, comparando com um grupo controle. Em pacientes com tuberculose ativa, a sensibilidade do IgG anti-LAM foi de 85 a 93%. Em cinco pacientes com tuberculose ativa não bacilíferos, todos testados igualmente, a positividade do anti-LAM foi de 100%. A especificidade do teste depende da presença de infecção micobacteriana. O VPP e o VPN do teste foi de 52,5% e de 98%, respectivamente. Os autores concluíram que a pesquisa do anticorpo IgG anti-LAM foi relativamente sensível e específica para a tuberculose ativa, e, portanto, um teste de *screening* para o diagnóstico da tuberculose (CHAN E, BRENNAN P ; 2000).

Em um estudo realizado na Tanzânia, analisando o MycoDot em pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar, foram arrolados 241 indivíduos. Os resultados mostraram que o teste foi positivo em 26% da série com tuberculose bacilífera e com exame cultural positivo e em 7% dos pacientes bacilíferos, mas com exames culturais negativos. Dezenove por cento da série não preencheu os critérios do estudo e em 16 casos excluiu-se a tuberculose. Os resultados finais deste estudo mostraram que a sensibilidade foi de 16%; a especificidade foi de 89% e o VPP foi de 45%. (SOMI;G;R;1999)

Dequeker mostrou que o LAM ativa a proteína tirosina quinase Hck em neutrófilos humanos. Os lipoarabinomannans das micobactérias são lipoglicanos glicosilfosfatidil-mioinositol com diferentes atividades biológicas. Tem sido mostrado que os LAMs purificados, interagem, diretamente ou indiretamente, através de receptores com os receptores da membrana plasmática de células alvo, em dominantes proteínas ricas em glicosilfosfatidilinositol que contém Src familiares às proteínas tirosina quinases. Com o objetivo de examinar se os LAMs poderiam ativar os Src relacionadas às quinases, neutrófilos humanos foram expostos aos manosilados LAMs (MANLAMs) purificados de cepas de vacinas do *Mycobacterium bovis*, BCG, e fosfoinositóis ligados aos LAMs (

ARALAMs ou PILAM) obtidos de espécies não patogênicas de *Mycobacterium smegmatis*. Os autores concluíram primeiro que ambos MAN LAMs e PILAMs ativaram Hck em uma rápida e transitória maneira e segundo que a completa desacetilação dos MAN LAMs aboliram seu efeito na atividade Hck, demonstrando, então, que a acetilação do LAM, mas não a metilação é fator crítico para ativação da Hck. Estes dados indicam que a Hck encontra-se envolvida em sinalizar a via dos LAMs, moléculas conhecidas pela sua habilidade de estimular várias respostas nas células eucarióticas (DEQUEKER CA, NIGOU J; 2000).

O primeiro estudo relatado utilizando o LAM como antígeno para o diagnóstico da tuberculose foi realizado por Eduardo Sada, Patrick Brennan, Theresa Herrera e Martha Torres em 1990, onde foram avaliados pacientes da República Dominicana do México. Amostras séricas de 66 pacientes com tuberculose pulmonar, miliar, pleural e ganglionar foram analisadas pelo método de ELISA e comparados com uma população saudável, com pacientes com Histoplasmose e com um grupo de doentes nos quais se excluiu a tuberculose. Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 72%, comparáveis aos resultados de outros estudos utilizando outras espécies de antígenos; a maioria dos resultados falsos-positivos foram no grupo dos portadores de Histoplasmose. Os autores concluíram que o antígeno LAM possa ser de utilidade no sorodiagnóstico da Tuberculose. (SADA E, et al; 1990)

Outro estudo utilizou o LAM e alcançou os seguintes resultados: sensibilidade de 85% a 93% e especificidade de 100% (de acordo com a prevalência da doença na região). Em uma população de alto risco de infecção tuberculosa, a especificidade mostrada foi de 89%. O VPP e o VPN do teste foram de 52% e 98%, respectivamente. Concluíram que este teste pode ser útil para o diagnóstico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar. (CHAN ED; 2000).



Em um estudo realizado na Universidade de Boston em 1999, os autores estudaram o valor do antígeno lipoarabinomannan (LAM) e concluíram que o antígeno é um potencial fator de virulência que pode se ligar aos leucócitos e modular as respostas imunes (STROHMEIER GH; 1999).

Um estudo sobre a produção de anticorpos monoclonais ao antígeno lipoarabinomannan e seu uso para a detecção dos antígenos mycobacterianos no escarro foi realizado em 1990, por um grupo de médicos da Korea. Este estudo foi iniciado para produzir anticorpos monoclonais ( Mab ) ao antígeno lipoarabinomannan-B ( LAM B ) e usar os anticorpos para a detecção da micobactéria. Neste estudo cinco anticorpos monoclonais específicos ao LAM B foram produzidos: LAM 701 ( IgG 3); LAM 138 ( IgM ); LAM 204 ( IgM ); LAM 302 ( IgM ) e LAM 604 ( IgM ). Foi realizado o teste de ELISA para detectar LAM B e outros antígenos micobacterianos utilizando os anticorpos monoclonais. Com o MAB LAM 701, a concentração mínima detectável foi de 1.0 ng/ml para o LAM B, e 1.0 µg/ml para o *Mycobacterium tuberculosis* de todas as outras células, respectivamente. Examinou-se 14 espécimes com pesquisa de BAAR positiva, pelo método direto ou pela cultura, sendo que 10 (71,4%) foram positivos pelo teste de ELISA. Em contraste, o exame de escarro mostrou resultados positivos em somente 6 espécimes (42,9%). Nenhum dos 25 espécimes negativos ao exame direto ou cultural foram positivos pela técnica de ELISA, usando o MAB LAM 701. Embora avaliações adicionais sejam necessárias, este estudo sugere que os anticorpos monoclonais ao LAM B podem ser úteis em detectar micobactérias de outros espécimes clínicos. ( CHO SN;1990).

Um estudo detectou anticorpos anti-lipoarabinomannan para o diagnóstico da tuberculose ativa. Foram investigadas amostras séricas de 102 pacientes, HIV negativos, sem história prévia de tuberculose e com suspeita de doença ativa, no momento do estudo, que se constituiu de 66 casos de formas pulmonares e 36 casos de formas extrapulmonares.

O grupo controle incluiu 50 indivíduos HIV negativos, saudáveis, com PPD negativo e sem história de contato ou de doença prévia. Os autores concluíram que 25 de 28 amostras séricas foram positivas, enquanto o teste foi negativo em dois pacientes, um com tuberculose pulmonar e outro com tuberculose renal. As demais amostras foram negativas e o seguimento e acompanhamento destes doentes não evidenciou a doença. Todos os controles foram negativos. Em base dos achados os autores concluíram que o teste do MycoDot é rápido, de fácil execução e poderia ser usado de rotina nos laboratórios para o diagnóstico da tuberculose pulmonar ou extrapulmonar (PRETE R; MOSCA A; 1998).

Em um estudo realizado na China, Shangay, o anticorpo sérico LAM-B, purificado do *Mycobacterium tuberculosis* foi testado pelo método de ELISA em 250 amostras séricas a seguir distribuídas: 96 casos de tuberculose pulmonar, 11 casos de tuberculose pleural, 2 casos de tuberculose renal, 33 casos de tuberculose ósteo-articular, 16 casos de doença do SNC, 22 casos de carcinoma brônquico e 20 casos de lepra. O grupo controle foi de 50 indivíduos. Alguns resultados foram avaliados, mostrando sensibilidade na tuberculose pulmonar de 69,8% e na tuberculose do SNC de 18,8%. Estes baixos achados na tuberculose do SNC poderia indicar o bloqueio da liberação do anticorpo do foco patológico para o sangue pela barreira hemato-encefálica (CHUNG-HUA et al; 1990).

Em um estudo para o diagnóstico de tuberculose em pacientes HIV soropositivos e HIV soronegativos, incluiu-se 142 soropositivos com tuberculose ativa, 144 soronegativos com tuberculose ativa, 153 controles soropositivos e 155 controles soronegativos. Os resultados mostraram que a sensibilidade do teste MycoDot para a detecção de tuberculose foi de 40,1% em pacientes HIV soropositivos, comparados com 63,2% em HIV soronegativos (  $P < 0,001$  ). Quando foram avaliados apenas os indivíduos com diagnóstico de tuberculose confirmada, a sensibilidade do teste foi de 40,6% nos soropositivos e de 70,8% nos soronegativos. A mesma foi similar tanto em pacientes com formas

pulmonares como extrapulmonares da doença. A sensibilidade do teste em pacientes com  $CD4 > 200$  células/mm<sup>3</sup> foi significativamente maior do que nos casos onde a contagem de células CD4 foi menor que 200 células/mm<sup>3</sup>. A especificidade do teste foi de 97,4% e foi idêntica em HIV soropositivos e HIV soronegativos ( RATANASUWAN W; NOLAN C; 1997).

Em Hospital de Shangay, o anticorpo sérico contra o antígeno LAM-B foi testado pelo método de Elisa em 250 pacientes, incluindo 96 casos de tuberculose pulmonar, 11 casos de derrame pleural tuberculoso, 2 casos de tuberculose renal, 2 casos de tuberculose óssea, 33 casos de tuberculose ósteo-articular, 16 casos de meningite tuberculosa, 22 casos de neoplasia brônquica, 20 casos de lepra e 50 indivíduos considerados normais como grupo controle. A positividade da tuberculose pulmonar foi de 69,8%, similar às outras formas de tuberculose, exceto pela meningite tuberculosa, na qual apenas 18,8% dos testes foram positivos, indicando o bloqueio da liberação de anticorpos pela barreira hematoencefálica. As taxas positivas nos casos de lepra foram de 50,0% e no grupo controle foram de apenas 2%. Nenhum anticorpo foi achado nos casos de neoplasia brônquica. Pelo estudo sugere-se que uma lesão básica ativa de tuberculose no hospedeiro é requisito para a positividade do teste anti-LAM B. Embora este anticorpo anti-LAM B seja encontrado na lepra, a baixa prevalência desta enfermidade na China não altera os resultados, sendo de pouca influência na interpretação dos estudos epidemiológicos, podendo ser uma auxiliar ferramenta para o diagnóstico de tuberculose na prática diária. (CHUNG HC; 1990).

Um estudo avaliou o teste sorológico em 52 pacientes que eram bacilíferos, 27 pacientes não bacilíferos, mas com evidência de tuberculose ativa ( cultura do escarro positiva em 16 casos, resposta positiva ao esquema terapêutico instituído em 11 casos). Foram também avaliados 11 pacientes com lesão cicatricial de tuberculose e 39 indivíduos

saudáveis com BCG ID. Os resultados mostraram uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 100% nos pacientes bacilíferos. Nos pacientes não bacilíferos, a combinação do antígeno 19 kDa, epítipo do antígeno LAM, e hsp 65 ( epítipo do tb 78) foi necessária para alcançar uma sensibilidade de 64% e uma especificidade de 95%. Recorrente e extensiva doença radiológica com um pobre prognóstico foi associada com altos anticorpos anti-38 kDa. Recidiva bacteriológica mostrou-se associada com altos níveis de anti-14 kDa. A conclusão do estudo mostrou que o anti-LAM ou epítipos específicos podem se mostrar como métodos auxiliares no diagnóstico, avaliação do prognóstico e monitorização do tratamento quimioterápico em pacientes com tuberculose pulmonar. ( BOTHAMLEY GH;1992).

Um estudo interessante foi realizado para medir a prevalência de anticorpos ao PPD e ao LAM na tuberculose com a técnica de aspiração com biópsia com agulha fina (FNAB). Recentes aumentos na incidência de neoplasia de pulmão, muitas vezes dificulta o diagnóstico diferencial com tuberculose. A FNAB tem sido empregada no diagnóstico do câncer de pulmão com grande sucesso diagnóstico mas a acurácia do método para o diagnóstico da tuberculose não tem sido suficiente. Como rápido *screening* teste para a tuberculose, os autores avaliaram a sorologia utilizando PPD e LAM. Um total de 95 pacientes com indicação de FNAB para exames citológicos foram realizados. Dos pacientes, 25 tinham tuberculose, 76 tinham malignidade torácica e 7,9% dos casos de neoplasia de pulmão apresentavam também tuberculose, indicando uma prevalência muito mais alta em portadores de neoplasia de pulmão de tuberculose associada. Anticorpos para o PPD foram elevados em 18 casos (72.0%) dos 25 pacientes com tuberculose e em 22 casos (31,4%) dos 70 pacientes com malignidade. Em contraste, somente 3 dos saudáveis com 40 anos ou mais de idade foram positivos ao antígeno PPD (4,7%). A prevalência dos anticorpos anti-PPD em pacientes com tumores torácicos foi então significativamente

maior do que no grupo controle (  $p < 0,001$ ). Entretanto não houve diferenças na prevalência dos anticorpos anti-LAM entre os controles. Este estudo demonstra que os pacientes com tumor torácico tem significativamente elevados anticorpos contra o PPD; então alta antisorreatividade ao PPD, em pacientes com tumores torácicos deveriam ser cautelosamente interpretados. Uma investigação longitudinal de pacientes com malignidade torácica sororreagentes é necessária para determinar o papel do teste sorológico para a tuberculose em pacientes com neoplasia de pulmão ( YONSEI J;2001).

Um estudo de coorte na Suíça foi realizado analisando os anticorpos anti-LAM em doentes portadores do vírus HIV. Anticorpos para o LAM foram detectados no soro de somente 9 pacientes dos 85 pacientes do grupo, todos HIV positivos, com um diagnóstico confirmado de tuberculose. Devido ao baixo grau de sensibilidade nos soros dos HIV infectados, as conclusões não suportam o uso desta sorologia para o diagnóstico de pacientes com tuberculose e infectados pelo HIV. (BOGGIAN K; 1996).

Um estudo para avaliar o papel do antígeno LAM no soro diagnóstico de pacientes com tuberculose pulmonar foi realizado na Universidade de Ghana. Foram analisados 52 pacientes com tuberculose pulmonar bacilífera, dos quais 20 eram soropositivos ao vírus HIV e 32 eram negativos ao vírus HIV. Os soros controles foram de 20 pacientes com pneumonia lobar não-tuberculosa e de 20 indivíduos que não apresentavam nenhuma doença respiratória. O teste mostrou uma alta especificidade de 97,5% . Porém , a sensibilidade dos HIV negativos foi de 56% , substancialmente mais baixa em relação aos não infectados pelo HIV; nos HIV positivos foi ainda mais baixa (25%). Os autores concluíram que o teste MycoDot é altamente específico e de fácil realização. Porém, a pobre sensibilidade, especialmente nos HIV positivos o torna útil como medida adicional para o diagnóstico da tuberculose em HIV negativos ( LAWN SD; 1997).

Em um estudo a detecção do anti-LAM foi realizada por um teste de coagulação para o diagnóstico da tuberculose, no Instituto Nacional das Doenças do México. O teste mostrou uma sensibilidade de 88% em pacientes com tuberculose pulmonar bacilífera. A sensibilidade do teste nos pacientes não-bacilíferos foi de 67%. Resultados menos favoráveis ocorreram quando havia coinfeção pelo HIV, com uma sensibilidade de 57%. A especificidade nos portadores de outras doenças pulmonares e nos indivíduos controles foi de 100%. O VPP foi de 100%, e o VPN para pacientes pulmonares bacilíferos foi de 97%. Os resultados deste estudo foram animadores, sugerindo que a detecção do antígeno LAM é um acurado teste para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. ( SADA E; TORRES M; 1992).

Um outro estudo documentou a utilidade do LAM para o diagnóstico da meningoencefalite tuberculosa. Anticorpos IgG foram medidos pela técnica de ELISA no LCR e no soro de 27 pacientes com meningite tuberculosa, usando como antígeno o PPD e o LAM. O grupo controle foi de 29 pacientes com meningite asséptica e 49 pacientes com doença neurológica não-inflamatória. Todos os pacientes foram submetidos a Tomografia Computadorizada de cérebro e punção lombar, previamente ao estudo sorológico. Os anticorpos IgG aos antígenos foram significativamente elevados na doença neurológica de etiologia tuberculosa e a reatividade do teste foi mais frequentemente positiva no LCR do que no soro, sugerindo uma síntese local de anticorpos IgG no sistema nervoso central. A sensibilidade e a especificidade para o diagnóstico de doença neurológica do SNC por tuberculose foi de 59,2% e 93,3% para o antígeno PPD, e foi de 85,2% e 95,9% para o antígeno LAM, respectivamente. O uso do antígeno LAM foi considerado de utilidade clínica muito útil para o precoce diagnóstico da tuberculose do SNC e foi superior ao PPD para a detecção de evidência sorológica de TUBERCULOSE. ( PARK SC; BI I; 1993).

Um estudo realizado no Instituto Nacional de Doenças Transmissíveis em Delhi, com vários antígenos para observar se a combinação dos mesmos ou o uso de antígenos purificados e isolados para o diagnóstico da tuberculose eram diferentes. Resultados encorajadores foram obtidos com a detecção do antígeno 43 kDa com o antígeno LAM e com o antígeno 5, no soro, no LCR, e em outros espécimes coletados (sensibilidade 80 a 100% e especificidade de 93-100%). Concluíram que os testes sorológicos podem ser de grande ajuda no diagnóstico da tuberculose, principalmente nas formas não-bacilíferas, pois se constituem em testes rápidos e de fácil execução. (GUPTA S, BHATIA R; 1995).

Um estudo mostrou a produção de anticorpos monoclonais ao antígeno LAM-B e seu uso na detecção de antígenos no escarro. O estudo foi iniciado para produzir anticorpos monoclonais (Mab) ao antígeno LAM-B e utilizar os anticorpos para a detecção das micobactérias. Neste estudo, cinco anticorpos monoclonais específicos ao LAM-B foram produzidos. LAM 701 (IgG 3), LAM 138 (IgM), LAM 204 (IgM), LAM 302 (IgM) e LAM 604 (IgM). Usou-se a técnica de ELISA para a detecção do LAM-B e outros antígenos micobacterianos usando anticorpos monoclonais. Os resultados mostraram que em 14 espécimes de escarros positivos para o bacilo, 10 (71,4%) foram positivos pelo método de ELISA; em somente 6 (42,9%) o teste foi positivo para os não-bacilíferos.

Apesar de que a produção de anticorpos monoclonais ao antígeno LAM-B pode ser útil em detectar micobactérias de outros espécimes clínicos, avaliações adicionais são necessárias para maior utilidade clínica. (CHO SN; 1990).

O diagnóstico de neoplasia pulmonar por punção aspirativa da lesão tem-se consagrado como de ótima acurácia. Entretanto, o mesmo procedimento para lesões benignas tem demonstrado baixa sensibilidade e especificidade, não se podendo afastar o diagnóstico dessas lesões por este método. Assim, um grupo de autores realizou pesquisa sérica do antígeno LAM, para tentar a confirmação das lesões benignas e diagnosticar

precocemente tuberculose associada à malignidade. Os antígenos selecionados foram o PPD e o LAM. Os resultados concluíram que a positividade do PPD foi maior do que a do antígeno LAM, mas os resultados não mostraram diferenças estatísticas significativas. ( CHO SANG; 2001).

Um estudo tentou demonstrar a utilidade do antígeno LAM em amostras de urina de 200 pacientes com tuberculose e em 800 pacientes não tuberculosos. Cinquenta indivíduos controles saudáveis e 100 outros etíopios constituíram o grupo controle. Dos pacientes com tuberculose, 139 (69,5 %) foram positivos para a pesquisa de BAAR na urina. Nos casos remanescentes, o diagnóstico foi definido em bases clínicas. Todos os pacientes não tuberculosos foram negativos às amostras de escarro e não mostraram nenhuma evidência clínica de tuberculose. Os resultados finais mostraram que a detecção do antígeno LAM na urina de pacientes tuberculosos pode aumentar a detecção da mesma, o que é importante para as ferramentas dos Programas de Controle da tuberculose, na busca precoce dos bacilíferos. ( TESSEMA TA, Hamasur B ; 2001).

Realizou-se na Universidade do Colorado um estudo baseado na detecção de anticorpos contra o antígeno LAM. O objetivo deste estudo foi investigar a acurácia do método em pacientes com tuberculose pulmonar ativa bacilífera e em pacientes controles com ou sem infecção latente. Nos pacientes com tuberculose ativa a sensibilidade do anticorpo IgG anti-LAM foi de 85 a 93%. Em cinco pacientes com tuberculose ativa, mas não bacilíferos, todos mostraram positividade ao teste. A especificidade do teste dependeu da prevalência da infecção tuberculosa na área estudada. Nos Estados Unidos onde a prevalência é baixa, a especificidade foi de 100%. Em uma população de alto risco de infecção tuberculosa, a especificidade foi de 89%. Os VPP e VPN do teste foi de 52% e de 98%, respectivamente. Os autores concluíram que o teste anti-LAM é relativamente



sensível e específico para a tuberculose ativa e, assim, um teste de *screening* em potencial para o diagnóstico da mesma (CHAN E; BRENNAN J;2000).

Como estabelecer uma relação duradoura com o hospedeiro ? A tuberculose pode nos dar algumas lições.

O *Mycobacterium sp* apresenta um estilo de vida que é fatal em relação aos outros microorganismos. O bacilo persiste e se multiplica nos fagócitos mononucleares em face das defesas que surgem do oxigênio tóxico e radicais de nitrogênio, proteases ácidas e peptídeos bactericidas. A captação do *Mycobacterium sp* pelos fagócitos resulta novamente na formação de um fagossoma, que é manipulado pelo patógeno para acomodar suas necessidades de sobrevivência intracelular e a sua replicação. O presente trabalho descreve o compartimento intracelular ocupado pelo *Mycobacterium sp* e apresenta idéias de como a micobactéria pode estabelecer este nicho, colocando ênfase especial no envolvimento dos lipídeos da parede micobacteriana.( RHOADES ER ;2000).

A parede micobacteriana é, até o momento, o principal sucesso do *Mycobacterium tuberculosis* como patógeno e o seu papel não seria possível sem ela. A parede da célula é responsável pela proteção da mesma, regulação da interação entre o bacilo e seu ambiente. O ambiente discutido é o macrófago. A biologia molecular da parede celular é a que determina como o modo de interação acontece. Compreendendo melhor a composição química da parede celular fará com que as ações do microorganismo sejam melhor entendidas.

A parede celular da micobactéria, em geral, reage fracamente à coloração pelo Gram, é filogeneticamente relacionadas às bactérias gram-positivas e falta a clássica endotoxina lipopolissacáride relacionada com bactérias gram negativas. Há muitos fatores da parede celular micobacteriana que estão presentes em ambas bactérias gram positivas e negativas como outros fatores que são exclusivos de cada grupo.

Embora o exame de escarro permaneça na liderança do diagnóstico da tuberculose, promovendo rápida detecção, apresenta ainda uma sensibilidade baixa. Os exames culturais provêm maior sensibilidade e um definitivo diagnóstico, mas algumas vezes poderá não haver o crescimento da micobactéria, além das dificuldades laboratoriais que existem.

O imunodiagnóstico da tuberculose tem sido um grande objetivo a alcançar. Embora a reação de Mantoux tem provado sua utilidade em identificar pessoas infectadas ou doentes, em áreas de baixa prevalência, sua aplicação é limitada em regiões de alta prevalência, pois a população nestas áreas é tuberculino-positivas por infecção natural ou pelo BCG ID. Numerosos testes sorológicos têm sido desenvolvidos por um meio rápido, de baixo custo, sensíveis e efetivos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar. Na literatura, a sensibilidade e a especificidade do teste tem sido documentada como de 70-80% e 90-95%, respectivamente. Os resultados dependem da natureza dos antígenos, do seu grau de purificação, da forma de realização do teste e da prevalência da tuberculose nas populações. Devido à natureza crônica da doença, porém, é difícil decidir se a doença é correntemente baseada na presença de elevados anticorpos aos antígenos micobacterianos.

O LAM é um componente da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*, com potente atividades pró-inflamatórias *in vitro*. Ele é capaz de recrutar granulócitos de uma linha de defesa da tuberculose e estimular citocinas. Porém, a destruição do tecido pulmonar tem sido associada com alto número de granulócitos. Então, se o LAM contribui para a defesa do hospedeiro ou, por outro lado, facilita a invasão micobacteriana permanece a ser determinado. A inflamação pulmonar produzida pelo LAM pode estar em parte mediada por atividades de Interleucinas –1 endógenas. Questiona-se se o LAM do *Mycobacterium tuberculosis* não poderá ser o principal estimulador da imunidade inata durante a tuberculose.

O LAM tem emergido como uma molécula de potencial interesse. Além de ser um potente modulador das atividades das células T e dos macrófagos, está envolvido em interações não opsônicas do *Mycobacterium tuberculosis* com os macrófagos. *In vivo* e *in vitro* achados indicam que o LAM pode ser liberado no sítio infeccioso de macrófagos infectados, assim influenciando as respostas imunes locais. Vesículas contendo LAM são liberadas de fagossomas seguindo a ingestão de macrófagos que fagocitam *Mycobacterium tuberculosis*. Anticorpos anti-LAM estão presentes no soro de pacientes com tuberculose. Neste papel os autores observaram que o LAM, em concentrações fisiológicas, modula os mononucleares, mas não os polimormonucleares e a atividade dos fagócitos. Resultados destes estudos são consistentes com achados obtidos *in vitro* indicando que o LAM poderia participar na precoce resposta imune do hospedeiro às micobactérias, principalmente, através de sua habilidade de modular as atividades dos fagócitos mononucleares. Particularmente, a atividade quimioatrativa do LAM para os fagócitos mononucleares do hospedeiro podem representar um importante evento *in vivo* na formação e manutenção do granuloma tuberculoso. Além disso, a inibição da fagocitose dos macrófagos por Man LAM poderia agir sinergicamente com outras capacidades antiinflamatórias destas moléculas a fim de ordenar ou favorecer a sobrevivência do *Mycobacterium tuberculosis* e o estabelecimento de uma infecção crônica.

Sumarizando, os autores têm mostrado que a IgG anti-LAM é um sensível marcador de utilidade da tuberculose ativa, na população do Estados Unidos considerada de estar em risco aumentado para a tuberculose. Utilizando culturas de escarro como padrão-ouro, a IgG anti-LAM foi positiva em cinco de seis pacientes com tuberculose ativa, não bacilíferos. Além disso, em indivíduos com ou sem infecção latente, definidos pelo PPD, a IgG anti-LAM foi bastante específica para doença ativa. O alto valor preditivo negativo da IgG anti-LAM em uma população de risco para infecção tuberculosa, torna este estudo com

um potencial valor de *screening* para a tuberculose. Porém, em pacientes com evidência radiológica de tuberculose prévia mas não tratados, uma IgG anti-LAM positiva parece ser um pobre preditor de atividade da doença. Embora o custo do teste possa variar, os autores estimam que o mesmo é baixo, podendo ser realizado sem necessidade de material sofisticado. (CHAN E, HAHN W;2000)

### **8.3 Casuística**

A casuística constituiu-se de 173 pacientes portadores de tuberculose. Tuberculose pulmonar com confirmação microbiológica ocorreu em 81 casos. Das formas pulmonares 81 foram bacilíferos (BAAR positivo) e 7 foram não bacilíferos (BAAR negativo). Sabe-se por estudos realizados que a sorologia para tuberculose usando diversos antígenos costuma ser mais sensível nas formas bacilíferas. Entretanto, dos 7 casos negativos à baciloscopia, encontramos 6 casos com o teste MycoDot positivo. Outro dado significativo foi que entre os bacilíferos, os portadores de BAAR + no escarro mostraram positividade ao teste do MycoDot de 73,1%, os portadores de BAAR ++ 82,3% e, surpreendentemente, os com BAAR +++ foram os que menos reagiram ao MycoDot, com positividade de 68,2%, apesar de não haver significância estatística entre os resultados.

Nas formas extrapulmonares que foram 71 casos (41%) o teste do MycoDot mostrou-se positivo em 45 casos (63,3%) e negativo em 26 casos (36,6%). Tais dados são compatíveis com um dos objetivos da realização do teste, que seria o diagnóstico das formas extrapulmonares. Entretanto, a sensibilidade do teste MycoDot na tuberculose pleural, em nossa casuística, foi de 68,7%, superior aos dados achados na maioria dos trabalhos da literatura. Em relação à meningoencefalite tuberculosa, observamos uma

sensibilidade do teste MycoDot de 28,5%, que consideramos baixa. Tais dados são compatíveis com os relatados na literatura.

Nas formas pulmonares mais extrapulmonares que ocorreram em 14 casos, representando 8,1% da série total, o teste do MycoDot foi positivo em mais de 50% dos casos, sendo negativo em 5 casos (35,7%).

Nos pacientes infectados pelo vírus HIV que foram em número de 55 (31,8%), o teste do MycoDot foi positivo em 34 casos (61, 8%) e negativo em 21 (38,2%). Estes resultados nos surpreenderam pela sua alta positividade na coinfeção HIV-tuberculose. (ISEMAN MD;2000).

Os exames culturais foram positivos em 72 casos. Nestes , o teste do MycoDot foi positivo em 47 casos e negativo em 25 casos. Interessante foi a observação de que nos 10 exames culturais que foram negativos, em 6 o teste do MycoDot foi positivo (60%).

Nos 13 casos considerados como casos-índices a doença não foi confirmada, mas os pacientes foram incluídos na série por critérios rigorosos. Nestes, o teste do MycoDot foi em 6 casos (13,4%) e negativo em 7 (4,0%).

#### **8.4 Controles**

O grupo controle constituiu-se de 77 indivíduos assim distribuídos: 41 sadios (53,2%), 6 sadios com BCG ID prévia (7,8%), 6 indivíduos sadios sem BCG ID prévia (7,8%) e 16 portadores de lesões residuais prévias de tuberculose (20,8%). O teste do MycoDot foi negativo em 73 amostras (94,8%) e positivos em apenas 4 casos (5,2%). Concluimos por estes resultados que a vacinação pelo BCG ID e seqüela de tuberculose, ou

seja, doença não ativa, não mostrou o teste MycoDot positivo. Em relação aos 4 controles com teste MycoDot positivo, especula-se que a compreensão mais profunda da imunogenicidade da tuberculose, o envolvimento genético, a virulência do bacilo, a fonte de infecção, as diferentes respostas celulares e humorais dos indivíduos poderiam explicar estes achados. Também, não se pode excluir que estes pacientes já apresentassem alterações precoces da doença, ainda sem expressão clínica, o que poderia ser detectado por anticorpos IgM.

A especificidade do teste em HIV positivos foi de 100%, entretanto gostaríamos de ressaltar que havia apenas 1 controle HIV positivo.

### **8.5 Comentários finais sobre a utilização do Antígeno LAM**

Os autores deste trabalho parecem ter se iluminado na escolha do antígeno, após revisão da literatura. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados nos inúmeros trabalhos revisados, considerando o antígeno LAM ainda de muito potencial a ser descoberto.

Casos de tuberculose pulmonar com bacterioscopia negativa e alguns casos de tuberculose extrapulmonar freqüentemente representam problemas diagnósticos na prática assistencial. Um método para o diagnóstico de tuberculose, por meio de um exame de sangue de fácil execução e baixo custo, poderia constituir-se em um recurso auxiliar, que seria de maior utilidade nos casos de dificuldade diagnóstica.

Em relação aos pacientes com coinfeção HIV, ficamos impedidos de avaliar o seu grau de comprometimento imunológico, pois, na época, havia dificuldades na obtenção da detecção de níveis de células CD4 e dosagem de carga viral. Entretanto, na literatura, surpreendeu-nos que estes itens não foram mais contemplados na conclusão dos resultados.

O grupo de pacientes controles também deixou a desejar, pelas poucas informações adicionais que poderiam enriquecer este trabalho e também tentar explicar os 4 casos que se mostraram positivos ao teste MycoDot, sem evidência de doença ativa.

Revisando todas as propriedades do antígeno lipoarabinomannan, gostaria apenas de deixar uma reflexão: estariam estes pacientes com doença ainda sub-clínica? Poderia se questionar possíveis propriedades protetoras do antígeno LAM em uma fase precoce da infecção ?

### **8.6 Outros antígenos utilizados para o sorodiagnóstico da tuberculose**

Inúmeros antígenos têm sido testados na literatura com o objetivo de representar um método adicional para o diagnóstico da tuberculose, com diferentes resultados estatísticos.

Na literatura internacional existem inúmeros trabalhos publicados, utilizando antígenos variados que foram testados isolados ou em associação, para testar a sua utilidade como instrumento adicional no diagnóstico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar, explorando a imunidade humoral, pouco estudada nesta doença.

Os principais antígenos estudados compreendem:

- Antígeno Lipooligosacáride (LOS) (DALEINE J; 1995)
- Antígeno ANDA A60-tb (QADRI SM, SMITH KK; 1992); (ALIFANO M; 1994); (GUPTA S, KUMARI S; 1995); (WANG FD; 1994); (CAMINERO JÁ; 1994); (DAFTARI VG; 1994); (GEVAUDAN MJ, BOLLET C; 1992); (POUTHIER F; 1994); (AMICOSANTE M, PAONE G; 1993); (FRANCO J, CAMARENA JJ; 2001); (ZHANG JD; 1994); (DAFTARY VG; 1994); (CHIANG CS; 1994); (TURNER N, VAN NERON; 1994); (COCCITO CG; 1991) e (DELACOURT C, GOBIN J; 1993).

- Antígeno 2,3- DIACILTREHALOSE (DAT) no *Mycobacterium tuberculosis* (DATT) e no *Mycobacterium fortuitum* (DATF) (TORTOLA MT, LANEELLE MA; 1996); (SEMPERE N, ARIZA M; 1995); (ESCAMILLA L; 1996).
- Fator Cordão (TREHALOSE-6,6'-DIMICOLATO) (MAEKURA R, NAKAGAWA M; 1993) e (KASHIMA K, OKA S; 1995).
- Antígeno Excretório Secretório (ES) (BHASKAR A; 1994).
- Antígeno 5 (MA YU, DANEIL T; 1996).
- Antígeno 38 kDa (BOTHAMLEY GH;1994); (BOTHAMLEY GH; 1992); (CHIERAKUL N; 2001); (WILKINS E JL; 1990) e (KADIVAL GV;1994).
- Antígeno 14 kDa E LAM (CHANDRAMUK A;1989).
- Antígeno 65 kDa (SINGH NB; 1995).
- Antígeno 34kDa (AMICOSANTE M; 1995).
- Antígeno KP 90 (KRITSKI AL, CONDE MB; 2002).
- Antígeno 88 kDa (LAAL S; 1997).
- Antígeno 16 kDa (IMAZ MS, COMINI E; 2001).
- Antígeno ESAT-6 e CFP-10 Até o momento de conclusão deste trabalho, estes antígenos são os últimos testados pela literatura. Foram descritos cinco pacientes com apresentações incomuns de tuberculose, nos quais o diagnóstico foi tardio por procedimentos diagnósticos negativos ou por resultados conflitantes. Produção de interferon- $\gamma$  em resposta ao ESAT-6 CFP-10 por células mononucleares destes pacientes foram avaliados antes e depois do tratamento para a tuberculose. Os resultados mostraram que em todos os cinco pacientes as respostas obtidas do interferon- $\gamma$  foram superiores às prévias. Estes resultados indicam que as respostas das células T aos antígenos específicos tem potencial diagnóstico quando houver



suspeita ou os resultados forem inconclusivos, especialmente nos vacinados pelo BCG ID (AREND SM, 2001).

## **9. Conclusão**

O emprego de um teste diagnóstico de reação antígeno-anticorpo constituiu-se em uma contribuição substancial para a identificação de casos de tuberculose pulmonar e extrapulmonar. A escolha do antígeno LAM representou um instrumento sensível e específico para o imunodiagnóstico da Tuberculose. Este teste não substitui a identificação microbiológica, devendo sua aplicabilidade clínica ser reservada para casos de difícil diagnóstico, casos com baciloscopia negativa e de formas extrapulmonares da tuberculose.

Estas afirmações derivam da análise interpretativa dos seguintes resultados extraídos de nossa casuística, assim sumarizados: (a) sensibilidade 69,4%; (b) especificidade de 94,8%; (c) valor preditivo positivo de 96,8%; (d) valor preditivo negativo de 57,9%.

## 10. Referências

AGUADO JM, Rebollo MJ, Palenque E, Folgueria L. Blood –based PCR assay to detect pulmonary tuberculosis. *The Lancet* 1996; 347: 1836-1837

ALDE SLM, Piñasco M, Pelosi FR, et al. Evaluation of na Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Using an IgG Antibody to Mycobacterium tuberculosis Antigen 5 in the Diagnosis of Active Tuberculosis in Children. *Am Rev Respir Dis*; 1989: 139: 748-751

ALIFANO M, Del-Pezzo M, Lamberti C, Faraone S, Covelli I. ELISA method for evaluation of anti-A60 IgG in patients with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *Microbiologica* 1994; 17(1): 37-43

ALIFANO M, Pascalis R, Sofia M, Faraone stanislao, Del Pezzo M, Covelli I. Evaluation of IgA-Mediated Humoral Immune Response Against Mycobacterial Antigen P-90 in Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *CHEST* 1997; 111: 601-605

AMICOSANTE M, Barnini S, Corsini V, paone G, Read CA, Tartoni PL, Singh M, Albera C, Bisetti A, Senesi S, et al. Evaluation of a novel tuberculosis complex-specific 34kDa protein in the serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 1995; 8(12): 2008-2014

ANTUNES A, Nina J, David S. Serological screening for tuberculosis in the community: an evaluation of the MycoDot procedure in an African population with high HIV-2 prevalence. *Res Microbiol* 2002; 153(5): 301-305

AREND SM, Ottenhoff THM, Andersen P, van Dissel JT. Uncommon presentations of tuberculosis: the potential value of a novel diagnostic assay based on the *Mycobacterium tuberculosis*- specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(7): 680-686

ARIKAN S, Tuncer S, Us D, Unal S, Ustaçelebi S. Anti-Kp 90 IgA Antibodies in the Diagnosis of Active Tuberculosis. *CHEST* 1998; 114: 1253-1257

ARYA SC. Serologic Diagnosis of Tuberculosis Through Assays of Lipoarabinomannan Antigen or Antibodies or Lysotime level. *J Clin Microbiol* 1993; 31(10): 2836-2838

BALASZ D. The applications of molecular biology in the diagnosis, prophylaxis and treatment of tuberculosis. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* 1992; 37: 9-20

BANICA D, Algeorge G, Moisoiu A, Petre A, Toanca M. The possibilities for improving the serological diagnosis of active tuberculosis by using new mycobacterial antigens and immunoblot and ELISA technics. *Pneumoftiziologia* 1994; 43(3-4): 173-177

BANKI A, Jenei PM, Richards GM. *Mycobacterium tuberculosis* and its host cell, the macrophage. *Fundamentals of Microbiology Group from University of Connecticut* 1996. Project TB.

BARNES PF, Barrows SA. Tuberculosis in the 1990s. *Ann Intern Med* 1993; 119: 400-410

BARRERA L, Ritacco V, Eisele C, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for the rapid diagnosis of paucibacillary tuberculosis in adults. *Medicina B Aires* 1989; 49(6): 561-566

BENJAMIN RG, Debanne SM, Ma Y, Daniel TM. Evaluation of mycobacterial antigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol* 1984; 18: 309-318

BESRA GS, Brennan PJ. The mycobacterial cell wall: biosynthesis of arabinogalactan and lipoarabinomannan. *Biochem Soc Trans* 1997; 25(3): 845-850

BHARGAVA DK, Dasarathy S, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using mycobacterial saline-extracted antigen for the serodiagnosis of abdominal tuberculosis. *Am J Gastroenterol* 1992; 87(1): 105-108

BHASKAR A, Pradhan P, Chaturvedi P, Basak A, Lodam A, Narang P, Harinath BC. Immunodiagnosis of childhood pulmonary and extrapulmonary tuberculosis using *Mycobacterium tuberculosis* ES antigen by penicillinase ELISA. *Ann Trop Paediatr* 1994; 14(1): 25-30

BLAIR AL, Cree IA, Beck JS, Grange JM, Kardjito T. Heat-stable opsonins in tuberculosis and leprosy. *FENS-Immunol Med Microbiol* 1993; 7(2): 197-204

BOGGIAN K, Fierz W, Vernazza PL. Infrequent detection of lipoarabinomannan antibodies in human immunodeficiency virus associated mycobacterial diseases. Swiss HIV Cohort Study. *J Clin Microbiol* 1996; 34(7): 1854-1855

BOTHAMLEY GH, Gibbs JH, Beck JS, Schreuder GM, et al. Delayed hypersensitivity and HLA in smear-positive pulmonary tuberculosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106(1): 38-45

BOTHAMLEY GH, Rudd R, Festenstein F, Ivanyi J. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax* 1992; 47(4): 270-275

BOTHAMLEY GH, Rudd RM. Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* 1994; 7(2): 240-246

BOUVET E. Infectious respiratory complications of AIDS. *Presse Med* 1992; 21(31): 1476-1481

BROCK I, Munke ME, Kok-Jensen A, Andersen P. Performance of whole blood IFN-gama test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(5): 462-467

CANETTI G. *The Tubercle bacillus in the Pulmonary Lesion of Man: Histobacteriology and Its Bearing on the Therapy of Pulmonary Tuberculosis*. New York: Springer Publishing Company, Inc; 1955

CHAN ED, Reves R, Belisle JT, Brennan PJ, et al. Diagnosis of Tuberculosis by a Visually Detectable Immunoassay for Lipoarabinomannan. *Am J Respir Crit Care* 2000; 161: 1713-1719

CHAN ED, Reves R, Brennan P, et al. Diagnosis of Tuberculosis by a Visually Detectable Immunoassay for Lipoarabinomannan. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5): 1713-1719

CHAN J, Flynn JL. Nitric Oxide in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Nitric Oxide and infection*. New York: Plenum, 1999: 281-310

CHAN SL, Reggiardo Z, Daniel TM, et al. Serodiagnosis of Tuberculosis Using an ELISA with Antigen 5 and a Hemagglutination Assay with Glycolipid Antigens. *Am Rev Resp Dis* 1990; 142: 385-390

CHANDRAMUKI A, Allen PRJ, Keen M, Ivanyi J. Detection of Mycobacterial Antigen and Antibodies in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Tuberculosis Meningitis. *J Med Microbiol* 1985; 20: 239-247

CHANDRAMUKI A, Bothamley GH, Brennan PJ, Ivanyi J. Levels of Antibody to Defined Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in Tuberculous Meningitis. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27: 821-825

CHANDRAMUKI A, Bothamley GH, Brennan PJ, Ivanyi J. Levels of antibody to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 1989; 27(5): 821-825

CHANDRASEKHAR S. Studies on cell wall deficient non-acid fast variants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis* 1992; 73: 273-279

CHAPARAS SD. Antigenic relationships among mycobacterial species studies by modified-rocket and crossed immunoelectrophoresis. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 934-943

CHAU PY, Wan KC, Ng WS, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibodies to purified protein derivative (PPD) in the diagnosis of active tuberculosis: evaluation of its potential and limitation in a high prevalence area. *Trop Geogr Med* 1987; 39: 228-232

CHIANG CS, Yeh SZ, Chang TL, Chiang CD. Detection of specific antibody to mycobacterial antigen 60 in tuberculous pleural effusion. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chilh Taipei* 1994; 53(4): 204-207

CHIANG IH, Suo J, Kuan-Jen B, et al. Serodiagnosis of Tuberculosis: A Study Comparing Three Specific Mycobacterial Antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 906-911



CHIERAKUL N, Damrongchokpipat P, Chaiprasert A, Ajratanakul W. Antibody detection for diagnosis of tuberculosis pleuritis. *Int Tuberc Lung Dis* 2001; 5(10): 968-972

CHO SN, Choi BW, Ra SY, et al. Prevalence of Antibodies to PPD and Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* among Patients with an Indication of Fine Needle Aspiration Biopsy. *Yonsei Medical Journal* 2001; 42(3): 324-332

CHO SN, Shin JS, Kim JD, Chong Y. Production of monoclonal antibodies to lipoarabinomannan-B and use in detection of mycobacterial antigens in sputum. *Yonsei Med J* 1990; 31(4): 333-338

COCITO C. Properties of the Mycobacterial Antigen Complex A60 and Its Applications to the Diagnosis and Prognosis of Tuberculosis. *CHEST* 1991; 100: 1687-1693

COLLINS FM, MONTALBINE V. Distribution of micobacteria grown in vivo in the organs of intravenously infected mice. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113: 281-286

COLLINS FM. Antituberculous Immunity: New Solutions to an Old Problem. *Reviews of Infectious Diseases* 1991; 13(5): 940-950

COSTELLO AM, Kumar A, Narayan V, Akbar MS, et al. Does antibody to mycobacterial antigens, including lipoarabinomannan, limit dissemination in childhood tuberculosis? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86(6): 686-692

DA COSTA CT, Khanolkar-Young S, Elliot AM, Wasunna KM, McAdam KP. Immunoglobulin G subclass responses to mycobacterial lipoarabinomannan in HIV-infected and non-infected with tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1993; 91(1): 25-29

DAFTARY VG, Banker DD, Daftary GV. The ELISA test for tuberculosis. *Indian J Med Sci* 1994; 48(2): 39-42

DALEINE G, Lagrange PH. Preliminary evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* lipooligosaccharide (LOS) antigen in the serological diagnosis of tuberculosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Tuber Lung Dis* 1995; 76(3): 234-239

DANIEL T. The immunology of tuberculosis. *Clin Chest Med* 1980; 1: 189-201

DANIEL TM, Anderson PA. The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physiochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117: 533-539

DANIEL TM, Debanne SM. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5 and PPD for the Serodiagnosis of Tuberculosis. *CHEST* 1985; 88(3): 388-392

DANIEL TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1137-1151

DANIEL TM, Ellner JJ. Immunology of tuberculosis. In: Lee BR, Earl SH, editors. *Tuberculosis. A comprehensive international approach. Lung biology in health and disease*, New York: Marcel Dekker: 1993

DANIEL TM, Murillo GL, Sawyer JÁ, et al. Field Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Serodiagnosis of Tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 662-665

DANIEL TM, Sara M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5 and PPD for the Serodiagnosis. *CHEST* 1985; 88: 388-392

DANIEL TM, Sippola AA, Okwera A, et al. Reduced sensitivity of tuberculosis serodiagnosis in patients with AIDS in Uganda. *Tuber Lung Dis* 1994; 75(1): 33-37

DANIEL TM. Rapid Diagnosis of Tuberculosis: Laboratory Techniques Applicable in Developing Countries. *Reviews of Infectious Diseases* 1989; 11(2): 471-478

DE COCK KM, Soro B, Coulibaly IM, Lucas SB. Tuberculosis and HIV infection in sub-Saharan África. *JAMA*, 1992; 268(12): 1581-1587

DELACOURT C, Gobin J, Gaillard JL, de Blic J, et al. Value of ELISA Using Antigen 60 for the Diagnosis of Tuberculosis in Children. *CHEST* 1993; 104: 393-398

DEQUEKER CA, Nigou J, Puzo G, Maridonneau-Parini I. Lipoarabinomannans Activate the Protein Tyrosine Kinase Hck in Human Neutrophils. *Infection and Immunity* 2000; 68(8): 4827-4830

DOLIN PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence e mortality during 1990-2000. *Bulletin of the World Health Organization* 1994; 72(2): 213-220

DUNDAR V, Baran R, et al. Diagnostic value of ELISA for determining the occurrence of antibodies to antigen A60 in active pulmonary tuberculosis. *Mikrobiyol Bul* 1992; 26(4): 320-328

DUNLAP NE, Briles DE. Immunology of tuberculosis. *Med Clin North Am* 1993; 77(6): 1235-1251

DURUPINAR B, Yanbeyi S, Leblebicioglu H, Gunaydin M. Importance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serologic diagnosis of tuberculosis. *Mikrobiyol Bul* 1992; 26(4): 338-343

EISENACH KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Samples Using a Polymerase Chain Reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1160-1163

ESCAMILLA L, Mancilla R, Glender W, López-Marín LM. *Mycobacterium fortuitum* Glycolipids for the serodiagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1864-1867

FADDA G, Grillo R, Ginesu F, Santoru L, Zanetti S, Dettori G. Serodiagnosis and follow up of patients with pulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Epidemiol* 1992; 8(1): 81-87

FALDT J, Dahlgren C, Ridell M, Karlsson A. Priming of human neutrophils by mycobacterial lipoarabinomannans: role of granule mobilization. *Microbes Infect* 2001; 3(13): 1101-1109

FENHALLS G, Wong A, Bezuidenhout J, van Helden P, Bardin P, Lukey PT. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granuloma. *Infect Immun* 2000; 68: 2827-2836

FERREIRA MM, Ferrazoli L, Palaci M, Salles PS, Medeiros LA, Novoa P, Kiefer CR, Schechtmann M, Kritski AL, Johson WD, Riley LW, Ferreira-Junior OC. Tuberculosis and HIV infection among female inmates in São Paulo, Brazil: a prospective cohort study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13(2): 177-183

FIETTA A, Francioli C, Grassi GG. Mycobacterial lipoarabinomannan affects human polymorphonuclear and mononuclear phagocyte functions differently. *Haematologica* 2000; 85: 11-18

FLYNN JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93-129

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

FREI R. Current methods in rapid diagnosis of tuberculosis. *Schweiz Med Wochenschr* 1993; 123(5): 147-152

FRENCH GL, Chan CY, Cheung SW, Oo KT. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of tuberculostearic acid in sputum using gas-chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *J Infect Dis* 1987; 156: 356-362

GEVAUDAN MJ, Bollet C, Charpin D, Mallet MN, De-Micco P. Serological response of tuberculosis patients to antigen 60 of BCG. *Eur J Epidemiol* 1992; 8(5): 666-676

GOOD RC. Serologic Methods for Diagnosing Tuberculosis. *Annals of Internal Medicine* 1989; 110: 97-98

GOODMAN PC. Mycobacterial disease in AIDS. *J Thorac Imaging* 1991; 6(4): 22-27

GOTTBERG AV, Sacks L, Machala S, Blumberg L. Utility of blood cultures and incidence of mycobacteremia in patients with suspected tuberculosis in a South African infectious disease referral hospital. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(1): 80-86

GRANGE JM, Laszlo A. Serodiagnostic tests for tuberculosis: a need for assessment of their operational predictive accuracy and acceptability. *Bull World Health Organ* 1990; 68(5): 571-576

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

GRANGE JM. The mystery of the micobacterial “persistor”. *Tuberc Lung Dis* 1992; 73: 249-251

GRANGE JM. The rapid diagnosis of paucibacillary tuberculosis. *Tubercle* 1989; 70: 1-4

GROSSET J. Bacteriological diagnosis of tuberculosis. *Rev Prat* 1996; 46(11): 1337-1343

GUPTA S, Bhatia R, Datta KK. Serodiagnosis of tuberculosis. *J Commun Dis* 1995; 27(4): 208-214

HAAS DW. Mycobacterial Diseases – Chapter 240: *Mycobacterium tuberculosis* Part III- Infectious Diseases and Their Etiologic Agents. Pgs: 2576-2607

HAMASUR B, Bruchfeld J, Haile M, Pawlowski A, Bjorvatn B, Kallenius G, Svenson SB. Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *J Microbiol Methods* 2001; 45(1): 41-52

HENN LA, Nagel F, Pizzol FD. Comparison between Human Immunodeficiency Virus Positive and Negative Patients with Tuberculosis in Southern Brazil. *Men Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(3): 377-381

HERMANS PWN, Schuitema ARJ, Soolingen DV, et al. Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 1204-1213

HERRERA T, Torres M, Sada E. Nuevos métodos em el diagnóstico de tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol* 1993; 13(1): 15-20

HIRSCH CS, Johnson JL, Ellner JJ. Pulmonary tuberculosis. *Current Opinion In Pulmonary Medicine* 1999; 5: 143-150

HONDA I, Kawajiri K, Watanabe M, et al. Evaluation of the use of 5-mycoloyl-beta-arabinofuranosyl-(1--2)-5-mycoloyl-alpha-arabinofuranosyl-(1--1')-glycerol in serodiagnosis of *Mycobacterium avium-intracelulare* complex infection. *Res Microbiol* 1993; 144(3): 229-235

HUSSEY G, Kibel M, Dempster W. The serodiagnosis of tuberculosis in children: an evaluation of an ELISA test using IgG antibodies to *M. tuberculosis*, strain H37Rv. *Ann Trop Paediatr* 1991; 11(2): 113-118

HWANG PH, Kim JS. PPD-specific IgG And IgG subclasses in the sera of pulmonary tuberculosis patients. *J Korean Med Sci* 1993; 8(1): 1-9



IMAZ MS, Comini MA, Zerbini E, Sequeira MD, Spoletti MJ, et al. Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM and IgA antibodies to the recombinant 16kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood tuberculosis. *Int Tuberc Lung Dis* 2001; 5(11): 1036-1043

JACKETT PS, Bothamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi. Specificity of Antibodies to Immunodominant Mycobacterial Antigens in Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1988; 26(11): 2313-2318

JANICKI BW, Good RC, Minden P, Affronti LF, Hymes WF. Immune responses in rhesus monkey after bacillus Calmette-Guerin vaccination and aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis* 1973; 107: 359-366

JONES BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 6-12

JUFFERMANS NP, Verbon A, Hill P, et al. Mycobacterial Lipoarabinomannan Induces an Inflammatory Response in the Mouse Lung- A Role for Interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 486-489

JULIAN E, Matas L, Ausina V, Luquin M. Detection of lipoarabinomannan antibodies in patients with newly acquired tuberculosis and patients with relapse tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35(10): 2663-2664

KADIVAL GV, Kameswaran M, Doshi R, Todiwala SS, Samuel AM. Detection of antibodies to defined *Mycobacterium tuberculosis* antigen (38kDa) in cerebrospinal fluids of patients with tuberculous meningitis. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1994; 281(1): 95-101

KAISER-SMITH J, Condoluci DV. *Mycobacterium tuberculosis* in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Am Osteopath Assoc* 1991; 91(4): 377-384

KALISH SB, Radin RC, Phair JP, Levitz D, Zeiss CR, Metzger E. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. *Infect Dis* 1983; 47: 523-530

KALISH SB, Radin RC, Phair JP, Leyitz D, Zeiss CR, Metzger E. Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique in the Differential Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis in Humans. *The Journal of Infectious Diseases* 1983; 147: 523-530

KASHIMA K, Oka S, Tabata A, Yasuda K, Kitano A, Kobayashi K, Yano I. Detection of anti-cord factor antibodies in intestinal tuberculosis for its differential diagnosis from Crohns's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40(12): 2630-2634

KATIAL RK, Hershey J, et al. Cell-Mediated Immune Response to Tuberculosis Antigens: Comparison of Skin Testing and Measurement of In Vitro Gamma Interferon Production in

Whole-Blood Culture. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001; 8(2): 339-345

KAUSHIK NK, Sharma P, Shah A, et al. Serodiagnostic efficiency of phospholipid associated protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Med Microbiol Immunol Berl* 1993; 182(6): 317-327

KHOMENKO AG, Bayensky AV, Chernousova LN, kulikovskaya NV, et al. Serodiagnosis of tuberculosis: detection of mycobacterial antibodies and antigens. *Tuber Lung Dis* 1996; 77(6): 510-515

KRASNOW I, Wayne L, Salkin D. A microcolonial test for the recognition of virulent mycobacteria. *Am Rev Tuberc* 1955; 71: 361-370

KRITSKI A, Barroso EW, de Souza RB, Andrade GN, Pena ML, Castilho EA, Galvao-Castro B. Tuberculosis and HIV in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS* 1991; 5(1): 107-108

KRITSKI A, Dalcomo M, del-Bianco R, del Melo FF, Pinto WP, Schechther M, Castelo A. Association of tuberculosis and HIV infection in Brazil. *Bol Oficina Sanit Panam* 1995; 118(6): 542-554

KRITSKI AL, Conde MB. IgA and IgG immune response against P-90 in pulmonary tuberculosis patients. *Anais do I Workshop de tuberculose – setembro 2002*

KRITSKI AL, Mello FCQ, Rosseti LR. Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a Polymerase Chain Reaction Colorimetric Dot-blot Assay. *Anais do I Workshop de tuberculose* – setembro 2002

KUMAR S, Chenthamarakshan V, Reddy MV, Narang P, Gupta OP, Harinath BC. Detection of tuberculosis IgG antibodies using *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, excretory secretory antigen and tuberculin-purified protein derivative. *Indian J Exp Biol* 1994; 32(3): 163-167

KUNIMOTO D, Chedore P, Allen R, Kasatiya S. Investigation of tuberculosis transmission in Canadian Arctic Inuit Communities using DNA fingerprinting. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(7): 642-647

KUSANO N. The serodiagnosis of tuberculosis by enzyme-linked immunosorbent assay with tuberculin purified protein derivative. *Kekkaku* 1990; 65(1): 42-47

LAAL S, Samanich KM, Sonnenberg MG, Belisle JT, et al. Surrogate Marker of Preclinical Tuberculosis in Human Immunodeficiency Virus Infection: Antibodies to an 88 kDa Secreted Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases* 1997; 176: 133-143

LADEL CH, Blum C, Dreher A, Reinfenberg K, Kopf M, Kaufmann SHE. Lethal tuberculosis in interleukin-6 deficient mutant mice. *Infect Immun* 1997; 65: 4843-4849

LADRON-DE-GUEVARA MC, Gonzales A, Ortega A, Saz JV. Serological diagnosis of pulmonary tuberculosis using ELISA and the A60 antigen. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10(1): 17-19

LALVANI A, Brookes R, Wilkinson R, Malin A, Pathan A, Andersen P, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 270-275

LALVANI A, Pathan AA, Mc Shane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163: 807-808

LAOCHUMROONVORAPONG P, Wang J, Liu CC, Ye W, Moreira AL, Elkon KB, et al. Perforin, a cytotoxic molecule which mediates cell necrosis, is not required for the early control of mycobacterial infection in mice. *Infect Immun* 1997; 65: 127-132

LASZLO A, Baer HH, Goren MB, et al. Evaluation of synthetic pseudo cord-factor-like glycolipids for the serodiagnosis of tuberculosis. *Res Microbiol* 1992; 143(2): 217-223

LAWN SD, Frimpong EH, Nyarko E. Evaluation of a commercial immunodiagnostic kit incorporating lipoarabinomannan in the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Ghana. *Trop Med Int Health* 1997; 2(10): 978-981

LEÃO SC, Lopes JD. Immunological and functional characterization of proteins of the *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 complex using synthetic peptides. *J Gen Microbiol* 1993; 139(7): 1543-1549

LEIN D, Reyn FV. In vitro cellular and cytokine responses to mycobacterial antigens: application to diagnosis of tuberculosis infection and assessment of response to mycobacterial vaccines. *Am J Med Sci* 1997; 313: 364-371

LI FT. Detection of serum antibody against lipoarabinomannan-B in Mycobacterial tuberculosis (H37Ra). *Chung Hua Chien Ho Ho Hu His Tsa Chih* 1990; 13(1): 36-38, 62-63

LITVINOV VI, Chernousova, LN, Kulikovskaia NV, kalinina AO, Baenskii AV, Dem'ianenko NV, Ketova NA, Sergeeva LV. Principles and methods of immunodiagnosis in tuberculosis. *Vest-Ross-Akad-Med-Nauk* 1995(7): 9-13

LOPEZ-CORTES LF, Nogales-Perez MC, Gomez MJ, et al. Antibodies to antigen A60 in cerebrospinal fluid from patients with tuberculous meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13(6): 490-495

LOWRIE DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VMF, Faccioli LH, Stavropoulos E, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; 400: 269-271

MA Y, Gao W, Zhao F. Detection of lipoarabinomannan-IgG in serum for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1996; 19(1): 41-43

MA Y, Mei Y, Daniel TM. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5 for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in China. *Am Rev Resp Dis* 1986; 134: 1273-1275

MAEKURA R, Nakagawa M, Nakamura Y, Hiraga T, et al. Clinical Evaluation of Rapid Serodiagnosis of Pulmonary Tuberculosis by ELISA with Cord Factor (Trehalose-6,6'-dimycolate) as Antigen Purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 997-1001

MAITI D, Bhattacharyya A, Basu J. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(1): 329-333

MATHEMA B, Bifani PJ, Driscoll J, Steinlein L, et al. Identification and Evaluation of an IS6110 Low-Copy-Number *Mycobacterium tuberculosis* Cluster. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185: 641-649

MAZZACCARO RJ, Gedde M, Jensen ER, van Santen HM, Ploegh HL, Rock KL, et al. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11786-11791

MC NEIL MR, Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of micobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance: some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol* 1991; 142: 451-463

MELLMAN I, Fuchs R, Helenius A. Acidification of the endocytic and the exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 1986; 55:663-700

MILBURN HJ. Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 133-141

MOODY DB, Ulrichs T, Muhlecker W, Young DC, Gurcha SS, Grant E, et al. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature* 2000; 404: 884-888

MOREIRA AL, Tsenova-Berkova L, Wang J, Laochumroonvorapong P, Freeman S, Freedman GK. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1997; 78: 47-55

MORISHITA M, Magaki K, Katoh H, Ikeda I, Oguri T, Ohshika H, Suzuki M, Kawaguchi H, Torii Y, Ina Y, et al. Recent advances in immunological diagnosis for tuberculosis. *Kekkaku* 1994; 69(2): 97-106

MURRAY JF. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection during the 1990's. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1991; 66(1): 21-25

NARAIN JP, Raviglione MC, Kochi A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. *Tuberc Lung Dis* 1004; 75(1): 80-82



NIGOU J, Gilleron M, Rojas M, Garcia LF, Thurnher M, Puzo G. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response.

*Microbes Infect* 2002; 4(9): 945-953

NIGOU J, Vercellone A, Puzo G. New structural insights into the molecular deciphering of mycobacterial lipoglycan binding to C-type lectins: lipoarabinomannan glycoform characterization and quantification by capillary electrophoresis at the subnanomole level. *J Mol Biol* 2000; 299(5): 1353-1362

NIGOU J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* 2001; 166(12): 7477-

7485

NOLAN CM. Failure of therapy for tuberculosis in human immunodeficiency virus infection. *Am J Med Sci* 1992; 304(3): 168-173

OELEMAN MAC, Kritski AL, Fontes Anb, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from outpatients attended in community health centers of Rio de Janeiro City. *Anais do I Workshop de tuberculose – setembro 2002*

ORME IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis.

*Immunol Today* 1999; 20: 307-312

ORME IM. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). *Int Tuberc Lung Dis* 2001; 5(7): 589-593

PANG JA, Chan HS, Chan CY, Cheung SW, French GL. A Tuberculostearic Acid Assay in the Diagnosis of Sputum Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis. *Annals of Internal Medicine* 1989; 111: 650-654

PAPA F, Cruaud P, Luquin N, et al. Isolation and characterization of serologically reactive lipooligosaccharides from *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 1993; 144(2): 91-99

PAPA F, Laszlo A, David HL, Daffe M. Serological specificity of *Mycobacterium tuberculosis* glycolipids. *Acta Leprol* 1989; 7(1): 98-101

PARK SC, Lee BI, Cho SN, Kim WJ, et al. Diagnosis of tuberculous meningitis by detection of immunoglobulin G antibodies to purified protein derivative and lipoarabinomannan antigen in cerebrospinal fluid. *Tuberc Lung Dis* 1993; 74(5): 317-322

PEREIRA ABLM, Nguyen LN, Ho LM, Kuijper S, Jansen HM, Kolk AH. Development of antigen assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6): 2278-2283

POUTHIER F, Perriens JH, Mukadi Y, Kayembe T, et al. Anti-A60 immunoglobulin G in serodiagnosis of tuberculosis in HIV-seropositive and seronegative patients. *AIDS* 1994; 8(9): 1277-1280

PRETE RD, Picca V, Mosca A, D'Alagni M, Miragliotta G. Detection of anti-lipoarabinomannan antibodies for the diagnosis of active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2(2): 160-163

QADRI SM, Smith KK. Nonespecificity of the Anda A60-tb ELISA test for serodiagnosis of mycobacterial disease. *Can J Microbiol* 1992; 38(8): 804-806

RADHAKRISHNAN VV, Mathai A, Sundaram P. Diagnostic significance of circulating immune complexes in patients with pulmonary tuberculosis. *J Med Microbiol* 1992; 36(2): 128-131

RADHAKRISHNAN VV, Mathai A, Sunderam B. Rapid serodiagnosis test for pulmonary tuberculosis. *Indian J Exp Biol* 1991; 29(5): 448-451

RADHAKRISHNAN VV, Mathai A, Thomas M. Evaluation of purified protein derivative in the laboratory diagnosis of tuberculosis meningitis. *J Assoc Physicians India* 1992; 40(1): 14-17

RADIN RC, Zeiss CR, Phair JP. Antibodies to purified protein derivative in different immunoglobulin classes in the diagnosis of tuberculosis in man. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983; 70: 25-29

RANDHAWA PS. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology* 1990; 22: 153-155

RATANASUWAN W, Kreiss JK, Nolan CM, et al. Evaluation of the MycoDot tm test for the diagnosis of tuberculosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1(3): 259-264

RHOADES ER, Ullrich HJ. How to establish a lasting relationship with your host: lessons learned from *Mycobacterium* spp. *Immunol Cell Biol* 2000; 78(4): 301-310

RIEDEL DD, Kaufmann SH. Differential tolerance induction by lipoarabinomannan and lipopolysaccharide in human macrophages. *Microbes Infect* 2000; 2(5): 463-471

RIVERA-MARRERO CA, Schuyler W, Roser S, Roman J. Induction of MMP-9 mediated gelatinolytic activity in human monocytic cells by cell wall components of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Pathog* 2000; 29(4): 231-244

ROJAS M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF. TNF- $\alpha$  and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol* 1999; 162: 6122-6131

ROJAS RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of human CD<sup>+</sup> alphabeta T-cell receptor-positive TCR(+) and gammadelta TCR(+) T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infect Immun* 1999; 67: 6461-6472

ROSE RM. Immunology of the lung in HIV infection: the pathophysiologic basis for the development of tuberculosis in the AIDS setting. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1991; 66(1): 15-20

SAAD MH, Kritski AL, Werneck-Barroso E, Cavalcante S, Ferreira MA, de Souza-Fonseca L. Use of the 2,3-diacyl-trehalose and the purified protein derivative in the serodiagnosis of tuberculosis in AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(1): 97-100

SAAD MH, Santana DB, Sardella IG, Fonseca LS, Carvalho JR, Conde MB. Immune response against the antigen MT-10 and LAM in pulmonary tuberculosis patients HIV negative. *Anais do I Workshop de tuberculose – setembro 2002*

SADA E, Aguilar D, Torres M, Herrera T. Detection of Lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31(10): 2836-2838

SADA E, Brennan P, Herrera T, Torres M. Evaluation of Lipoarabinomannan for the Serological Diagnosis of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28(12): 2587-2590

SALTINI C, Amicosante M, Li-Bianchi E, Paone G, et al. *Mycobacterium tuberculosis*. From the gene to the diagnosis. *Recenti Prog Med* 1992; 83(1): 38-45

SANCHEZ-MONTON T, Martín-Luengo F. Serodiagnosis in pulmonary tuberculosis. Clinical evaluation. *Enferm infecc Microbiol Clin* 1992; 10(5): 267-271

SAZ JV, Ladron-de-Guevara MC. IgG against A60 antigen and the tuberculin test in healthy individuals and tubercular patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10(8): 477-480

SCHLUGER NW, Kinney D, Harkin TJ, Rom WN. Clinical Utility of the Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. *CHEST* 1994; 105: 1116-1121

SCHLUGER NW, Rom WN. Current Approaches to the Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 264-267

SCHLUGER NW, Rom WN. The polimerase chain reaction in the diagnosis and evaluation of pulmonary infections. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 11-16

SCHLUGER NW, Rom WN. The Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis and Evaluation of Pulmonary Infections. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 11-16

SEGAL W. Comparative study of in vivo and in vitro grown of *Mycobacterium tuberculosis*, 4: Immunogenic differentiation *Proc Soc Exp Biol Med* 1965; 118: 214-218

SELWYN PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drugs users with human immunodeficiency virus infection. *New Engl J Med* 1989; 320: 545-550

SEMPERE M, Ariza M, Sanchez-Monton T, Rodriguez-Gonzales T, et al. Evaluation of *Mycobacterium fortuitum* acyltrehaloses in the serologic diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13(5): 292-296

SERBINA NV, Flynn JL. Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis* –infected mice. *Infect Immun* 1999; 67: 3980-3988

SHAFER RW, Goldberg R, Sierra M, Glatt AE. Frequency of *Mycobacterium tuberculosis* Bacteremia in Patients with Tuberculosis in an Area Endemic for AIDS. *Am Rev Respir Dis* 1989; 14: 1611-1613

SHIGENAGA T, Dannenberg AM, Lowrie DB, et al. Immune responses in tuberculosis: antibodies and CD4 CD8 lymphocytes with vascular adhesion molecules and cytokines cause a rapid antigen -specific cell infiltration at sites of bacillus Calmette-Guerin reinfection. *Immunology* 2001; 102(4): 466-479

SHINNICK TM, Vodkin MH, Williams JC. The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to *Escherichia coli* GroEL protein. *Infect Immun* 1988; 56: 446-451

SIDOBRE S, Nigou J, Puzo G, Riviere M. Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacterial. Critical role of the lipids for lectincarbohydrate recognition. *J Biol Chem* 2000; 275(4): 2415-2422

SINGH NB, Srivastava K, Malaviya B, Kandpal H, Srivastava A, Gupta HP. The 65kDa protein of *Mycobacterium habana* and its putative role in immunity against experimental tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 1995; 73(4): 372-376

SJÖBRING U, Mecklenburg M, Andersen AB, Miorner H. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 2200-2204

SNIDER D. The tuberculin skin test. *Am Rev Resp Dis* 1982; 125: 108-118

SOMI JR, O'Brien RJ, et al. Evaluation of the MycoDot tm test in patients with suspected tuberculosis in a field setting in Tanzania. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(3): 231-238

SRIVASTAVA L, Prasanna S, Srivastava VK. Diagnosis of tuberculous meningitis by ELISA test. *Indian J Med Res* 1994; 99: 8-12

STAVRI D, Niculescu D, Stravi H, et al. Humoral immune response in human pulmonary tuberculosis: antibodies against *Mycobacterial tuberculosis* polysaccharide, protein and glycolipid antigens. *Roum Arch Microbiol Immunol* 1993; 52(2): 109-119

STEELE B, Daniel TM. Evaluation of the potential role of serodiagnosis of tuberculosis in a clinic in Bolivia by decision analyses. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:713-716

STROHMEIER GR, Fenton MJ. Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes Infect* 1999; 1(9): 709-717



STYBLO K. The impact of HIV infection on the global epidemiology of tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1991; 66(1): 27-32

SUGITA M, Grant EP, van Donselaar E, Hsu VS, Rogers RA, Peters PJ, et al. Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules. *Immunity* 1999; 11: 743-752

TANDON A, Saxena RP, Saxena KC. Diagnostic Potentialities of Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Tuberculosis Using Purified Tuberculin Antigen. *Tubercle* 1980; 61: 87-89

TEMPLETON GL, Illing LA, Young L, Cave D, Stead WW, Bates JH. The risk for transmission of *Mycobacterium tuberculosis* at the bedside and during autopsy. *Ann Intern Med* 1995; 122(12): 922-925

TESSEMA TA, Hamasur B, Bjun G, Svenson S, Bjorvatn B. Diagnostic evaluation of urinary lipoarabinomannan at an Ethiopian tuberculosis center. *Scand J Infect Dis* 2001; 33(4): 279-284

TESSEMA TA, Hamasur BG, et al. Circulating antibodies to lipoarabinomannan in relation to sputum microscopy, clinical features and urinary anti-lipoarabinomannan detection in pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 2002; 34(2): 97-103

THOMPSON NJ, Glassroth JL, Snider DE Jr, Farer LS. The booster phenomenon in serial tuberculin testing. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119: 587-597

THONGKRAJAI P, Lulitanon V, Chamnanvanakit C. Improved ELISA with immunoabsorbent-purified mycobacterial antigen for serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol* 1989; 30(2): 101-104

TIDJANI O, Grunitzky B, Sadjo H, Guerin N. The prophylaxis of tuberculosis and vaccination with BCG: a recent study. *Ann Pediatr Paris* 1992; 39(2): 99-105

TOBIN M. Tuberculosis, Lung Infections, and Interstitial Lung Disease in AJRCCM 2000. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1774-1788

TORRES M, Diaz H, Herrera T, Sada E. Evaluation of Enzyme-linked Immunossorbent Assay and Western-blot for diagnosis of histoplasmosis. *Rev Invest Clin* 1993; 45(2): 155-160

TORTOLA MT, Laneelle MA, Martin-Casabona N. Comparison of two 2,3-diacyl trehalose antigens from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium fortuitum* for serology in tuberculosis patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3(5): 563-566

TSUBURA E, Yamanaka M, Sakatani M, Takashima T, Maekura R, Nakatani K. A cooperative clinical study on the evaluation of na antibody detection test kit (MycoDot Test) for mycobacterial infections. Cooperative Study Group for MycoDot Test. *Kekkaku* 1997; 72(11): 611-615

TURNEER M, Van Nerom E. Serological comparison of purified antigens 60 and 85A (P32) of *Mycobacterium bovis* BCG, and purified protein derivative, in active pulmonary tuberculosis. *Eur J Epidemiol* 1993; 9(5): 541-546

TURNEER M, Van-Nerom E, Nyabenda J, et al. Determination of humoral immunoglobulins M and G directed against mycobacterial antigen 60 failed to diagnose primary tuberculosis and mycobacterial adenitis in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1508-1512

TURNEER M, Vooren JPV, de Bruyn J, Serruys E, et al. Humoral immune Response in Human Tuberculosis: Immunoglobulins G, A and M Directed against the Purified P32 Protein Antigen of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin *J Clin Microbiol* 1988; 26(9): 1714-1719

UNDERHILL DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptors-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1459-1463

VAN EMBDEN JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409

VERBON A, Weverling GJ, Kuijper S et al. Evaluation of different tests for the serodiagnosis of tuberculosis and the use of likelihood ratios in serology. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148(2): 378-384

VILLEGAS MV, Labrada LA, Saravia NG. Evaluation of Polymerase Chain Reaction, Adenosine Deaminase, and Interferon-gamma in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. *CHEST* 2000; 118: 1355- 1364

WADEE AA, Boting L, Reddy SG. Antigen capture assay for detection of a 43-kilodalton *Mycobacterium tuberculosis* antigen. *J Clin Microbiol* 1990; 28(12): 2786-2791

WANG CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1998; 11: 809-815

WANG HC, Lu JY, Liang L, Liu HL. Evaluation of the potential role of enzyme-linked immunosorbent assay in serodiagnosis of tuberculosis. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih Taipei* 1993; 52(1): 9-14

WANG RC, Chiang CD, Chu JJ. Serodiagnosis of tuberculosis by an enzyme-linked immunosorbent assay using mycobacterial antigen 60 . *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih Taipei* 1992; 50(1): 14-18

WAYNE LJ. Dynamics of submerged growth of *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and microaerophilic conditions. *Am Rev Resp Dis* 1976; 114: 807-811

WEBSTER CT, Gordin FM, Matts JP, Korvick JA, Miller C, et al. Two-stage tuberculin skin testing in individuals with human immunodeficiency virus infection. Community Programs for Clinical Research on AIDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 805-808

WILKINS EGL, Ivanyi J. Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet* 1990; 336: 641-644

WU CH, Fann MC, Lau YJ. Detection of Mycobacterial Antigens in Cerebrospinal Fluid by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Tubercle* 1989; 70: 37-43

XAVIER RG. Tuberculose em portadores de HIV/AIDS: Diagnóstico e acompanhamento ao Lavado Broncoalveolar e à autopsia. [tese]. Porto Alegre, UFRGS, 1999.

YOLKEN RH. Enzyme Immonoassays for the Detection of Infectious Antigens in Body Fluids Current Limitations and Future Prospects. *Reviews of Infectious Disease* 1982; 4(1): 35-68

YOSHIDA N. Role of gamma/delta T cells in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Kurume Med J* 2001; 48: 175-181

YOSHIKAWA M, Yoneda T, et al. Diagnosis of mycobacterial disease by biochemical and immunological parameters. *Nippon Rinsho* 1998; 56(12): 3057-3061

YOUmans GP, ed. *Tuberculosis*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1979

YOUNG DB, Mehlert A. Serology of Mycobacterial: Characterization of Antigens Recognized by Monoclonal Antibodies. *Reviews of Infectious Diseases* 1989; 11: S431-S435

YU CJ, Yang PC et al. Evaluation of the A60 IgG ELISA serodiagnostic test for tuberculosis in Taiwán. *J Formos Med Assoc* 1992; 91(6): 614-619

ZANG JD, Chen MH, Yang SQ. The clinical significance of anti-BCG-A60 antibody by ELISA in diagnosis of tuberculosis. *Chung Hua Chien Ho Ho Hu His Tsa Chih* 1994; 17(3): 175-178, 191-192

ZEISS CR, Kalish SB, Erlich KS, et al. IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 845-848

ZEISS CR, Radin RC, Williams JE, Levitz D, Phair JP. Detection of Immunoglobulin G Antibody to Purified Protein Derivative in Patients with Tuberculosis by Radioimmunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol* 1982; 15(1): 93-96

ZHANG Y, Broser M, Cohen H, Bodkin M, Law K, Reibman J, Rom WN. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J Clin Invest* 1995; 95(2): 586-592

**ANEXOS – FIGURAS**

Figura 1 – página 10

Figura 2 – página 17

Figura 3 – página 55

**Figura 4 – página 55**

Figura 5 – página 57

Figura 6 – página 64

Figura 7 – página 64

Figura 8 – página 65

Figura 9 – página 65

Figura 10 – página 66

Figura 11- página 67

Figura 12 – página 69

Figura 13 – página 70

Figura 14 – página 72

Figura 15 – página 73

Figura 16– página 74

Figura 17 – página 75

Figura 18 – página 76

Figura 19 – página 77

Figura 20 – página 78

Figura 21 – página 79

Figura 22 – página 80

Figura 23 – página 81

Figura 24 – página 82

Figura 25 – página 84

Figura 26 – página 85

Figura 27 – página 86

Figura 28 – página 87

Figura 29 – página 88

Figura 30 – página 89

Figura 31 – página 90

Tabela 1 – página 62

Tabela 2 – página 62

Tabela 3 – página 92



**Resultados****Antígeno LAM**

Pacientes	Prontuário	Sexo	Idade	Cor	Forma	Extrapulmonar
AA	,	MASCULINO		48 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
AAGR	,	MASCULINO		40 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
AAMN	6111207	MASCULINO		41 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Urinario
ABB	,	MASCULINO		44 MISTO	PULMONAR +	NÃO
ABM	6764302	MASCULINO		62 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Ossea
ACMS	6214670	MASCULINO		22 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
AD	,	MASCULINO		38 PRETO	PULMONAR +	NÃO
AFD	5133590	MASCULINO		56 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
AFG	6344550	MASCULINO		48 BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Ossea
AFP	4029708	FEMININO		25 PRETO	EXTRAPULMONAR	Ossea
AG	4797312	MASCULINO		28 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
AJR	,	MASCULINO		45 MISTO	PULMONAR +	NÃO
ALS	,	MASCULINO		70 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
AM	2676427	FEMININO		33 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
AMG	5644463	MASCULINO		53 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
AMPS	5679725	FEMININO		25 PRETO	PULMONAR +	NÃO
AMS	381448	FEMININO		44 MISTO	EXTRAPULMONAR	Pleural
ANL	7064546	MASCULINO		25 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
ARA	7706955	MASCULINO		61 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
ARCF	6438220	MASCULINO		34 BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Pulm+Intestin

**Resultados****Antígeno LAM**

				al
ARR	3176971 MASCULINO	34 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
AS	6439897 MASCULINO	33 BRANCO	EXTRAPULMONAR	SNC
AT	7734726 FEMININO	74 BRANCO	PULMONAR -	NÃO
ATBC	6288182 FEMININO	39 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar+Ganglionar
ATBS	6288187 FEMININO	39 PRETO	EXTRAPULMONAR	Ganglionar
BFH	657491 FEMININO	32 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Peritônio+Pericardica
BFHS	649491 FEMININO	31 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
CAFM	MASCULINO	24 PRETO	PULMONAR +	NÃO
CAGG	MASCULINO	26 PRETO	PULMONAR +	NÃO
CAJP	MASCULINO	33 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
CAS	6502207 MASCULINO	29 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Ganglionar+SNC
CASR	MASCULINO	29 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Ganglionar
CBA	6790992 FEMININO	35 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
CDD	MASCULINO	26 MISTO	PULMONAR -	NÃO
CFPN	6206320 FEMININO	4 BRANCO	EXTRAPULMONAR	SNC
CFS	6309876 FEMININO	BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Miliar
CHM	MASCULINO	32 PRETO	PULMONAR +	NÃO
CJM	6727820 MASCULINO	30 BRANCO	PULMONAR +	Miliar+SNC
CRS	MASCULINO	34 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
CRS	6964423 MASCULINO	23 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
CS	MASCULINO	34 BRANCO	PULMONAR +	NÃO

**Resultados****Antígeno LAM**

CSL	6307888	MASCULINO	47	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Intestinal
CV	,	MASCULINO	62	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
DCS	,	MASCULINO	48	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
DJR	5779400	FEMININO	40	BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Miliar
DL	794818	MASCULINO	68	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural
DLS	,	MASCULINO	68	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural
DR	4587218	MASCULINO	88	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
EAA	,	MASCULINO	34	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
EAB	370718	MASCULINO	60	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
EF	,	MASCULINO	69	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
EGS	945634	FEMININO	71	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
EJP	5060280	MASCULINO	24	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Intestinal
EJP	,	MASCULINO	34	PRETO	PULMONAR +	NÃO
EJPS	,	MASCULINO	25	PRETO	EXTRAPULMONAR	Peritoneal+Esplenica
EK	5606108	FEMININO	82	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
ELG	,	MASCULINO	39	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
EMC	5139449	MASCULINO	54	BRANCO	EXTRAPULMONAR	SNC
EOS	6622864	MASCULINO	38	BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Ganglionar
EP	86140	MASCULINO	55	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pericardio
EPO	370729	MASCULINO	62	BRANCO	PULMONAR +	NÃO

**Resultados****Antígeno LAM**

ERM	7597826	MASCULINO	68 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
ERS	7047392	MASCULINO	65 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
ESB	,	MASCULINO	67 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
ESM	,	MASCULINO	50 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
EVM	6388231	MASCULINO	55 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural+Pericardio
FC	6344014	MASCULINO	37 BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Pleural
FJT	3914926	MASCULINO	68 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
FS	6759369	MASCULINO	60 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
FVA	,	MASCULINO	35 PRETO	PULMONAR +	NÃO
GA	884270	MASCULINO	34 BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Miliar+SNC
GCN	,	MASCULINO	51 MISTO	PULMONAR +	NÃO
GCS	,	MASCULINO	31 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
GFSO	4403143	MASCULINO	27 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar+Ganglionar
GG	6529002	MASCULINO	56 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
GG	2745560	FEMININO	21 PRETO	EXTRAPULMONAR	Ganglionar
GLCS	773113	MASCULINO	33 BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Miliar+SNC
GRF	6386668	MASCULINO	47 PRETO	EXTRAPULMONAR	Miliar
GS	6741292	FEMININO	28 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Peritoneal
GSF	6682355	MASCULINO	24 BRANCO	EXTRAPULMONAR	SNC
GTD	,	FEMININO	30 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Ganglionar
HFPF	6841902	MASCULINO	24 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleura+LCR

**Resultados****Antígeno LAM**

HFPR	6501852 FEMININO	29 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Peritoneal
HPF	6841902 MASCULINO	24 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
IAR	6726814 FEMININO	33 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Peritoneal
ICA	627615 FEMININO	24 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural
IP	5291976 FEMININO	29 MISTO	PULMONAR +	NÃO
JAK	6483424 MASCULINO	42 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
JBD	, MASCULINO	54 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
JBS	, MASCULINO	54 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
JCLC	, MASCULINO	40 PRETO	PULMONAR +	NÃO
JCR	, MASCULINO	46 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
JCTM	6440325 MASCULINO	32 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Peritoneal
JFLS	6632848 MASCULINO	75 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
JFO	6664346 MASCULINO	38 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Peritoneal
JFR	6863930 FEMININO	21 MISTO	PULM+EXTRAPULM	Ocular+Pulmonar
JL	773055 MASCULINO	38 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural
JLS	6754931 MASCULINO	27 PRETO	PULM+EXTRAPULM	Intestinal
JMD	6370753 MASCULINO	63 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
JMJ	6286694 MASCULINO	31 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural
JR	4744249 MASCULINO	56 MISTO	PULMONAR +	NÃO
JRLD	7355221 MASCULINO	41 PRETO	EXTRAPULMONAR	Miliar

**Resultados****Antígeno LAM**

JRLD	6355218	MASCULINO	43	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
JRP	,	MASCULINO	52	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
JRSI	,	MASCULINO	45	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
JXS	6755490	MASCULINO	42	PRETO	PULMONAR +	NÃO
LAS	6192801	MASCULINO	18	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Ganglionar+Intestinal
LAS	6752828	MASCULINO	34	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural
LCBM	,	MASCULINO	23	MISTO	EXTRAPULMONAR	Ganglionar
LCMA	6824049	MASCULINO	50	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural
LCRN	,	MASCULINO	30	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
LF	,	MASCULINO	29	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
LF	,	MASCULINO	28	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
LLS	6289235	MASCULINO	22	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
LR	7035405	FEMININO	26	MISTO	PULMONAR +	NÃO
LR	4195407	FEMININO	26	BRANCO	PULMONAR -	NÃO
LRSA	649421	MASCULINO	18	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
LSF	,	FEMININO	22	BRANCO	EXTRAPULMONAR	SNC
LSJ	,	FEMININO	22	MISTO	PULMONAR +	NÃO
LVFB	7110448	FEMININO	27	BRANCO	PULM+EXTRAPULM	SNC
MAA	133432	MASCULINO	45	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
MBV	658762	FEMININO	,	PRETO	EXTRAPULMONAR	Pleural
MCC	,	MASCULINO	42	BRANCO	PULMONAR +	NÃO

**Resultados****Antígeno LAM**

MCG	,	FEMININO	17 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
MDM		6235535 FEMININO	30 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
MFS		7743644 FEMININO	67 PRETO	EXTRAPULMONAR	Pleural
MGR	,	MASCULINO	31 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
MHS	,	FEMININO	24 MISTO	PULMONAR +	NÃO
MHS		706244 FEMININO	21 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
MHSA	,	FEMININO	66 BRANCO	PULMONAR -	NÃO
MIBS		5159991 FEMININO	40 PRETO	EXTRAPULMONAR	Pleura +Intestinal
MMS		6531255 FEMININO	73 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
MNM		6352298 FEMININO	53 MISTO	EXTRAPULMONAR	Genital
MOR		6893200 MASCULINO	23 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
MRSK	,	FEMININO	24 PRETO	PULMONAR +	NÃO
MSC		7029663 FEMININO	42 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
MSF		5304084 MASCULINO	60 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
MSF	,	FEMININO	BRANCO	PULMONAR -	NÃO
MSFR		6704084 MASCULINO	59 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
NFM		6032239 MASCULINO	22 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural
NJM		6740249 MASCULINO	43 BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Ganglionar
NMLPR	,	FEMININO	43 MISTO	PULMONAR +	NÃO
NMM		67516 MASCULINO	50 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Intestinal
NPP	,	FEMININO	28 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
NRF	,	FEMININO	44 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Urinario

**Resultados****Antígeno LAM**

NRM	26765 FEMININO	26 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
NS	4512760 FEMININO	40 PRETO	PULM+EXTRAPULM	Miliar
NVS	MASCULINO	37 MISTO	PULMONAR +	NÃO
PAMR	6518443 MASCULINO	36 PRETO	EXTRAPULMONAR	Ossea
PIV	MASCULINO	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural
PJPN	6663751 FEMININO	30 MISTO	EXTRAPULMONAR	Intestinal
PRMS	MASCULINO	PRETO	EXTRAPULMONAR	Miliar
PRMS	587968 MASCULINO	43 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar+Hepática
PRO	568169 FEMININO	50 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Urinario
RACJ	MASCULINO	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
RASF	MASCULINO	BRANCO	PULM+EXTRAPULM	Pleural
RC	6502546 MASCULINO	MISTO	EXTRAPULMONAR	Miliar
RD	FEMININO	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
RDA	6987374 MASCULINO	47 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
RF	6810758 FEMININO	39 PRETO	EXTRAPULMONAR	Miliar
RM	MASCULINO	35 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Ganglionar
RSF	6470991 MASCULINO	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
RV	6650055 FEMININO	32 MISTO	EXTRAPULMONAR	Pleural
SHAR	3404852 FEMININO	44 BRANCO	PULMONAR -	NÃO
SLSA	6849327 FEMININO	23 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Pleural



**Resultados****Antígeno LAM**

SR	6776009 FEMININO	33 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Miliar
SRM	, FEMININO ,	BRANCO	PULMONAR -	NÃO
SRR	6732127 FEMININO	34 BRANCO	EXTRAPULMONAR	Ganglionar
SVR	, MASCULINO ,	BRANCO	EXTRAPULMONAR	Renal+Intestinal
TSB	2654200 MASCULINO ,	BRANCO	PULMONAR +	NÃO
TTS	7170319 FEMININO	35 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
UVH	, MASCULINO	35 BRANCO	PULMONAR +	NÃO
ZFB	4509253 FEMININO	37 BRANCO	EXTRAPULMONAR	SNC

Pacientes	Sexo	Idade	Cor	Doença/BCG	Mantoux
VDB	MASCULINO	,		Sem doença	
VDB	MASCULINO	,		Sem BCG, sem doença	
TSB	MASCULINO	,		Sem doença	
SMC	FEMININO	,		Sequela de TBC	
s/i		,		Sem doença	
s/i		,		Sem doença	
s/i		,		Sem doença	
s/i		,		Sem doença	
RSS	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
RSS	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
RP	MASCULINO	,		Sem doença	
RP	MASCULINO	,		Com BCG, sem doença	
RCCF	MASCULINO	,		Sem doença	
RCCF	MASCULINO		32	Pneumocistose	
RAP	MASCULINO	,		Sem doença	
PRMS	MASCULINO		39 BRANCO	HIV + Hepatite	Não realizado
PJP	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
NMVL	MASCULINO	,		Sem doença	
NMVL	MASCULINO	,		Sem BCG, sem doença	
NJMS	MASCULINO	,		Sem doença	
MVO	FEMININO	,		Sem doença	
MN	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
MLSF	FEMININO	,		Sequela de TBC	
MLN	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
MBV	FEMININO	,		Sem doença	
MAA	FEMININO	,		Sem doença	
LSL	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
LSAS	MASCULINO	,		Sem doença	
LLAS	MASCULINO	,		Sem BCG, sem doença	
LFS	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
LCNG	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
LCNG	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
JPM	FEMININO	,		Sem doença	
JPM	FEMININO	,		Com BCG, sem doença	
JOCP	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
JMQ	MASCULINO	,		Sem BCG, sem doença	
JMD	MASCULINO	,		Sem doença	
JLP	MASCULINO	,		Sem doença	
JGS	FEMININO		24 BRANCO	Linfoma	
JEQ	MASCULINO	,		Sem doença	
JD	MASCULINO	,		Sem doença	
JCO	MASCULINO	,		Sem doença	
JC	MASCULINO	,		Sequela de TBC	
ILK	FEMININO	,		Sem doença	
ILC	FEMININO	,		Sem doença	
IAO	FEMININO	,		Sequela de TBC	
HVC	MASCULINO		19	Pneumotórax	
HC	MASCULINO	,		Sem doença	
GSC	FEMININO	,		Sem doença	

**Resultados****Antígeno LAM**

FMB	FEMININO	,		Sem doença
FBS	FEMININO	,		Sem doença
FBS	FEMININO	,		Com BCG, sem doença
FB	FEMININO	,		Com BCG, sem doença
EAM	MASCULINO	,	19	Bronquiectasias
EA	MASCULINO	,		Sem doença
DH	FEMININO	,		Sem doença
CRS	MASCULINO	,		Sem doença
CNS	MASCULINO	,		Sequela de TBC
CMTG	FEMININO	,		Sem doença
CMTG	FEMININO	,		Sem BCG, sem doença
CES	MASCULINO	,		Sem doença
CES	MASCULINO	,	36	Cancer Pulm
C	FEMININO	,		Sem doença
ASU	MASCULINO	,		Sem doença
ASP	MASCULINO	,		Sem doença
ASP	MASCULINO	,		Com BCG, sem doença
AS	MASCULINO	,		Sem doença
AS	MASCULINO	,		Sem BCG, sem doença
APS	FEMININO	,		Sem doença
APC	FEMININO	,		Com BCG, sem doença
AML	FEMININO	,	78 BRANCO	Sem doença
ALS	MASCULINO	,		Sem doença
AGF	FEMININO	,		Sequela de TBC
AFN	MASCULINO	,		Sem doença
AFN	MASCULINO	,	69	Cancer Pulm
ABS	MASCULINO	,		Sem doença
ABS	MASCULINO	,	63	DPOC