

# Artigo de Revisão

## Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso\*

Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success

Henrique Couto Teixeira<sup>1</sup>, Clarice Abramo<sup>2</sup>, Martin Emilio Munk<sup>3</sup>

### Resumo

A tuberculose continua sendo um grave problema social e de saúde, afetando milhões de pessoas anualmente. A vacina Bacille Calmette-Guerin (BCG), usada no controle profilático, é incapaz de conter a progressão da doença, que usualmente se manifesta através da queda da imunidade celular do indivíduo. O diagnóstico da tuberculose em seus estágios iniciais, aliado à poliquimioterapia, pode contribuir para o controle da disseminação da infecção. Os atuais métodos de diagnóstico apresentam problemas, como: baixa sensibilidade da baciloscopia; longo tempo de realização das culturas microbiológicas; e baixa especificidade do teste cutâneo com o derivado protéico purificado do *Mycobacterium tuberculosis*. Novos métodos de diagnóstico que utilizam antígenos específicos (por exemplo, os conhecidos em inglês como o early secreted antigenic target 6-kDa e o culture filtrate protein 10-kDa), estão sendo testados. Os genes que codificam esses antígenos estão localizados na região de diferença 1 do *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. bovis*, mas estão ausentes no *M. bovis* (BCG) e na maioria das micobactérias do meio ambiente. Métodos de diagnóstico baseados na produção de interferon-gama por linfócitos T, em resposta a esses antígenos, como o QuantiFERON-TB® e o T SPOT.TB®, estão sendo testados, e superam o teste cutâneo com o derivado protéico purificado nas seguintes características: maior sensibilidade; menor reatividade cruzada devido à vacinação com o BCG ou infecção por micobactérias do meio ambiente; e tempo de execução. A introdução de métodos de diagnóstico mais específicos e sensíveis, assim como um maior entendimento dos mecanismos moleculares e celulares que regulam a interação parasito-hospedeiro, pode contribuir para um eficiente combate à tuberculose.

**Descritores:** Tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; Diagnóstico; Antígenos de bactérias; Proteínas de bactérias; Imunidade.

### Abstract

Tuberculosis remains a serious social and public health problem, affecting millions of people annually. The bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccine, used prophylactically, does not impede the progression of the disease, which usually manifests as decreased cellular immunity. Early diagnosis, together with polychemotherapy, can control the dissemination of the tuberculosis infection. The current diagnostic methods present certain problems. Such problems include the low sensitivity of sputum smear microscopy, the fact that performing microbiological cultures is quite time-consuming, and the low specificity of the skin test with the purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. New diagnostic methods, which use specific antigens such as the early secreted antigenic target 6-kDa and culture filtrate protein 10-kDa, are being evaluated. The genes that encode these antigens are located in the DNA region of difference 1 of *M. tuberculosis*, *M. africanum* and *M. bovis*. However, they are absent from the *M. bovis* (BCG) and from most environmental mycobacteria. Diagnostic methods such as QuantiFERON-TB® and T SPOT.TB®, which are based on the production of interferon-gamma by T lymphocytes, in response to those antigens, are being tested and have been found to outstrip the purified protein derivative skin test in the following characteristics: greater sensitivity; lower cross-reactivity due to BCG vaccination or infection with environmental mycobacteria; and execution time. The introduction of diagnostic methods that are more specific and sensitive, together with gaining a better understanding of the molecular and cellular mechanisms that regulate the parasite-host interaction, can increase the efficiency of strategies devised to combat tuberculosis.

**Keywords:** Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; Diagnosis; Antigens, bacterial/ESAT-6 protein; Immunity.

\* Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG) Brasil, e no Departamento de Investigações Preclínicas, Genmab A/S, Copenhague, Dinamarca.

1. Professor Associado em Imunologia. Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG) Brasil.

2. Professora Adjunta em Parasitologia. Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG) Brasil.

3. Doutor em Medicina pela Universidade de Ulm, Alemanha.

Endereço para correspondência: Dr. Martin Emilio Munk. Genmab A/S, Toldbodgade 59B, 1253, Copenhague, Dinamarca.

Tel. 00 45 2540-3016. E-mail: mmu@genmab.com

Recebido para publicação em 1/9/2006. Aprovado, após revisão, em 25/10/2006.

## A tuberculose como problema mundial

O *Mycobacterium tuberculosis* é responsável pela tuberculose (TB), uma doença que acomete, anualmente, 8 a 9 milhões de pessoas no mundo, sendo responsável por cerca de 2 a 3 milhões de mortes a cada ano. Índia, China, Indonésia, Bangladesh e Paquistão, os países mais populosos da Ásia, apresentam as maiores incidências da doença e, juntos, contribuem com mais da metade do total global de casos. No Brasil, o número de casos novos está próximo dos 100.000/ano.<sup>(1,2)</sup> Estima-se que a forma latente da TB acometa cerca de um terço da humanidade. Indivíduos com TB latente representam um grande reservatório de *M. tuberculosis*, embora os microorganismos, nesta fase da infecção, se mostrem metabolicamente inativos, o que está associado à ausência de manifestações clínicas nesses indivíduos infectados.<sup>(3,4)</sup> O aumento na incidência de TB, a partir de 1990, tem sido relacionado ao aparecimento da epidemia de AIDS, contribuindo, também, para isso o surgimento das cepas multidroga-resistentes.<sup>(1-3)</sup> A característica principal da infecção pelo HIV é a progressiva destruição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que possuem uma função crucial na resposta imune ao *M. tuberculosis* e no diagnóstico imunológico da TB.

A história natural da TB mostra que a maioria dos indivíduos é resistente à infecção, provavelmente devido à capacidade de gerarem uma eficiente resposta imune contra o *M. tuberculosis*, porém incapaz de esterilizar completamente a lesão. Das pessoas expostas ao *M. tuberculosis*, entre 10-30% se tornam infectadas, e em apenas 5 a 10% destes indivíduos a infecção progride, transformando-se em TB ativa. Conseqüentemente, a TB pode ser disseminada ou localizada, sob a forma pulmonar, ganglionar, renal, óssea, ou acometer qualquer outro órgão.<sup>(3)</sup>

Em indivíduos imunocompetentes suscetíveis, a doença envolve exclusivamente o pulmão em 85% dos casos. Nesses indivíduos, a infecção pelo *M. tuberculosis* não está associada a uma maior susceptibilidade a outros agentes infecciosos. Entretanto, muitos pacientes podem apresentar um estado de imunodepressão frente a antígenos específicos do *Mycobacterium*, o que pode favorecer o crescimento acelerado dos bacilos e o estabelecimento da doença. Nos indivíduos imunocomprometidos, como aqueles infectados com HIV,

a TB pode, freqüentemente, tornar-se uma doença disseminada, havendo maior freqüência de localizações extra-pulmonares.

## Resposta imune contra o *M. tuberculosis*

A TB é basicamente uma doença pulmonar, sendo esse órgão a porta de entrada do microorganismo e local principal de manifestação da infecção. Momentos após uma infecção primária, por meio de partículas aéreas, macrófagos alveolares e células dendríticas, que fagocitaram o *M. tuberculosis*, migram através do sistema linfático em direção ao linfonodo regional, e formam o complexo de Ghon. Ao mesmo tempo, as células fagocíticas podem penetrar no parênquima pulmonar, iniciando um foco inflamatório para onde outros macrófagos serão atraídos. Nesse caso, o acúmulo de células inflamatórias ao redor do microorganismo inicia a formação de um granuloma, coordenado por linfócitos T. As células T se tornam indispensáveis para a formação de granulomas estáveis, ficando em contato com fagócitos mononucleares e influenciando seu estado de diferenciação e ativação. O *M. tuberculosis* é contido no granuloma, podendo persistir por décadas nas lesões, em uma forma latente, sem desencadear a doença. A imunodepressão, seja devido ao precário estado de saúde do indivíduo, infecção pelo HIV, ou uso de drogas imunossupressoras, é a causa mais freqüente da multiplicação de bacilos enclausurados no granuloma e reativação da TB (reativação endógena), comparada à reinfeção (exógena) pelo *M. tuberculosis*.<sup>(2,4)</sup>

Macrófagos residentes no tecido compõem uma das primeiras barreiras de defesa frente à micobactéria. Após ser fagocitado, o bacilo permanece no interior do fagossomo. A partir da fusão do fagossomo e do lisossomo, antígenos podem ser processados, e posteriormente apresentados aos linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>), T helpers (Th) em inglês, através do complexo principal de histocompatibilidade, também conhecido em inglês como major histocompatibility complex (MHC), de classe II, presente apenas em macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (também denominados células apresentadoras de antígenos). Células CD4<sup>+</sup> do tipo 1 (Th1) desempenham a função principal na resposta imune à micobactéria.<sup>(3)</sup> Contudo, células T-citotóxicas (CD8<sup>+</sup>), que reconhecem antígenos oriundos do citoplasma (tumoriais ou

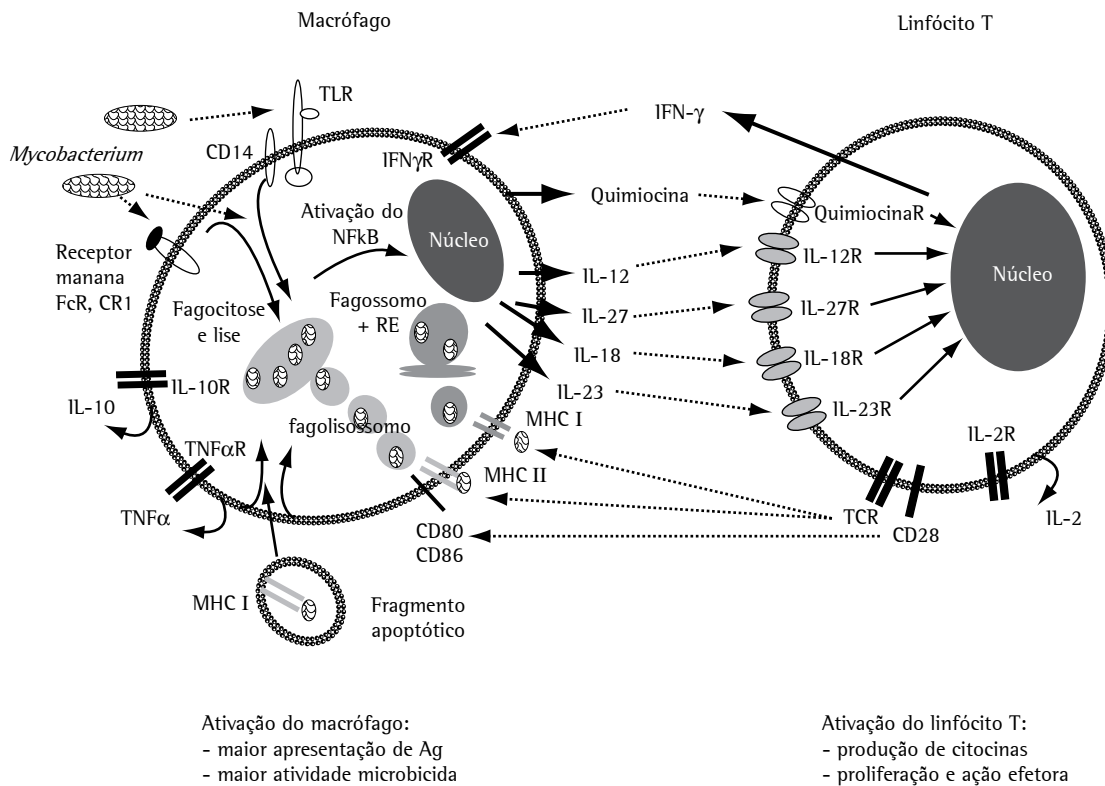
virais), também participam da resposta imune ao *M. tuberculosis*.<sup>(3)</sup> Células T CD8<sup>+</sup> são capazes de reconhecer fragmentos peptídicos ligados ao MHC classe I, moléculas expressas em praticamente todas as células diferenciadas ou maduras do organismo. No caso da micobactéria, foi demonstrado que vesículas apoptóticas, oriundas de células infectadas e contendo antígenos do bacilo associados ao MHC classe I, são capazes de estimular, especificamente, células T CD8<sup>+</sup>.<sup>(5)</sup> Alternativamente, em um fenômeno denominado apresentação cruzada, antígenos de patógenos intracelulares podem ter acesso direto à apresentação via MHC classe I, graças à capacidade dos fagossomos de se fundirem com o retículo endoplasmático, e do recrutamento de proteínas do retículo endoplasmático para o fagossomo. Desta forma, antígenos fagocitados podem ter acesso ao citoplasma, sofrer degradação por proteases, denominadas proteossomas, retornar ao fagossomo através de transportadores associados ao processamento de antígenos (TAP), e se ligar a moléculas do MHC classe I situadas no fagossomo, levando à posterior expressão na superfície celular e ao reconhecimento pelas células CD8<sup>+</sup>.<sup>(6,7)</sup>

Os linfócitos não convencionais (CD4<sup>-</sup> e CD8<sup>-</sup>), possuidores de receptores contendo as cadeias polipeptídicas gama/delta, reconhecem componentes fosfóricos do *M. tuberculosis*,<sup>(8)</sup> independente do MHC classe I ou II, enquanto que receptores de linfócitos T, restritos apenas ao CD1, podem ser estimulados por glicolipídios derivados da parede da micobactéria.<sup>(9)</sup> Portanto, o sistema imune é capaz de reconhecer e responder efetivamente contra um amplo espectro de determinantes antigênicos de características bioquímicas diferentes. Neste reconhecimento, existe uma hierarquia entre as subpopulações de células T que contribuem na resposta imune à micobactéria, sendo os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> os de maior importância nessa hierarquia.<sup>(10,11)</sup>

Com relação à resposta imune inata, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a localizar-se no sítio de multiplicação do bacilo, seguidas das células destruidoras naturais, células natural killer (NK) em inglês, e macrófagos. As células NK podem destruir os patógenos diretamente, ou os monócitos infectados, e ativar células fagocíticas no sítio da infecção.<sup>(3)</sup> Entretanto, foi demonstrado que camundongos depletados de células NK1.1 não apresentam maior susceptibilidade à infecção

por micobactérias.<sup>(12)</sup> O reconhecimento e a fagocitose de bactérias por células da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) se dão via receptores de reconhecimento, como o receptor para manose, receptores para a porção Fc de anticorpos (FcRs), e receptores para produtos de ativação do sistema complemento, como o C3b e C4b (CR1), entre outros.<sup>(3)</sup> A ativação de receptores de reconhecimento padrão, como os receptores do tipo Toll (Toll-like Receptors, TLRs, em inglês), conduz a uma importante ligação entre a resposta imune inata e a adquirida. A expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86, na superfície de macrófagos e células dendríticas, é induzida após o reconhecimento pelos TLRs de moléculas específicas dos patógenos, como lipoarabinomananas, lipoproteínas e outros derivados lipídicos do *M. tuberculosis*.<sup>(13,14)</sup> A ativação dos linfócitos CD4<sup>+</sup> envolve o reconhecimento do peptídeo ligado ao MHC de classe II e a interação entre moléculas co-estimuladoras, como a interação CD80/CD86-CD28. Além disso, citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígenos, como a interleucina (IL)-12, e citocinas produzidas pelos linfócitos T ativadas, como a IL-2, estão envolvidas na ativação e proliferação dos linfócitos T. Desta forma, antígenos específicos das micobactérias interagem com TLRs e outros receptores presentes na superfície de macrófagos e células dendríticas, induzindo, assim, uma resposta imune celular predominantemente pró-inflamatória (Figura 1).

As citocinas, moléculas produzidas e secretadas por diferentes células imunocompetentes, após algum estímulo, são um componente central da defesa contra as micobactérias. Em todos os estágios da resposta imune, as citocinas produzidas participam dos processos regulatórios, assim como das funções efetoras.<sup>(3)</sup> O reconhecimento da micobactéria e posterior secreção de IL-12 por macrófagos são processos iniciados antes da apresentação de antígenos do *M. tuberculosis* aos linfócitos T (Figura 1). A IL-12 induz a produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) em células NK, na fase inicial da resposta imune, e também induz a ativação, diferenciação, produção de IFN- $\gamma$  e expansão de células Th1 antígeno-específicas. Recentemente, foram descritas outras citocinas, produzidas por macrófagos e células dendríticas, que apresentam atividade semelhante à IL-12.<sup>(15)</sup> A IL-23, IL-18 e IL-27 também induzem a produção de IFN- $\gamma$ , podendo a IL-18 e a IL-27



**Figura 1** – Mecanismos envolvidos na ativação de macrófagos e linfócitos T por micobactérias - O reconhecimento e a fagocitose de micobactérias podem ocorrer via receptores para manana ou para produtos de ativação do sistema complemento, incluindo o conhecido em inglês como complement receptor 1 (CR1). Após serem fagocitados, os bacilos são processados em fagolisossomos, e os antígenos (Ags) apresentados aos linfócitos T CD4+ via complexo principal de histocompatibilidade, também conhecido em inglês como major histocompatibility complex (MHC), de classe II. A fusão de fagossomos com o retículo endoplasmático (RE) e/ou vesículas apoptóticas fagocitadas pode favorecer a apresentação de Ags às células T CD8+ via MHC de classe I. Por outro lado, a ativação de receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs, em inglês) promove a degradação e liberação do fator nuclear kappa B (nuclear Factor kappa B, NF-κB, em inglês) que se move para o núcleo da célula e induz a ativação da transcrição de uma variedade de genes que levam à produção de citocinas como interleucina (IL)-12 e fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha, TNF-α, em inglês), e à expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86 (que interagem com CD28). A IL-23, IL-18 e IL-27 também são produzidas pelos macrófagos e, juntamente com a IL-12, induzem a produção de interferon-gama (IFN-γ) pelos linfócitos T. A produção de IL-2 e de receptores para IL-2 ocorre nas células T ativadas e induz a proliferação dos linfócitos T. O IFN-γ e o TNF-α ativam os mecanismos microbicidas dos macrófagos. O IFN-γ também está envolvido na produção de quimiocinas. A IL-10, produzida por macrófagos e também por linfócitos T, atua como imunossupressor endógeno. TCR: T-cell receptor (receptor de linfócitos T); FcR: receptor para a porção Fc de anticorpos.

atuar em sinergia com a IL-12, aumentando essa atividade (Figura 1). Acredita-se que a IL-27 atue em uma fase precoce da resposta imune, precedendo a IL-12 na indução da produção de IFN-γ, enquanto que a IL-12 tem forte atuação na amplificação da produção de IFN-γ e na expansão de linfócitos Th1 em um estágio subsequente<sup>(15)</sup> (Figura 1). As células

Th1 são a principal fonte de IL-2 e IFN-γ durante a resposta imune adquirida, e são necessárias para o controle da fase crônica da infecção, devido à ação destas citocinas sobre células T e macrófagos. Sendo produzida por células dendríticas e macrófagos e atuando nas células T, a IL-12 forma uma ligação entre as respostas inata e adquirida. Os indi-

víduos com mutação nos genes IL-12p40 e IL-12R apresentam uma produção reduzida de IFN- $\gamma$  pelas células T e são mais susceptíveis a infecções disseminadas pela vacina Bacille Calmette-Guerin (BCG) e *M. avium*.<sup>(16)</sup>

A capacidade bactericida do macrófago frente ao *M. tuberculosis* necessita ser previamente ativada, e o IFN- $\gamma$  é o principal e mais potente mediador desse processo.<sup>(16-17)</sup> O IFN- $\gamma$  é capaz de incrementar a expressão de diversos genes no macrófago, induzir um aumento na expressão do MHC (aumento na apresentação de antígenos) e de receptores para imunoglobulinas (FcRs; maior capacidade de fagocitose), recrutar linfócitos T que participam da destruição bacteriana, e participar da produção de óxido nítrico. Embora a produção de IFN- $\gamma$  isolada seja insuficiente para o controle do bacilo, o IFN- $\gamma$  é um dos componentes cruciais para a resposta protetora contra o patógeno.<sup>(3,16-17)</sup> O IFN- $\gamma$ , em sinergia com o fator de necrose tumoral alfa, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) em inglês, ativa macrófagos infectados, iniciando um importante mecanismo efetor da imunidade mediada por células. Devido a sua importância, defeitos nos genes para IFN- $\gamma$  ou receptor de IFN- $\gamma$  predispõem indivíduos a infecções micobacterianas sérias.<sup>(18)</sup> Embora a capacidade de produção de IFN- $\gamma$  possa variar entre indivíduos, alguns estudos sugerem que os níveis de IFN- $\gamma$  estão diminuídos em pacientes com TB ativa.<sup>(19)</sup> Estes níveis estão ainda mais diminuídos em pacientes com doença pulmonar avançada.<sup>(20)</sup> Além disso, foi demonstrado que o *M. tuberculosis* pode impedir que macrófagos respondam adequadamente ao IFN- $\gamma$ .<sup>(21)</sup>

Contudo, a importância do IFN- $\gamma$  na proteção contra vários patógenos, incluindo parasitos, bactérias e vírus, já foi bem estabelecida.<sup>(22)</sup> Desta forma, em diversos sistemas biológicos, a detecção de IFN- $\gamma$  ou células produtoras de IFN- $\gamma$ , após exposição a antígenos, é freqüentemente usada como um marcador da atividade celular efetora.

As células Th2 são produtoras de IL-4, IL-5 e IL10, citocinas envolvidas na ativação de células B e na produção de anticorpos. A imunidade contra TB é mediada por células Th1. Contudo, foi descrito recentemente que, além das citocinas produzidas por células Th1, existe uma produção de IL-4 na TB humana.<sup>(23-24)</sup> Devido ao forte efeito antagonista de IL-4 na resposta Th1, demonstrou-se que uma resposta Th1 pode ser prejudicada mesmo na presença de uma baixa resposta Th2.<sup>(25)</sup> A IL-4 tem a

capacidade de regular negativamente a expressão de TLR2 e a ativação de macrófagos.<sup>(14)</sup> Recentemente, foram identificadas células T regulatórias CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, produtoras de IL-10 e fator de crescimento de transformação beta, capazes de expressar TLRs (que podem reagir com micobactérias) e participar da supressão da imunidade protetora e, portanto, sendo mais um fator potencialmente importante no início da infecção, pois é capaz de influenciar latência ou progresso da TB.<sup>(4)</sup>

O sistema imune também conta com moléculas que induzem a quimiotaxia ou sinalização, denominadas de quimiocinas. Através de sua capacidade de recrutar e focalizar distintas populações de leucócitos, as quimiocinas têm o potencial de intensificar a resposta imune. Em modelos murinos *in vivo* e *in vitro*, o *M. tuberculosis* induz a produção de uma variedade de quimiocinas, incluindo proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa, conhecida em inglês como macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-2, proteína quimiotática de monócito 1 – monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) em inglês – MCP-3, MCP-5 e proteína 10 induzível por IFN- $\gamma$ .<sup>(26)</sup> O IFN- $\gamma$  é capaz de regular a produção de várias quimiocinas. A monocina induzida por IFN- $\gamma$  (conhecida em inglês como monokine induced by IFN- $\gamma$ , MIG ou CXCL9) pode cumprir esse papel, e ser usada como uma medida sensível e específica na produção de IFN- $\gamma$ . Um dos primeiros efeitos envolvidos na liberação de IFN- $\gamma$  é a produção de MIG pelos macrófagos.<sup>(27)</sup> O MIG vem sendo considerado um importante mediador da resposta imune protetora. De fato, células mononucleares do sangue periférico de pacientes com TB produzem MIG em resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis*, sendo essa produção significativamente menor nos indivíduos-controle vacinados com BCG e provenientes de área endêmica.<sup>(28)</sup>

## Êxitos e problemas na prevenção e diagnóstico da TB

As principais medidas para conter o avanço da TB no mundo englobam o diagnóstico precoce dos pacientes, tratamento efetivo contra as formas resistentes de TB e uma vacina mais aperfeiçoada e protetora do que a atual BCG.<sup>(2)</sup> A baixa eficiência da vacina BCG foi demonstrada em estudos epidemiológicos realizados em diversas partes do mundo, podendo sua eficácia contra a TB pulmonar variar

entre 0 e 80%.<sup>(29)</sup> As principais causas da baixa eficiência da vacina BCG podem estar relacionadas aos seguintes fatores: 1) exposição a micobactérias do meio ambiente;<sup>(30)</sup> 2) variações genéticas na população alvo ou nas cepas vacinais;<sup>(4)</sup> 3) diferenças nutricionais nos indivíduos vacinados;<sup>(29)</sup> e 4) existência de co-infecções.<sup>(31)</sup> Mesmo assim, em áreas de baixa prevalência de TB, a vacinação é recomendada para crianças, logo após o nascimento ou ao primeiro contato com serviços de saúde, para a prevenção de meningite, com exceção de crianças com AIDS.<sup>(32)</sup> Apesar dos contínuos esforços para se desenvolver vacinas mais eficazes contra a TB, uma nova vacina não foi aprovada até hoje. Ainda que uma vacina seja desenvolvida, ela não irá prevenir a progressão da doença ativa entre os mais de 2 bilhões de pessoas já infectadas com *M. tuberculosis*. Portanto, mesmo que uma nova vacina seja implementada mundialmente, sistemas de diagnóstico e tratamento mais efetivo serão necessários, nas próximas décadas, para conter a TB.<sup>(1-2)</sup>

Os métodos de diagnóstico atualmente usados, como a baciloscopia, a cultura microbiológica, a radiografia de tórax, e o teste intradérmico com o derivado protéico purificado (purified protein derivative, PPD, em inglês), ou teste tuberculínico, não têm tido o sucesso desejado para diminuir a incidência da TB de forma significativa.<sup>(1-2)</sup> Na TB pulmonar, a tosse não produtiva é o sintoma mais comum no início da doença. Com o desenvolvimento da infecção, o escarro começa a ser produzido quando aumenta a inflamação e a necrose do tecido pulmonar. Devido a isso, a baciloscopia é o método prioritário de diagnóstico e controle durante o tratamento da TB. O principal método para a pesquisa de bacilos no escarro é a técnica de coloração específica Ziehl-Neelsen (ZN). O ZN é um método barato, que se baseia na coloração a quente com fucsina fenicada, seguida de descoloramento com álcool-ácido, fazendo com que somente as micobactérias mantenham a coloração vermelha, por serem ácido-resistentes. A técnica de fluorescência com auramina apresenta a mesma acurácia do ZN, com tempo de leitura menor, mas é pouco empregada, pois exige pessoal treinado e tem custo mais elevado. Além disso, as lâminas positivas pela técnica de fluorescência precisam ser confirmadas pelo ZN. A baciloscopia, apesar de sua simplicidade e baixo custo, tem como principal desvantagem o fato de ser negativa em 30 a 50% dos casos de

pessoas infectadas com *M. tuberculosis*, em parte devido à necessidade da presença de pelo menos 5000 bacilos/mL de escarro.<sup>(33)</sup>

A cultura microbiológica, geralmente empregada em casos pulmonares suspeitos e negativos à baciloscopia, tem a vantagem de permitir a detecção e o isolamento da micobactéria, a identificação da espécie e/ou do complexo isolado, e a determinação da sensibilidade do microorganismo aos quimioterápicos para TB. Os principais meios de cultura utilizados são o de Löwenstein-Jensen (meio sólido à base de ovo), e o Middlebrook (sólido ou líquido, à base de agar). Apesar de sua importância, a cultura do *M. tuberculosis* é um processo demorado, pois o bacilo tem um crescimento lento (15-20 h), e o teste nem sempre apresenta 100% de positividade.<sup>(1)</sup> Os sistemas automatizados para detecção de micobactérias como o BACTEC 460 TB®, BACTEC 9000® e o MGIT® são promissores, utilizam meios enriquecidos que promovem a aceleração do crescimento bacteriano, mas podem também indicar resultados falso-positivos devido à contaminação por outras bactérias.<sup>(33)</sup> Além do escarro, a baciloscopia e a cultura para micobactérias podem ser feitas no aspirado gástrico, lavado broncoalveolar, biópsia transbronquial, urina, sangue, líquido pleural e peritoneal. A técnica de indução de escarro, com nebulização ultra-sônica de uma solução salina hipertônica a 3%, revelou ser uma alternativa de fácil execução e melhor relação custo-benefício para o diagnóstico de TB pulmonar com tosse não produtiva. Esta técnica precede estudos invasivos como a broncofibroscopia, estando sempre associada à baciloscopia e à cultura de micobactérias.<sup>(33-34)</sup>

A radiografia do tórax é indicada como método auxiliar no diagnóstico da TB em pacientes sintomáticos e negativos à baciloscopia, em familiares de pacientes bacilíferos, e mesmo em suspeitos de TB extrapulmonar. O método se baseia na presença de opacidades radiológicas características, tendo utilidade no diagnóstico da TB pulmonar primária (opacidade mais homogênea e aumento no volume dos linfonodos regionais) e TB pulmonar secundária (opacidade heterogênea, presença de cavidades e nódulos).<sup>(33)</sup> A análise radiológica não é, entretanto, um exame específico para detectar pacientes com TB, visto que lesões pulmonares semelhantes às causadas pelo *M. tuberculosis* podem ocorrer em outras doenças. Na prática, a radiografia do tórax e o exame do escarro são aplicáveis em casos de

suspeita de TB pulmonar.<sup>(34)</sup> A tomografia computadorizada do torax é um método radiológico de alta resolução e mais sensível do que a radiografia de tórax, mas apresenta alto custo, só estando disponível em centros de referência.<sup>(33)</sup>

Devido à imunodepressão e conseqüente deficiência em conter o crescimento do *M. tuberculosis* nos pulmões, à disseminação hematogênica e posterior envolvimento de um ou mais sítios extrapulmonares, é mais freqüente em pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles infectados com HIV. As formas extrapulmonares de TB são mais difíceis de serem diagnosticadas, em parte por serem menos comuns e/ou familiares à maioria dos médicos. A TB extrapulmonar pode envolver locais de difícil acesso e, devido à natureza desses locais, alguns bacilos podem causar grandes danos. A combinação de bacilos e locais de difícil acesso dificulta a confirmação bacteriológica e, freqüentemente, são necessários processos invasivos para o estabelecimento do diagnóstico. Devido à variedade de sistemas orgânicos envolvidos na TB extrapulmonar e/ou disseminada (miliar), as manifestações clínicas podem ser bastante variadas. Os sinais e sintomas apresentados são geralmente não específicos e sistêmicos, como febre, perda de peso, suor noturno, anorexia e fraqueza. Outros sintomas relacionam-se com a severidade da doença no órgão envolvido.<sup>(34)</sup>

O teste do PPD tem sido, há longo tempo, utilizado como método auxiliar no diagnóstico da TB devido a sua alta positividade nos indivíduos com a doença. É usado, também, como método de triagem para o diagnóstico da TB. É um método capaz de identificar a infecção pelo *M. tuberculosis*, inclusive na forma latente da TB, não sendo suficiente para o diagnóstico da TB como doença. Desenvolvido originalmente por Robert Koch, em 1890 (antiga tuberculina), o método se baseia na reação celular (acúmulo de células inflamatórias) desenvolvida na pele, 24 a 72 h após a inoculação intradérmica de PPD, uma mistura de proteínas de baixo peso molecular. A tuberculina usada é o PPD-RT23 (preparada pelo Statens Serum Institute, Copenhague) aplicada por via intradérmica no antebraço, na dose de 0,1 mL. Um endurecimento local de mais de 5-15 mm, dependendo dos fatores de risco do indivíduo, é considerado um resultado positivo e indica infecção pelo *M. tuberculosis*. Apesar de sua importância, o teste PPD não tem 100% de sensibilidade (porcentagem de indivíduos doentes com teste positivo) ou

especificidade (porcentagem de indivíduos sadios que apresentam teste negativo). Em média, 10 a 25% de pacientes com TB ativa não reagem ao PPD, e sua especificidade também é variável. Levantamentos populacionais em áreas com diferente risco de infecção por *M. tuberculosis* mostraram larga variação no tamanho das reações, com acentuadas diferenças entre diferentes áreas geográficas.

O teste do PPD tem sensibilidade diminuída em populações de pacientes imunocomprometidos, pessoas recentemente infectadas e crianças muito jovens. A especificidade é baixa pois o PPD contém diversos antígenos amplamente compartilhados entre diferentes espécies de micobactérias, como as micobactérias do ambiente, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. bovis* (BCG).<sup>(35)</sup> Vários estudos têm demonstrado que o PPD não distingue, com segurança, pessoas vacinadas com BCG daquelas expostas a micobactérias do ambiente ou infectadas com *M. tuberculosis*.<sup>(36)</sup> O fato de o PPD ainda continuar em uso, não obstante essas limitações, revela a necessidade urgente de viabilizar testes mais específicos para o diagnóstico da TB.

### Iniciativas para um diagnóstico preciso da TB

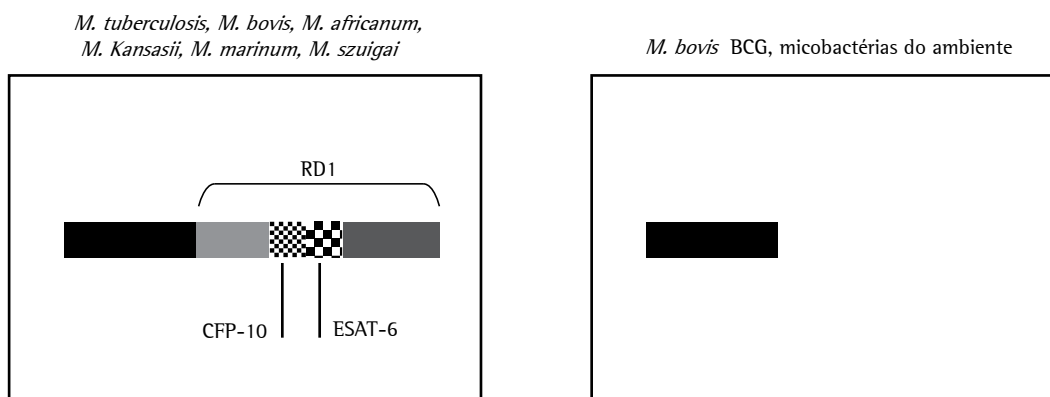
Um teste de diagnóstico imunológico está diretamente relacionado à resposta imune do paciente. Portanto, a vantagem de um teste imunológico está na sua capacidade de demonstrar se o paciente foi previamente sensibilizado pela micobactéria e confirmar uma infecção, sem a necessidade de detecção do bacilo no escarro ou em alguma outra amostra biológica do paciente. Um teste *in vitro*, utilizando-se uma pequena amostra de sangue periférico do paciente, pode ser suficiente para realizar-se uma rápida investigação imunológica.<sup>(37)</sup> A inclusão de controles positivos (mitógenos), em um teste imunológico, permite distinguir indivíduos imunocompetentes (que não apresentam uma resposta celular específica, mas respondem a mitógenos) de indivíduos imunocomprometidos (HIV+) (que não respondem, ou respondem fracamente, a estímulos antigênicos específicos e mitógenos).

Na procura por novos antígenos que substituam o PPD, várias regiões do genoma do *M. tuberculosis* foram definidas como sendo unicamente expressas por cepas de *M. tuberculosis*; portanto, não sendo encontradas na cepa vacinal do *M. bovis* (BCG) ou

em outras espécies de micobactérias.<sup>(38)</sup> Desta forma, essas regiões genômicas, que codificam antígenos específicos do *M. tuberculosis*, são os principais instrumentos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico da TB, pois representam moléculas expressas e com grande potencial para o desenvolvimento de respostas imunes específicas. Essas regiões presentes no genoma do *M. tuberculosis*, e ausentes no do *M. bovis* (BCG), são conhecidas como regiões de diferença (RDs), tendo sido caracterizadas 16 RDs.<sup>(39)</sup> Na RD1 (Figura 2), são codificados pelo menos dois antígenos promissores para a detecção da TB – conhecidos em inglês como Early Secreted Antigenic Target 6-kDa (ESAT-6),<sup>(38)</sup> e Culture Filtrate Protein 10-kDa (CFP-10).<sup>(40)</sup> Essas duas proteínas estão essencialmente presentes em micobactérias patogênicas, como *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*,<sup>(41)</sup> são secretadas em grande quantidade quando essas micobactérias são cultivadas, ou infectam o hospedeiro, e, principalmente, são fortemente imunodominantes.<sup>(35,42)</sup> Por sua capacidade de induzir a ativação de células T durante o início da TB, moléculas como o ESAT-6 e o CFP-10 apresentam um importante papel em certos estágios do crescimento micobacteriano e na sobrevivência intracelular. Alguns estudos envolvendo mutações nos genes que codificam o ESAT-6 e o CFP-10 mostraram ausência na indução da resposta específica de células T e anulação da virulência da micobactéria.<sup>(43)</sup> A consequência prática dessa imunodominância é que essas duas moléculas são

parceiras ideais para um método diagnóstico.<sup>(44-47)</sup> Além disso, ambos os antígenos podem ser utilizados de maneira isolada, ou unidos sob a forma de uma molécula recombinante híbrida.<sup>(28,44)</sup>

Os testes imunológicos relacionados à produção de IFN- $\gamma$  por células T, em resposta a antígenos presentes no *M. tuberculosis* e ausentes no *M. bovis* (BCG), tais como ESAT-6 e CFP-10, vêm sendo desenvolvidos na tentativa de substituir o teste cutâneo pelo PPD.<sup>(35)</sup> Os testes imunológicos baseiam-se no conceito de que células T de indivíduos previamente sensibilizados por antígenos do *M. tuberculosis* (células T de memória) liberam IFN- $\gamma$  quando reestimuladas por antígenos específicos. Este teste, ao contrário do teste cutâneo com o PPD, é realizado *ex vivo*, ou seja, através da cultura de uma amostra de células do sangue periférico do paciente, por 24 h, em presença de antígenos do *M. tuberculosis*.<sup>(44)</sup> Conseqüentemente, as células sensibilizadas e específicas produzem e secretam IFN- $\gamma$  no sobrenadante da cultura, que pode ser posteriormente detectado por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA). Uma alta produção de IFN- $\gamma$  em resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis* indica sensibilização prévia, mas não necessariamente em doença ativa. Sob este aspecto, a análise de IFN- $\gamma$  derivado de um teste imunológico é similar ao teste com o PPD, ou seja, não se consegue distinguir facilmente infecção latente de doença ativa.<sup>(33,45-46)</sup>



**Figura 2** – Presença ou ausência de genes da região de diferença 1 (RD1) em micobactérias - A RD1 do genoma de micobactérias está presente apenas no *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* e *M. bovis* (complexo *M. tuberculosis*) e em algumas micobactérias do meio ambiente (*M. kansasii*, *M. marinum* e *M. szulgai*), estando ausente na vacina *M. bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG), em todas as cepas, e na maioria das micobactérias do meio ambiente. Na RD1 estão codificados os genes conhecidos em inglês como culture filtrate protein 10-kDa (CFP-10) e early secreted antigenic target 6-kDa (ESAT-6), moléculas promissoras para o diagnóstico imunológico da tuberculose.



Dois testes baseados na produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T em cultura, e utilizando antígenos expressos por genes presentes na RD1, estão disponíveis comercialmente. O primeiro deles foi o teste QuantiFERON-TB<sup>®</sup> (Cellestis Limited, Carnegie, Austrália), aprovado pela agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA, Administração de Alimentos e Medicamentos), em 2001, no qual uma amostra do sangue periférico é cultivada em placas previamente preparadas e o sobrenadante é analisado através do ELISA.<sup>(47-48)</sup> Esta primeira geração de ensaios imunológicos utilizou o PPD como antígeno principal, e apresentava os mesmos problemas de especificidade que o teste cutâneo com o PPD, ou seja, baixa especificidade apesar da alta sensibilidade.<sup>(35)</sup> O teste inicial foi substituído pelo QuantiFERON-TB-Gold<sup>®</sup>, empregando ESAT-6 e CFP-10 no lugar de PPD. Esse novo ensaio imunológico foi aprovado pelo FDA em dezembro de 2004.<sup>(47-48)</sup> O teste oferece algumas vantagens, como visita única do paciente, resultados em 24 h, ausência de um novo desafio ao sistema imune do indivíduo, e não está sob a interferência de uma vacinação prévia com o BCG. Contudo, o teste requer um processamento da amostra sanguínea em menos de 12 h após sua obtenção, e ainda existem poucos dados relativos a sua utilização para determinar o risco de contrair a TB.<sup>(49)</sup>

Outra ferramenta desenvolvida para a detecção de IFN- $\gamma$  é o ensaio conhecido em inglês como enzyme linked immunospot (ELISPOT), no qual o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  pode ser quantificado.<sup>(35,50-52)</sup> No ELISPOT, moléculas de IFN- $\gamma$  secretadas por células do sangue periférico se ligam especificamente a anticorpos monoclonais anti-IFN- $\gamma$  previamente imobilizados em uma placa, prevenindo o problema do consumo da citocina durante a cultura, aumentando assim a sensibilidade do ELISPOT em relação ao ELISA. O T SPOT. TB<sup>®</sup> (Oxford Immunotec, Oxon, UK) emprega ESAT-6 e CFP-10 como antígenos específicos para a estimulação dos linfócitos T sanguíneos. Este ensaio aguarda a aprovação da FDA.<sup>(47)</sup>

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para estudar a concordância entre o teste cutâneo com PPD e os testes de detecção de IFN- $\gamma$  considerando o teste com PPD o determinante padrão. A maioria dos estudos demonstra uma concordância que varia de modesta a alta (60 a 80%) entre os dois testes.<sup>(52-53)</sup> Vários estudos sugerem que os testes direcionados

para a detecção de IFN- $\gamma$  em resposta à antígenos originados da RD1, superam o teste com PPD nas seguintes características: alta especificidade; melhor correlação com medidas indiretas de exposição ao *M. tuberculosis*; menor reatividade cruzada devido à vacinação com BCG ou infecção com micobactérias do meio ambiente; e procedimento laboratorial mais rápido.<sup>(35,46-47)</sup> Por falta de um determinante padrão no diagnóstico da TB, é impossível definir com precisão a sensibilidade e a especificidade dos testes capazes de quantificar a produção de IFN- $\gamma$  para o diagnóstico de infecção latente.<sup>(35)</sup>

O teste sorológico, capaz de detectar anticorpos específicos contra micobactérias no soro, é um método diagnóstico atrativo devido a sua fácil realização, capacidade de determinar os eventos relacionados à resposta humoral após a infecção, e possível aplicação no diagnóstico da fase inicial da doença. Desta forma, a sorologia pode ser um teste rápido e robusto o suficiente para ser implementado em condições adversas, como em países em desenvolvimento.<sup>(54)</sup> É importante mencionar que, em pacientes acometidos de AIDS, nos quais o número de células T está diminuído ou mesmo nulo, a determinação da resposta humoral pode ser um instrumento valioso para auxiliar no diagnóstico precoce e no controle epidêmico da infecção pelo bacilo.

Entretanto, os testes sorológicos apresentam uma baixa sensibilidade e especificidade. Isto se deve à grande heterogeneidade da resposta humoral em pacientes com TB e à reatividade cruzada com outros antígenos, como aqueles existentes em micobactérias ambientais, comprometendo sua aplicação.<sup>(55)</sup> Diversos ensaios foram realizados, visando o aprimoramento do teste sorológico para o diagnóstico da TB. Para isso, diferentes preparações antigênicas foram estudadas, como suspensões de bactérias, filtrado de culturas de bacilos, extratos de bactérias, ou mesmo o PPD. A obtenção de proteínas purificadas e específicas da micobactéria aumentou o potencial do teste sorológico para o diagnóstico da TB. Diversos antígenos de considerado valor sorológico foram identificados, como o antígeno 85A, a proteína de 38 kDa, alfa-cristalina (16 kDa), MTB48 e PGL-Tb1.<sup>(35)</sup> Alguns desses antígenos são secretados ou estão presentes na parede do bacilo. Apesar de a micobactéria ser um microorganismo intracelular, e por isso estar protegida da ação biológica dos anticorpos, o fato de alguns antígenos secretados

serem ao mesmo tempo imunodominantes justifica a avaliação da resposta humoral e sua aplicação no diagnóstico da TB. Acredita-se que, no futuro, um teste sorológico eficaz irá conter diversos antígenos específicos (coquetel antigênico), a fim de avaliar a resposta imune humoral.<sup>(56-57)</sup>

Recentemente, foi divulgado um novo teste de diagnóstico da TB, o e-nose em inglês, ou nariz eletrônico, que é capaz de detectar componentes voláteis no soro.<sup>(58)</sup> Estes componentes são possivelmente liberados a partir do pulmão para a circulação, por micobactérias presentes em uma infecção ativa. Este método pode distinguir mudanças nas propriedades físicas do soro (condutividade, resistência e frequência), em resposta a certos grupamentos químicos originados da micobactéria e, portanto, foi sugerido como um possível teste diagnóstico para a TB bovina. Os autores ressaltam que esse método apresenta facilidade de execução e baixo custo, sendo possível sua execução em larga escala. Entretanto, não está claro se este método será capaz de discriminar entre infecções causadas por micobactérias patogênicas e por micobactérias não patogênicas. É igualmente incerto o efeito da vacinação pelo BCG sobre a sensibilidade deste método de diagnóstico.

A amplificação *in vitro* do DNA da micobactéria através de reação de polimerase em cadeia pode, por sua vez, fornecer uma resposta diagnóstica rápida, apesar de este método exigir um laboratório e pessoal técnico especializados.<sup>(59,60)</sup> O método não é de grande praticabilidade nos casos de TB extrapulmonar ou nos pacientes pediátricos, nos quais é necessário haver um procedimento invasivo para obtenção de uma amostra para análise. De qualquer forma, a comparação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios demonstrou haver grande variabilidade na reprodução desta técnica altamente sensível, ocasionando um elevado índice de resultados falso positivos. Além disso, os métodos deste tipo que estão comercialmente disponíveis não atingem o nível de sensibilidade semelhante ao método tradicional de cultura,<sup>(35)</sup> principalmente nos casos de baciloscopia negativa, comumente encontrado em pacientes com HIV.

## Considerações finais

O diagnóstico rápido e específico da TB é vital para o controle da infecção bacilar. Apesar

do enorme problema de saúde pública mundial que a TB ocasiona, os recursos médicos disponíveis para tratar e prevenir a doença permanecem limitados. É importante mencionar que nenhum agente quimioterápico ou biológico novo contra a TB foi introduzido nos últimos 40 anos, e uma vacina uniformemente efetiva ainda não foi desenvolvida. Os métodos diagnósticos pouco específicos, ainda em uso, não alteram o controle da infecção pelo *M. tuberculosis*. Essas limitações determinam a necessidade de um entendimento melhor das bases patológicas da TB e, especialmente, a elucidação de mecanismos moleculares e celulares que regulam a interação parasito-hospedeiro, a fim de desenvolver, urgentemente, soluções mais eficazes para o combate à TB.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa do autor Henrique Couto Teixeira, e à FAPEMIG.

## Referências

1. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*. 2003;362(9387):887-99.
2. World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO/CDS/TB/2001.287.
3. North RJ, Jung YJ. Immunity to Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2004;(22):599-623.
4. Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol*. 2005;26(12):660-7.
5. Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*. 2006;24(1):105-17.
6. Gueronprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*. 2003;425(6956):397-402.
7. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*. 2003;425(6956):402-6.
8. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature*. 1995;375(6527):155-8.
9. Grant EP, Degano M, Rosat JP, Stenger S, Modlin RL, Wilson IA, et al. Molecular recognition of lipid antigens by T cell receptors. *J Exp Med*. 1999;189(1):195-205.
10. Kaufmann SH, Schaible UE. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(1):79-87.
11. Orme IM, Andersen P, Boom WH. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1993; 167(6):1481-97.
12. Teixeira HC, Munk ME, Kaufmann SH. Frequencies of IFN gamma- and IL-4-producing cells during *Mycobacterium*

- bovis (BCG) infection in two genetically susceptible mouse strains: role of alpha/beta T cells and NK1.1 cells. *Immunol Lett.* 1995;46(1-2):15-9.
13. Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate Immunity. *N Engl J Med.* 2000;343(5):338-44.
  14. Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol.* 2004; 16(1):35-41.
  15. Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb).* 2005;85(1-2):53-64.
  16. Ottenhoff TH, Kumaratne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today.* 1998;19(11):491-4.
  17. Salgame P. Host innate and th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(4):374-80.
  18. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med.* 1996;335(26):1956-61.
  19. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun.* 1996;64(4):1351-6.
  20. Swaminathan S, Gong J, Zhang M, Samten B, Hanna LE, Narayanan PR, et al. Cytokine production in children with tuberculous infection and disease. *Clin Infect Dis.* 1999;28(6):1290-3.
  21. Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol.* 1999;163(7):3898-906.
  22. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-95.
  23. Seah GT, Scott GM, Rook GA. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis.* 2000;181(1):385-9.
  24. van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RH, et al. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J. Infect Dis.* 2000;181(3):1194-7.
  25. Rook GA, Hernandez-Pando R, Dheda K, Teng Seah G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol.* 2004;25(9): 483-8.
  26. Rhoades ER, Cooper AM, Orme IM. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995;63(10):3871-7.
  27. Brice GT, Graber NL, Hoffman SL, Doolan DL. Expression of the chemokine MIG is a sensitive and predictive marker for antigen-specific, genetically restricted IFN-gamma production and IFN-gamma-secreting cells. *J Immunol Methods.* 2001;257(1-2):55-69.
  28. Abramo C, Meijgaarden KE, Garcia D, Franken KL, Klein MR, Kolk AJ, et al. Monokine induced by interferon gamma and IFN-gamma response to a fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and CFP-10 in Brazilian tuberculosis patients. *Microbes Infect.* 2006;8(1):45-51.
  29. Bloom BR, Fine PEM. The BCG experience: implications for future vaccine against tuberculosis. In: Bloom BR, editor. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.* Washington: American Society of Microbiology; 1994. p. 531-57.
  30. Black GF, Weir RE, Floyd S, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, et al. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet.* 2002;359(9315):1393-401.
  31. Ferreira AP, Aguiar AS, Fava MW, Corrêa JO, Teixeira FM, Teixeira HC. Can the efficacy of bacille calmette-guerin tuberculosis vaccine be affected by intestinal parasitic infections? *J Infect Dis.* 2002;186(3):441-2.
  32. World Health Organization. Core information for the development of immunization policy: 2002 update. WHO/V&B/02.28.
  33. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de tuberculose. Diretrizes brasileiras para tuberculose 2004. *J Bras Pneumol.* 2004;30(Supl 1): S1-S55.
  34. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This Official Statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was Adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This Statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(4 Pt 1):1376-95.
  35. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet.* 2000; 356(9235):1099-104.
  36. Fine PE, Sterne JA, Ponnighaus JM, Rees RJ. Delayed type hypersensitivity, mycobacterial vaccines and protective immunity. *Lancet.* 1994;344(8932):1245-9.
  37. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(4):491-6.
  38. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995;63(5):1710-7.
  39. Brosch R, Gordon SV, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microb.* 2000;290(2):143-52.
  40. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology.* 1998;144(Pt 11):3195-203.
  41. Dillon DC, Alderson MR, Day CH, Bement T, Campos-Neto A, Skeiky YA, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* (BCG). *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3285-90.
  42. Ulrichs T, Munk ME, Mollenkopf H, Behr-Perst S, Colangeli R, Gennaro ML, et al. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur J Immunol.* 1998;28(12):3949-58.
  43. Brodin P, Jonge MI, Majlessi L, Leclerc C, Nilges M, Cole ST, et al. Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant T-cell antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity. *J Biol Chem.* 2005;280(40):33953-9.

44. Munk ME, Arend SM, Brock I, Ottenhoff TH, Andersen P. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2001;183(1):175-6.
45. Cardoso FL, Antas PR, Milagres AS, Geluk A, Franken KL, Oliveira EB, et al. T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients. *Infect Immun.* 2002;70(12):6707-14.
46. Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5(5):462-7.
47. Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(12):761-76.
48. Mazurek GH. Guidelines for using the QuantiFERON®-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Morbidity and Mortality Weekly Report [serial on the Internet].* 2003 [cited 2005 Jan 31]; 52 (RR02). Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5202a2.htm>.
49. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. *Morbidity and Mortality Weekly Report [serial on the Internet].* 2005 [cited 2005 Dec 16]; 54(RR15). Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5415.pdf>
50. Ulrichs T, Anding R, Kaufmann SH, Munk ME. Numbers of IFN-gamma-producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4(12):1181-13.
51. Lalvani A. Spotting latent infection: the path to better tuberculosis control. *Thorax.* 2003;58(11):916-8.
52. Hill PC, Brookes RH, Fox A, Fielding K, Jeffries DJ, Jackson-Sillah D, et al. Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection against a gradient of exposure in The Gambia. *Clin Infect Dis.* 2004;38(7):966-73.
53. Richeldi L, Ewer K, Losi M, Bergamini BM, Roversi P, Deeks J, et al. T cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(3):288-95.
54. Mukhopadhyay A, Guan M, Chen HY, Lu Y, Lim TK. Prospective study of a new serological test (ASSURE TB Rapid Test) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006;10(6):620-4.
55. Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D, Gennaro ML. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun.* 1998;66(8):3936-40.
56. Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2000;30 (Suppl 1):S243-S6.
57. Houghton RL, Lodes MJ, Dillon DC, Reynolds LD, Day CH, McNeill PD, et al. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(4):883-91.
58. Fend R, Geddes R, Lesellier S, Vordermeier HM, Corner LA, Gormley E, et al. Use of an electronic nose to diagnose *Mycobacterium bovis* infection in badgers and cattle. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1745-51.
59. Mello FCQ, Fonseca-Costa J, Fávero AI, Oliveira MM, Baptista RLR, Kritski AL, et al. Evaluation of an amplification test - AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* (MTB test - Roche Molecular Systems - for the diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis (SNPT) at a teaching hospital, in Rio de Janeiro, Brasil [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:A628.
60. Spherhacker RD, Mello FC, Zaha A, Kritski AI, Rosseti ML. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(3):312-7.