

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IgG, IgA E IgM AOS  
ANTÍGENOS RECOMBINATES MPT-64 E MT-10.3  
DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS NO  
LIQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES  
COM MENINGITE TUBERCULOSA**

**RAFAEL RIBEIRO HERINGER**

**Prof. Dra Marzia Puccioni Sohler**  
ORIENTADORA

**Rio de Janeiro, RJ – Brasil**

**2006**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

Dissertação apresentada ao término do Curso de Pós-Graduação Stricto-Sensu em Neurologia, Área de Concentração Neurociências, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2006

Heringer, Rafael Ribeiro

H546a Avaliação da Resposta IgG, IgA e IgM aos Antígenos Recombinantes MPT-64 e MT-10.3 de *Mycobacterium Tuberculosis* no Líquido Cefalorraquidiano de Pacientes com Meningite Tuberculosa / Rafael Ribeiro Heringer. – Rio de Janeiro, 2005.

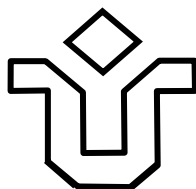
Xiii, 107 f. : il. ; 29cm

Dissertação (mestrado em Neurologia) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Rio de Janeiro, 2005.

Orientação: Marzia Puccioni Sohler. Maria Helena Feres Saad

1. Meningite tuberculosa 2. Líquido Cefalorraqueano 3. *Mycobacterium tuberculosis* 4. MPT-64 5. MT-10.3 6. ELISA I  
Puccioni-Sohler, Marzia. Saad, Maria Helena Feres II. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, CCBS.

III- TITULO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IgG, IgA E IgM AOS  
ANTÍGENOS RECOMBINANTES MPT-64 E MT-10.3 DE  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS NO LIQUIDO  
CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM MENINGITE  
TUBERCULOSA**

Por

**RAFAEL RIBEIRO HERINGER**

Dissertação de Mestrado

**BANCA EXAMINADORA**

Profa.Dra. Marzia Puccioni Sohler

Profa.Dra. Leila de Souza Fonseca

Prof.Dr. Carlos Alberto Morais de Sá

Conceito:.....

Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 2006

A Jesus Cristo, meu Senhor e Salvador, o único digno de toda a honra, toda a Glória, porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

À minha esposa Cheila, pelo nosso amor, carinho, dedicação e companheirismo nesta fase.

À minha filha, Camila, pelo meu imenso amor e cuidado.

À professora Marzia Puccioni, pela confiança, paciência, incentivo, orientação e dedicação neste trabalho.

À professora Maria Helena Saad, pela dedicação, paciência e orientações tão importantes neste trabalho.

À professora Regina Papais Alvarenga, pelo imenso carinho, confiança e incentivo recebido nesses quatro anos de trabalhos juntos.

À Isabela Gama Sardella, pelo grande apoio e dedicação na realização dos testes.

Ao Dr. Carlos Otávio Brandão pelo imenso apoio e confiança em meu trabalho e pela disponibilização das amostras estudadas.

Às biólogas do Laboratório NEUROLIFE, pelo apoio recebido da coleta de dados e amostras.

Aos meus pais e irmãs, que tanto me incentivaram, apoiaram, e me sustentaram em amor, para que eu pudesse chegar tão longe.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com este estudo.

# RESUMO

HERINGER, Rafael Ribeiro. Avaliação da resposta IgG, IgA E IgM aos antígenos MPT-64 e MT-10.3 de *Mycobacterium tuberculosis* no líquido cefalorraquiano de pacientes com meningite tuberculosa. Orientadoras: Marzia Puccioni Sohler, Maria Helena Ferres Saad. Rio de Janeiro: UNIRIO/CCBS, 2006. Dissertação (Mestrado em Neurologia)

**INTRODUÇÃO:** A meningite tuberculosa (MBK) é a principal forma de acometimento da tuberculose no sistema nervoso central, sendo considerada um dos tipos mais graves de tuberculose extra-pulmonar com alto potencial de morbi-mortalidade. Testes acurados, de simples operacionalidade e de baixo custo são importantes para o diagnóstico precoce da doença.

**MÉTODOS:** Enzymed-Lynked Immunosorbent Assay (ELISA) "in-house" foi usado para detectar IgG, IgA e IgM contra os antígenos micobacterianos recombinantes MPT-64 e MT-10.3 no líquido cefalorraquiano (LCR) de 19 pacientes com MBK e 71 pacientes com cefaléia ou esclerose múltipla.

**RESULTADOS:** A melhor reação foi obtida com IgG MT-10.3 (100%, 92%), seguida de IgG MPT-64 (90%, 94%), IgA MPT-64 (90%, 92%), IgM MT-10.3 (90%, 78%), IgA MT-10.3 (79%, 75%) e IgM MPT-64 (68%, 66%), respectivamente para sensibilidade e especificidade. A combinação dos testes aumenta a sensibilidade porém diminui a especificidade. Todos os pacientes com MBK responderam positivamente à IgG MT-10.3 (19/19), seguida por IgG (17/19) e IgA MPT-64 (15/19) e existe uma correlação significativa entre a concentração proteica alta e a média de reatividade ( $p < 0,007$ ). A coinfeção HIV/MBK não interfere na reatividade do teste para ambos os antígenos ( $p > 0,09$ ).

**CONCLUSÃO:** De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho mostrando a reação imune no LCR de pacientes com MBK ao antígeno MT-10.3. Considerando que todos os LCR mostraram reatividade ao MT-10.3, este é um marcador útil para o diagnóstico da MBK. Estudos futuros devem ser feitos para validar este teste.

## ABSTRACT

HERINGER, Rafael Ribeiro. Avaliação da resposta IgG, IgA E IgM aos antígenos recombinantes MPT-64 e MT-10.3 de *Mycobacterium tuberculosis* no líquido cefalorraquídeo de pacientes com meningite tuberculosa. Orientadoras: Marzia Puccioni Sohler, Maria Helena Ferres Saad. Rio de Janeiro: UNIRIO/CCBS, 2006. Dissertação (Mestrado em Neurologia)

Tuberculous meningitis (MBK) is the most common form of tuberculosis in central nervous system, has been considered one of the weightiest types of extra-pulmonary tuberculosis with high potential of morbid-mortality. Development of simple, reproducible, inexpensive diagnostic test for MBK are important to early diagnosis of disease.

Enzymed-linked immunosorbent assay (ELISA) "in house" was carried out to detect IgG, IgM, and IgA against recombinant mycobacterial antibody MT-10.3 and MPT-64 in cerebrospinal fluid (CSF) of 19 patients with tuberculous meningitis (TMB) and 71 control patients (Multiple Sclerosis or headache).

The best reaction was obtained with IgG MT-10.3 (100%, 92%), followed by IgG MPT-64 (90%, 94%), IgA MPT-64 (90%, 92%), IgM MT-10.3 (90%, 78%), IgA MT-10.3 (79%, 75%) and IgM MPT-64 (68%, 66%), respectively to sensibility and specificity. Combination of assays increase sensibility although decrease the specificity. All the MBK patients responded positively to IgG MT-10.3 (19/19), followed by IgG (17/19) and IgA MPT-64 (15/19) and there is a significant correlation between high protein concentration and mean of reactivity ( $p < 0,007$ ). HIV seropositivity did not interfere in the test reactivity to both antigens ( $p > 0,09$ ).

This is, to the author's knowledge, the first report to detect antibody against MT-10.3, showing his potential immunodiagnostic detecting all CSF of TMB positive culture and showing less than 10% of false-negative. Future studies must be done to validate this test.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática das membranas conjuntivas (meninges) que envolvem o sistema nervoso central. p. 18
- Figura 2. Curva do tipo *receiving operator characteristic curve* (ROC) hipotética e ideal. p. 60
- Figura 3. Resultado da padronização com o concentrado de LCR MBK (controle positivo) e Não TB (controle negativo) com o antígeno MPT-64 e MT-10.3 (1 µg/ml) e conjugados A) anti IgA, B) anti IgM e C) anti IgG. p. 69
- Figura 4. Resultados do Liq-EIA expressos em densidade ótica com os antígenos MPT-64 e MT-10.3 para detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA. p. 74
- Figura 5. Curva ROC de sensibilidade x especificidade do Liq-EIA para detecção dos diferentes tipos de Acs reativos aos Ags MT10.3 e MPT-64. p. 76

# LISTA DE TABELAS

- Tabela I. resume dos principais estudos da resposta imune no LCR, por ELISA, com diferentes antígenos micobacterianos e tipos de anticorpos. p.48
- Tabela II. Características clínicas e demográficas dos pacientes que tiveram LCR incluídos neste estudo. p.63
- Tabela III. Resultados dos exames bioquímico-celular dos LCR nos diferentes grupos de LCR. p.65
- Tabela IV: Características clínico e citoquímica dos LCR provenientes de pacientes com MBK e sub-agrupados de acordo com a concentração protéica do LCR. p. 66
- Tabela V. Resultados dos exames bioquímico-celular dos LCR do SubGrupo I Infetados ou não pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). p.67
- Tabela VI: Sensibilidade e especificidade do Liq-EIA na detecção de diferentes tipos de Acs reativos aos antígenos MPT-64 e MT-10.3. p. 71
- Tabela VII: Freqüência da resposta imune de IgG, IgM e IgA aos antígenos MPT-64 e MT-10.3 no LCR de pacientes MBK subdivididos quanto a sorologia para HIV e proteinorraquia (PR). p.72
- Tabela VIII: Sensibilidade e especificidade do Liq-EIA analisando os resultados cumulativamente. p.73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TB-	Tuberculose
MBK-	Meningite Tuberculosa
SNC-	Sistema Nervoso Central
OMS-	Organização Mundial de Saúde
PCT/SES/RJ-	Programa de Controle de Tuberculose da Secretaria de Saúde do Estado de Rio de Janeiro
HIV-	Vírus da Imunodeficiência Humana
MTB-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
BK-	Bacilo de Koch
H37Rv-	Cepa virulenta de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37
ELISA-	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Ag-	Antígeno
Ac-	Anticorpo
BCG-	Bacilo de Calmette Guerin
LCR-	Líquido Cefalorraquiano
BHL-	Barreira Hemato-Liquórica
BHE-	Barreira Hemato-Encefálica
Qalb-	Quociente de Albumina
AI-	Índice de Anticorpo Específico
IgG-	Imunoglobulina G
IgM-	Imunoglobulina M
IgA-	Imunoglobulina A
INF-g-	Interferon Gama
TNF-	Fator de Necrose Tumoral
C-	Complemento
LT-	Leucotrieno
IL-	Interleucina
TGF-	Fator de Estimulação de Colônias
14C-	Carbono 14
ADA-	Adenosina Deaminase
PCR-	Reação em Cadeia de Polimerase
DNA-	Ácido Desoxirribonucléico
IS6110E-	Seqüência de Inserção 6110E
FDA-	Food and Drug Administration
TC-	Tomografia Computadorizada
RNM-	Ressonância Nuclear Magnética
LAM-	Lipoarabinomanan
CFP-	Proteína filtrada de cultura
PPD-	Derivado protéico purificado
BSA-	Albumina Sérica Bovina
PBSt-	Tampão Substrato Bifosfato
TMB-	Substrato de Trimetilbenzidina
DO/OD-	Densidade óptica

HUCFF/UFRJ-	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/ Universidade Federal do Rio de Janeiro
CRM-RJ-	Conselho Regional de Medicina do Estado do Rio de Janeiro
PR-	Proteinorraquia
G-	Grupo
SG-	Subgrupo
Liq-EIA-	Teste Imunoenzimático em Líquido Cefalorraquiano

# SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	
1.1- CONCEITO.....	14
1.2- EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.3- AS MENINGES.....	18
1.4- AGENTE ETIOLÓGICO.....	20
1.5- ANTÍGENOS.....	22
1.6- LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO .....	25
1.6.1- BARREIRA HEMATO-LIQUÓRICA E BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA. ....	26
1.6.2- SÍNTESE INTRATECAL DE ANTICORPO ESPECIFICO.....	29
1.6.3- SÍNTESE INTRATECAL DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS NA MENINGITE TUBERCULOSA .....	30
1.7- PATOGÊNESE.....	31
1.8- CLINICA.....	34
1.9- DIAGNOSTICO.....	40
1.9.1- BACILOSCOPIA.....	41
1.9.2- CULTURA .....	42
1.9.3- MÉTODO RADIOMÉTRICO (BACTEC).....	43
1.9.4- REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	44
1.9.5- ENZIME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	46
1.9.6- EXAMES DE NEUROIMAGEM .....	49
2- JUSTIFICATIVA .....	51

3- OBJETIVO	
3.1- OBJETIVO GERAL.....	53
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4- MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1- DESENHO DO ESTUDO.....	54
4.2- CASUÍSTICA.....	54
4.3- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	55
4.4- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	56
4.5- AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....	56
4.6- ANTÍGENOS.....	56
4.7- ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA LCR COM OS ANTÍGENOS MPT-64 E MT-10.3 (Liq-EIA)	
4.7.1- ADSORÇÃO DOS ANTÍGENOS AO SUPORTE SÓLIDO (POÇOS DE MICROPLACAS) .....	57
4.8- ESTUDO ESTATÍSTICO.....	59
4.7- ASPECTOS ÉTICOS.....	61
5- RESULTADOS	
5.1- AMOSTRAGEM.....	62
5.2- PADRONIZAÇÃO DO Liq-EIA:.....	68
5.3- TESTE IMUNOENZIMÁTICO EM LIQUIDO CEFALORRAQUIANO (Liq-EIA) ..	68
6- DISCUSSÃO.....	77
7- CONCLUSÕES.....	85
8-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	87

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- CONCEITO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica, cuja característica principal é a preferência pelo parênquima pulmonar e a transmissão de pessoa para pessoa através da inalação de partículas infectadas por este bacilo (Fundação Nacional de Saúde, 2002).

Os primeiros relatos históricos escritos sobre a tuberculose datam de 700 a.C. Documentos arqueológicos mostram indícios da doença no período neolítico (5000 a.C. a 4000 a.C.). Hipócrates denominava a doença como *phthisis*, que significa “derreter”, “liquefazer” e “esvair-se”. Aristóteles descreveu pela primeira vez a natureza contagiosa da doença, mas só confirmada pela descoberta do agente etiológico –*Mycobacterium tuberculosis* – por Robert Koch (1843-1910), no século XIX. Com a revolução industrial, no final do século XVIII e início do século XIX, o desenvolvimento das cidades e proliferação dos aglomerados urbanos, houve um aumento no número de casos, e a mortalidade alcançou cifras de 25% na população adulta na Europa, sendo por isto chamada de a “peste branca” (Koch, 1882 apud Ayvazian *et al*, 1993; Wolinsky *et al*, 1990).

O tratamento baseava-se no repouso ao ar livre em sanatórios especializados, onde metade dos pacientes morria, e na obliteração da cavidade infectada (colapsoterapia).

Com a descoberta e o desenvolvimento das drogas tuberculostáticas, a maioria dos pacientes tratados obtinha a cura. Em 1946, a estreptomicina passou a ser usada com sucesso; em 1952, surgiu a isoniazida e, em 1970, a rifampicina. A partir de então, a letalidade diminuiu de 50% para menos de 10% (Ayvazian *et al*, 1993).

A tuberculose meníngea (MBK) pode se manifestar como meningoencefalite ou meningite. É o tipo de acometimento mais comum da tuberculose no sistema nervoso central (SNC), sendo considerada uma das formas mais graves de TB extrapulmonar, com alto potencial de morbi-mortalidade. O tuberculoma, o abscesso cerebral tuberculoso, a encefalopatia tuberculosa, a vasculopatia tuberculosa, a mielorradiculopatia tuberculosa e a paraplegia de Pott são outras manifestações resultantes da tuberculose no SNC, porém são menos comuns. A MBK caracteriza-se por uma meningite linfocítica subaguda, de difícil diagnóstico apenas pela história e apresentação clínica. (Garg *et al*, 1999; Monteyne & Sindic, 1995; Thwaites *et al*, 2000).

## 1.2- EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose é uma das doenças infecciosas mais freqüentes no mundo, sendo que a maioria dos pacientes infectados pelo bacilo, cerca de 90% dos casos, não desenvolve a doença; porém, 5-10% dos infectados adoecem. Muitos destes se tornam fontes de infecção, e metade desenvolve a forma primária da doença, que é aquela que ocorre dentro do primeiro ano da primo-infecção. A outra metade desenvolve a forma



pós-primária, que é a que ocorre após 1 a 2 anos da primo-infecção, ou por reativação de um foco latente ou por uma reinfecção (van-Crevel *et al*, 2002).

O Brasil é o país com o maior número de casos notificados de tuberculose nas Américas. A Organização Mundial de Saúde (OMS), em seu relatório anual de 2004, o coloca na 15ª posição no “ranking” dos 22 países que concentram 80% dos casos estimados de tuberculose no mundo. Os dados mais recentes publicados pelo Ministério da Saúde indicam que a taxa de incidência de tuberculose vem se mantendo estável nos últimos anos, 62/100.000 habitantes em 2003, com cerca de mais de 92.000 casos notificados a cada ano (WHO, 2005).

O Estado do Rio de Janeiro é o que apresenta a mais alta taxa de incidência de tuberculose do país. A cada ano são notificados em média 16.000 casos de tuberculose. Os 32 municípios prioritários concentram 95% dos casos de tuberculose e a região metropolitana é responsável por 86% dos casos notificados no estado. De acordo com o boletim informativo de 2005 do Programa de Controle da Tuberculose da Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro (PCT/SES/RJ), em 2003 foram notificados 13.015 casos novos de tuberculose e a taxa de incidência no Estado foi de 87,5/100.000 habitantes. O número de óbitos e a taxa de mortalidade específica por tuberculose, no estado, foram de 889 e 6,0%, respectivamente. De 13.015 casos novos de tuberculose, foram solicitados 8.533 testes sorológicos para HIV (65,6%), sendo que 11,2% eram positivos (PCT/SES/RJ, 2005).

Também de acordo com o boletim informativo do PCT/SES/RJ, em 2003, a cidade do Rio de Janeiro apresentou 6.434 casos de tuberculose, com taxa de incidência de 105/100.000 habitantes e o percentual de cura e o de abandono do total de casos no município foi de 71,9% e 14,3%, respectivamente.

De acordo com dados publicados pela COVER/CGVEP/CENEPI/FUNASA/MS (2001), no período entre 1990 e 2000 foram notificados 4.149 casos de meningite tuberculosa no Brasil, com coeficiente de incidência variando entre 0,15 e 0,34 /100000 habitantes e taxa de mortalidade de 55,3% a 74,2%, chegando a 76,3% nos pacientes menores de 4 anos (Nunes *et al*, 1998).

Nos Estados Unidos, a incidência de tuberculose extrapulmonar é de 0,19 / 100.000 habitantes e 4 a 15% das formas extrapulmonares da tuberculose são meníngeas, com uma incidência anual de 0,008 a 0,029 /100.000 ao ano. Yechoor *et al* (1996), mostraram incidência de MBK de 4,8 por 100000 em um período de 12 anos. No estudo feito em dois hospitais de Madri entre os anos de 1985 e 1990, Berenguer *et al* (1992) mostraram que de um total de 2.205 pacientes com tuberculose, 83 apresentaram MBK (3,46%), sendo que 55% eram soropositivos para Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O estudo de Castilla *et al* (2005), feito entre 1994-2003 na cidade de Navarra, Espanha, mostrou a incidência de 18 casos (1,79% dos 1005 casos estudados). Uma revisão dos casos de MBK entre os anos de 1977 e 2003 em um hospital de Madri (Espanha), foi encontrado 28 casos de MBK, sendo que 85% entre os anos de 1977 e 1991 (Jimenez *et al*, 2005). Cailhol *et al* (2005) estimou que a prevalência de MBK, na França, no ano de 2000 foi de 41 e a incidência de 0.7 casos por milhão. Outro estudo

mostrou que menos de 10 casos de MBK são notificados por ano na França em crianças com menos de 15 anos, sendo que este grupo populacional representa anualmente 4,8% dos casos de TB (Gaudelus & Pontual, 2005). Hui *et al* (2005) na China, mostraram que em 10 anos, dos 65 casos identificados numa população entre 15 e 86 anos, a MBK foi a forma mais comum de meningite em 46% dos casos.

### 1.3- AS MENINGES

O sistema nervoso é envolto por membranas conjuntivas denominadas meninges, que são classificadas como dura-máter, aracnóide e pia-máter (Figura 1).

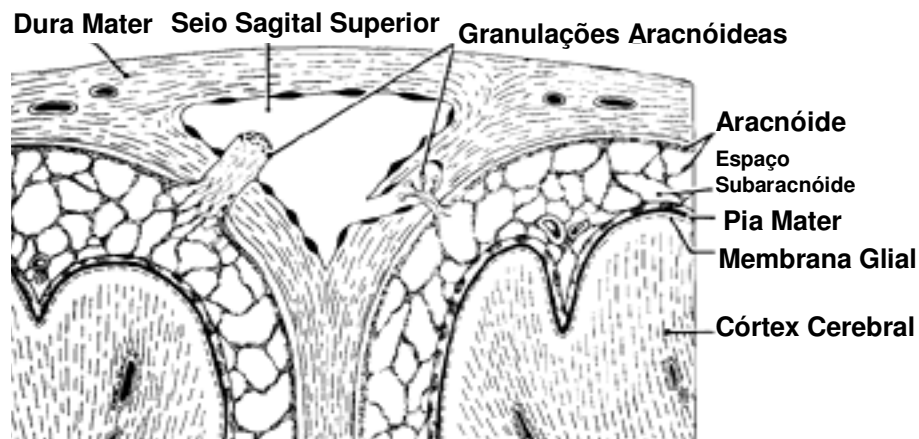


Figura 1. Representação esquemática das membranas conjuntivas (meninges) que envolvem o sistema nervoso central.

([http://www.anatomy.dal.ca/Human\\_Neuroanatomy/Lab\\_figures/Lab1\\_Figs/Lab1.fig1B.gif](http://www.anatomy.dal.ca/Human_Neuroanatomy/Lab_figures/Lab1_Figs/Lab1.fig1B.gif))

A dura-máter é representada pela meninge mais superficial, que se caracteriza por uma membrana espessa e resistente, formada por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, contendo nervos e vasos. A dura-máter é ricamente vascularizada pela artéria meníngea média e inervada por terminações nervosas sensitivas, responsáveis pela maioria das cefaléias (Kingsley, 2001; Clarck, 1976; Machado, 1991).

A aracnóide constitui-se em membrana muito delgada, justaposta à dura-máter, da qual se separa por um espaço virtual, o espaço subdural, contendo uma pequena quantidade de líquido necessário à lubrificação das superfícies de contato das membranas. A aracnóide separa-se da pia-máter, formando o espaço subaracnóideo que contém líquido cefalorraquiano (LCR) e onde atravessam as trabéculas aracnóides para ligar à pia-máter. A profundidade do espaço subaracnóideo é muito variável, formando nestas áreas dilatações chamadas de cisternas subaracnóideas, que contém uma grande quantidade de LCR. Em alguns pontos da aracnóide formam pequenas dilatações saculares que penetram no interior dos seios da dura-máter, constituindo as granulações aracnóideas, mais abundantes no seio sagital superior, onde o LCR está separado do sangue apenas pelo endotélio do seio e uma delgada camada de aracnóide e será absorvido pela circulação venosa (Kingsley, 2001; Clarck, 1976; Machado, 1991).

A pia-máter é a mais interna das meninges, aderindo intimamente à superfície do encéfalo e da medula, acompanhando os relevos e depressões da superfície do sistema nervoso, determinando resistência e consistência a eles (Kingsley, 2001; Clarck, 1976; Machado, 1991).

## AGENTE ETIOLÓGICO

O agente da tuberculose é a espécie *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), ou Bacilo de Koch (BK), classificado taxonomicamente na ordem dos *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceas*, gênero *Mycobacterium*.

O gênero *Mycobacterium* contém aproximadamente 95 espécies que são divididas em três grandes grupos: os de crescimento lento, como *Mycobacterium tuberculosis*; os de crescimento rápido, como *Mycobacterium fortuitum*; e as de espécies que não são cultivadas in vitro, como *Mycobacterium leprae* (Grosset, 1993).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é constituído pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* e *M. bovis* sub espécie *caprae*. Recentemente, foi proposta a inclusão no complexo da espécie *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov., isolada em focas. Estas espécies apresentam 99% de similaridade genética (Cousins *et al*, 2003; Brooks *et al*, 1998; Grosset, 1993).

*Mycobacterium tuberculosis* é caracterizado como um bastonete delgado, imóvel, sem cápsula ou esporos, com extremidades arredondadas, medindo de 2 a 5 µm de comprimento e 0,2 a 0,3 µm de largura, aeróbico obrigatório, sobrevivendo em microambientes aerados que contém altas tensões de oxigênio. Possui tempo de geração de 17-18 horas ou mais, e tempo de crescimento de 2 a 4 semanas para que as colônias sejam visualizadas em meio de cultura in vitro.

O genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv é uma seqüência cromossomal circular contendo 4.411.529 pares de base, com 65,6% de guanina e citosina, além de ser rico em DNA repetitivo. A seqüência do genoma de MTB é a segunda maior já estudada (Cole *et al*, 1998a; 1998b).

Ao ser corado com o Carbol-fuccina, ou método de Ziehl-Neelsen, é resistente à descoloração com ácidos fortes ou álcool, devido ao alto conteúdo lipídico de sua parede celular; por isso, é chamado de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Grosset, 1993; Brooks *et al*, 1998).

À microscopia eletrônica, a parede celular tem uma espessura de 20nm. Sua estrutura básica é o peptidoglicano, um polímero de n-acetilglicosamina e n-glicosilmuramico. Os lipopolissacarídeos são compostos por arabinogalactanos, arabinomananas, mananas e glucanas. O arabinogalactano é um polissacarídeo presente nas bactérias do gênero *Mycobacterium*, *Corynebacterium* e *Nocardia*, que é esterificado na sua extremidade distal com ácidos micólicos, que constitui a maior parte da membrana externa da parede celular. São usados como antígenos em testes sorológicos, por serem imunologicamente ativos, mas tem reação cruzada com *Corynebacterium* e *Nocardia*, assim como todas as espécies de micobactérias. (Grosset, 1993; Wolinsky, 1990).

Os componentes da parede celular como polissacarídeos, proteínas e peptídeos têm mostrado propriedades antigênicas em algumas circunstâncias. Arabinogalactano e arabinomanana são excelentes antígenos. Muitas das proteínas citoplasmáticas de

MTB são antigênicas, sendo que algumas são espécies específicas. Antígenos purificados, bem padronizados e espécie específicos são importantes não apenas quanto ao seu potencial de auxiliar no diagnóstico clínico da tuberculose, mas também servem como marcadores para o estudo da função imunológica dos linfócitos T em várias situações clínicas (Daniel & Janicki, 1978).

MTB é capaz de sintetizar uma grande variedade de outras moléculas complexas, associadas com a camada exterior da parede celular, que podem ter um papel importante na virulência, pois impedem a fusão de fagossomos de macrófagos infectados com MTB “in vitro”, tais como o fator corda, os micosídeos, dimicocerosato e o triacilglicerol (Minnikin, 1982).

O alto teor lipídico da parede celular é responsável não somente pela extrema hidrofobicidade da célula micobacteriana, mas também pela resistência aos procedimentos de descontaminação usando ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e outros detergentes. Por outro lado, isso explica porque a MTB é susceptível como outras bactérias ao calor, radiação a raios gama e álcool (Grosset, 1993).

#### 1.4- ANTÍGENOS

Assim que Robert Koch preparou o primeiro concentrado protéico, chamado de “old tuberculin”, Arloing desenvolveu em 1898, o primeiro teste sorológico para a tuberculose (Arloing, 1904; apud Grosset, 1993). A partir de então, várias técnicas

sorológicas foram avaliadas, porém obtiveram resultados insuficientes, devido à reação cruzada aos antígenos usados, pois os principais antígenos de MTB e *M.bovis*, como os polissacarídeos arabinogalactanos, arabinomananas e o D-glucano são similares a todas as espécies de micobacterias (Pottumarthy *et al*, 2000).

No entanto, a partir da introdução do teste de Enzime-Linked Immunosorbent Assay ELISA, em 1971, por Engvall, aliada a identificação e caracterização de novos antígenos mais específicos e purificados e de anticorpos monoclonais aumentou a sensibilidade dos testes imunoenzimáticos (Engvall, 1971 apud Grosset, 1993). Este método é simples, com excelente reprodutibilidade e boa sensibilidade. Mas, até o momento, nenhum teste sorológico apresentou suficiente sensibilidade e especificidade na prática clínica (Pottumarthy *et al*, 2000).

As proteínas secretadas pela membrana e parede celular de *M. tuberculosis* são um importante alvo da resposta imune celular, sendo precocemente reconhecidas no curso de infecção na TB experimental, o que estimula a proliferação de células T e a produção de INF- $\gamma$ , além de estimular a produção de anticorpos, que podem ser usados como marcadores de infecção tuberculosa (Roche *et al*, 1996; Alderson *et al*, 2000).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e o recente sequenciamento do genoma de MTB, vários antígenos foram identificados com potencial para serem utilizados no desenvolvimento de métodos diagnósticos e vacinas.



*Mycobacterium tuberculosis* apresenta composição antigênica complexa e a resposta imune dos pacientes com TB pode-se mostrar heterogênea para diferentes antígenos. Assim a avaliação de antígenos relevantes é necessária para identificação de moléculas com maior poder imunogênico, e que mostrem acurácia quando utilizados sozinhos ou em combinação no desenvolvimento de testes diagnósticos simples, rápidos e de baixo custo. Testes com estas características seriam importantes para auxiliar no diagnóstico das infecções tuberculosas pulmonares e extrapulmonares (Gennaro *et al*, 2000; Houghton *et al*, 2002; Young *et al*, 1992; Andersen *et al*, 1991; Andersen *et al*, 2004; Rosenkrands *et al*, 1999).

Entre os vários antígenos obtidos do Complexo *M. tuberculosis*, descrito na literatura internacional, o MPB-64 e MPT-64 são uma das principais proteínas, de 23,5 a 22 kDa, ativamente secretada em meio de cultura, sendo encontradas abundantemente no filtrado precoce de cultura de *Mycobacterium bovis* BCG e *M. tuberculosis*, respectivamente. A comparação da seqüência de nucleotídeos desses Ags mostra que eles são idênticos, exceto por uma única mutação (Harboe *et al*, 1986; Andersen *et al*, 1991; Oettinger *et al*, 1994;1995).

O MPT 64 é estruturalmente homólogo ao antígeno (Ag) 85. Enquanto a família do Ag 85 tem homólogos em todas as espécies estudadas de micobactérias, o MPT64 é restrito às espécies do complexo *M. tuberculosis*. Durante a infecção tuberculosa, ocorre uma resposta imune celular por linfócitos T helper relativamente específica ao MPT-64. Pacientes expostos sadios não respondem a essa proteína. É usado como

antígeno para testes cutâneos para auxiliar no diagnóstico da tuberculose (Li *et al* 1993; Roche *et al*, 1996; Musser *et al*, 2000).

Outro antígeno recentemente identificado é o ESAT-6. A família ESAT-6 compõe um grupo de 14 a 23 proteínas secretadas, relacionadas entre si, que compartilham a mesma região (*região de diferença ou deletada 1*, RD1) no genoma de MTB e possuem características antigênicas semelhantes. Dessas proteínas, pelo menos 13 podem ser agrupadas em três subfamílias. Uma dessas subfamílias é formada pelo antígeno TB-10.4 (Rv0288) e duas moléculas homólogas, a TB-10.3 ou MT-10.3 (Rv3019c) e a TB-12.9 (Rv3017c), os quais apresentam diversos epítomos únicos em linfócitos T. Contrariamente ao ESAT-6, estas duas últimas moléculas ainda foram pouco exploradas quanto ao seu potencial imunodiagnóstico.). Os antígenos TB-10.3 e TB-10.4 são proteínas de baixo peso molecular, secretadas por MTB, com 84.4% de suas seqüências idênticas e constituem juntamente com o TB-12.9 (Rv3017c) uma subfamília altamente imunogênica (Skjøt *et al*, 2002; Soresen *et al*, 1995; Alderson *et al*, 2000).

## 1.6- LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO

O líquido, ou líquido cefalorraquiano, é um ultrafiltrado do plasma, caracterizado por ser um fluido aquoso e incolor, que ocupa o espaço subaracnóideo e as cavidades ventriculares. O LCR é formado principalmente no plexo coróide, que são ductos capilares dilatados que se projetam nas paredes dos ventrículos laterais, terceiro e

quarto ventrículo, assim como na vascularização do encéfalo, nas raízes dos gânglios dorsais, nas meninges e nas células estruturais que constituem o SNC. A sua principal função é oferecer proteção mecânica ao SNC (Kingsley, 2001; Fishman, 1980; Jurado c, 1990).

O LCR deixa os ventrículos laterais pelo Forame de Monro (forame interventricular), passa pelo terceiro ventrículo e alcança o quarto ventrículo pelo aqueduto do mesencéfalo (aqueduto cerebral). Existem duas aberturas ventriculares laterais localizadas nos recessos laterais do quarto ventrículo (Forame de Luschka) e uma abertura ventricular mediana na linha média do assoalho do quarto ventrículo (forame de Magendie), pelos quais o LCR atinge o espaço subaracnóideo. O LCR preenche a extensão tubular do espaço subaracnóideo em torno da medula espinhal, difundindo-se para cima novamente, através de um movimento lento, até alcançar as vilosidades aracnóideas na parede do seio sagital superior, onde o LCR será reabsorvido e incorporado novamente à corrente sanguínea venosa (Clarck, 1976; Thompson, 1995; Fishman, 1980; Jurado & Walker, 1990).

### **1.6.1- Barreira Hemato-Liquórica e Barreira Hemato-Encefálica**

Existe uma interface entre o sistema vascular e o LCR e outra entre o sistema vascular e o compartimento extracelular do SNC chamadas de barreira hemato-liquórica (BHL) e barreira hemato-encefálica (BHE), respectivamente. As interfaces são formadas pelas junções fechadas das células epiteliais especializadas dos capilares que

compõem a vasculatura encefálica e o plexo coróide, impedindo a passagem de moléculas e íons para o LCR e o compartimento extracelular do SNC (Kingsley, 2001).

A concentração de proteínas do LCR é definida pela interação entre o fluxo molecular e o fluxo do LCR. O transporte difusão-dependente de proteínas do cérebro e do sangue para o LCR, segue as leis da difusão de acordo com o tamanho da molécula, ou seja, quanto maior a molécula protéica, mais lentamente atinge o LCR e maior é o gradiente de concentração. O conteúdo protéico do LCR é 250 vezes inferior ao do plasma e os níveis de Imunoglobulina G (IgG), Imunoglobulina A (IgA) e Imunoglobulina M (IgM) são, respectivamente, cerca de 500, 1000 e 5000 vezes inferior no LCR, em comparação com os níveis plasmáticos (Reiber, 1998, 2001; Thompson 1995; Gerber *et al*, 1998; Sindic *et al*, 2001).

É possível calcular o perfil de proteínas através do quociente da concentração dado pela concentração da albumina do LCR dividida pela albumina do soro (Quociente de Albumina - Qalb), que é um dos métodos importantes para o reconhecimento precoce de doenças neurológicas caracterizadas por disfunção da BHL (Thompson, 1995; Puccioni -Sohler, 1996; Gerber *et al*, 1998; Sindic *et al*, 2001; Heringer *et al*, 2005).

A produção de LCR é raramente afetada nas anormalidades do plexo coróide. No LCR normal, cerca de 80% das proteínas são provenientes do plasma e 20% são sintetizadas no encéfalo. Nas doenças neurológicas, a disfunção da BHL pode ter

diferentes causas, **(i)** redução da produção do líquido **(ii)** obstrução do fluxo no espaço subaracnóideo e **(iii)** obstrução da passagem através das vilosidades aracnóideas, que induzirá:

- a) a redução da renovação da troca do conteúdo LCR com um conseqüente aumento da concentração protéica no LCR, tendendo a diminuir o fluxo do LCR.
- b) o aumento da permeabilidade para albumina e outras grandes moléculas, ocasionando o aumento do fluxo de proteínas do tecido para o LCR na borda do espaço subaracnóideo (Thompson, 1995; Gerber *et al*, 1998; Reiber 1998,2001).

A BHL permite a passagem de grandes proteínas e, assim todas as proteínas séricas chegam ao LCR em condições normais. Qualquer aumento nos níveis de albumina do LCR é resultante do aumento da transudação do sangue. Portanto, o quociente de albumina (LCR/soro) é um marcador da integridade das BHL. O Qalb é utilizado como parâmetro da função da BHL, uma vez que a albumina é sintetizada nos hepatócitos e não é catabolizada no SNC (Reiber, 1998; Puccioni-Sohler 1996; Sindic *et al*, 2001).

Nas infecções agudas do SNC há aumento da concentração protéica do LCR devido:

- a) os leucócitos migram do tecido nervoso para o LCR,
- b) as BHE e BHL se tornam permeáveis para albumina e outras grandes moléculas e

- c) a resistência de saída do fluxo do LCR para deixar o espaço subaracnóideo pode aumentar, tendendo a diminuir o fluxo do LCR.

A migração dos leucócitos e a entrada de proteínas no LCR podem variar de acordo com a localização do espaço subaracnóideo, levando a uma variação na razão de leucócitos e proteínas entre o LCR ventricular, cisternal e lombar. No foco infeccioso, ocorre o estímulo de produção de leucócitos e o aumento da transudação de proteínas. Por hipótese, quanto mais próximo do foco infeccioso bacteriano, o LCR coletado apresentará maior concentração de leucócitos e proteínas, que no LCR coletado de local mais afastado do foco (Gerber et al, 1998; Reiber, 2001; Heringer *et al*, 2005).

Da mesma forma que a albumina, em condições normais, a IgG encontrada no LCR é proveniente do soro e não de produção dentro do SNC. A nefelometria é utilizada para a rápida determinação da concentração de imunoglobulinas, entre outras proteínas, em diferentes fluidos corporais inclusive no LCR (Puccioni-Sohler, 1996).

### **1.6.2- Síntese Intratecal de Anticorpo Específico**

A detecção da síntese intratecal de anticorpos (Ac) é feita através do cálculo da proporção da média entre o quociente LCR/soro para anticorpos específicos e anticorpos totais. Este índice de anticorpo (AI) discrimina a fração no LCR dos anticorpos específicos derivados do sangue daqueles de produção intratecal. Na ausência de síntese intratecal de anticorpo específico, a relação entre anticorpos

específicos e totais é igual a 1; considerando que ambos possuem o mesmo peso molecular. Valores deste quociente  $>1,5$  indicam síntese intratecal de anticorpos específicos (Reiber, 2001).

As bandas oligoclonais ocorrem freqüentemente nas doenças inflamatórias do SNC. O termo oligoclonal define proteína com características eletroforéticas semelhantes e provenientes da mesma população de células imunocompetentes. A detecção de bandas oligoclonais de IgG específicas no LCR, pela focalização isoelétrica, é o método mais sensível a detectar e de demonstrar sua produção intratecal. As bandas oligoclonais podem ocorrer na ausência de níveis elevados de gamaglobulinas no LCR. A presença de bandas oligoclonais no LCR, que não aparecem no soro correspondente, é considerada como prova de reação imune humoral no SNC (Sindic *et al*, 2001; Puccioni-Sohler, 1996).

### **1.6.3- Síntese Intratecal de Anticorpos Específicos na Meningite Tuberculosa**

A MBK é caracterizada pela síntese intratecal de IgG oligoclonal, comprovadamente contra antígenos micobacterianos. Esses anticorpos podem persistir por vários anos. As bandas oligoclonais específicas de IgA, no LCR são raramente detectáveis (<5%) quando demonstradas por medidas quantitativas. A síntese intratecal de IgA é observada em meningite purulenta, meningite tuberculosa e encefalite herpética (Sindic *et al*, 1990, 2001).

## 1.7- PATOGÊNESE

A fala, a tosse e o espirro de um paciente bacilífero lança no ar gotículas contaminadas com 1 a 2 bacilos, chamados de núcleos de Wells. Essas partículas infectantes podem se depositar nos objetos, podem ser retidas pela mucosa do trato respiratório superior e serem removidas pelo mecanismo muco-ciliar dos brônquios ou podem atingir os bronquíolos e alvéolos e assim iniciar o processo infeccioso (Rieder, 2001).

A chance de uma pessoa se infectar após contato com um paciente bacilífero depende da concentração de bacilos expelidos pela fonte (multi-bacilíferos, paucibacilíferos e não-bacilíferos), da intensidade e frequência do contato com o paciente tuberculoso, de condições ambientais (circulação de ar e ventilação, exposição à luz) e da resposta imune do indivíduo exposto (Rieder, 2001).

Ao alcançar o espaço alveolar, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos locais. Os bacilos se proliferam livremente no interior dos macrófagos, pois são incapazes de destruí-los ou inativá-los, até que eles se rompem, liberando os bacilos para infectar outros macrófagos. Novos macrófagos são atraídos para o local, desenvolvendo um foco pneumônico. Os bacilos são drenados para os linfonodos hilares e mediastinais satélites e, em seguida atingem a corrente sanguínea, disseminando-se para diversos órgãos e sistemas, onde também começam a se proliferar (Rieder, 2001).



Após 3 a 8 semanas a imunidade celular se desenvolve e os linfócitos T helper CD4+, específicos para os antígenos bacilares, se proliferam ativando os macrófagos através de interleucinas, citocinas ou linfocinas, promovendo o recrutamento e a ativação de outros macrófagos e linfócitos.

Os macrófagos aumentam seu citoplasma, acumulam-se em volta do foco de infecção primária e nos focos de disseminação linfonodal e hematogênica, formando um granuloma, chamado de nódulo de Ghon. No centro do granuloma, forma-se uma área de necrose caseosa devido a liberação de citocinas pelas células inflamatórias, capaz de causar dano aos tecidos e às micobactérias (Alderson *et al*, 2000; Newport *et al*, 1996; Cooper *et al*, 1993; Flynn *et al*, 1993).

O INF-g é um importante mediador da ativação de macrófagos e resistência aos bacilos intracelulares, exercendo papel crucial na imunidade celular protetora à infecção tuberculosa. Sua produção ativa macrófagos mais eficientes para a destruição intracelular do bacilo. Na tentativa de controlar a infecção, o sistema imunológico gera inflamação e destruição tecidual através da liberação de grandes quantidades de proteases, lipases e nucleases pelos macrófagos ativados que circundam o foco caseoso. Se o foco de necrose caseosa se liquefazer e atingir um brônquio, erodindo a sua parede, permitirá a comunicação com o espaço aéreo rico em oxigênio, a proliferação celular aumenta e surge a caverna tuberculosa (Alderson *et al*, 2000; Newport *et al*, 1996; Cooper *et al*, 1993; Flynn *et al*, 1993).

Estima-se que cada paciente bacilífero infecte cerca de 10-15 pessoas, apenas respirando, mantendo-se assim o ciclo vital do bacilo de Koch. Durante a disseminação linfo-hematogênica da primo-infecção, o bacilo se aloja em múltiplos focos subependimários, localizados nas adjacências da meninge, chamados focos de Rich. Nos pacientes suscetíveis, esses focos continuam se proliferando, formando granulomas que expõem bacilos para o espaço subaracnóideo. Com a ruptura dos focos de Rich, os macrófagos ativados produzem Fator de Necrose Tumoral (TNF) gama e alfa, Complemento 5a (C5a), Leucotrienos B4 (LTB4), Interleucina 8 (IL8), Interleucina 6 (IL6), Interleucina 1 beta, fator de estimulação de colônias de granulócitos (TGF) e monócitos. Acredita-se que o C5a, os LTB4 e a IL8 são fatores que mobilizam e ativam neutrófilos. Após horas ou dias, segue-se a resposta linfocitária. O TNF alfa está relacionado à gravidade da doença e pode contribuir para a necrose tissular, enquanto que o TGF beta inibe a ativação de macrófagos e a IL2 melhora a resposta imune nos pacientes com sorologia positiva para HIV (Thwaites *et al*, 2000; Patel *et al*, 2002; Marinho *et al*, 1997).

Na meningite tuberculosa o efeito antigênico das proteínas do bacilo promove uma intensa reação inflamatória por fenômeno de hipersensibilidade do tipo IV, desencadeando a formação de exsudato no espaço subaracnóideo, vasculite obliterativa e encefalite ou mielite (Thwaites *et al*, 2000; Dastur *et al*, 1995).

O intenso estímulo inflamatório dos macrófagos provoca uma aracnoidite proliferativa, formando um exsudato espesso que se concentra na base do crânio e suas cisternas. O exudado é formado por células mononucleadas grandes e pequenas,

incluindo células epitelióides, fibrina e macrófagos que podem se fundir formando as células gigantes de Langhans. Com o aumento do volume do exsudato, ele pode comprimir a origem de nervos cranianos, principalmente o II, IV e VI, e provocar vasculite dos vasos de pequeno e médio calibre localizados nesta região, como a artéria carótida interna e os vasos perfurantes para os gânglios da base. Os infartos cerebrais causados pela vasculite são os principais responsáveis pelas seqüelas irreversíveis da doença. O exsudato espesso obstrui a passagem de LCR pelas cisternas ou a sua drenagem nas granulações aracnóides, levando a uma complicação comum da doença que é a hidrocefalia. Esta também pode ser causada pelo bloqueio da circulação em torno do aqueduto de Silvius e do terceiro ventrículo pelos tuberculomas. A encefalite tuberculosa é uma extensão do processo inflamatório no parênquima cerebral (Thwaites *et al*, 2000; Thwaites & Tran, 2005; Dastur *et al*, 1995).

## 1.8- CLINICA

O quadro clínico da meningite tuberculosa é, geralmente, de início gradual, ocorrendo em um período de aproximadamente três semanas, embora alguns casos possam ter um começo abrupto marcado pelo surgimento de convulsões. Em 1948, o British Medical Research Council desenvolveu um método de estadiamento da gravidade de doença. De acordo com este método, a evolução clínica da infecção é dividida em três estádios, conforme descrito abaixo (BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1948; apud Fundação Nacional de Saúde, 2002):

**Estádio I:** Em geral, tem duração de uma a duas semanas e se caracteriza pela inespecificidade dos sintomas, podendo ocorrer febre, mialgias, sonolência, apatia, irritabilidade, cefaléia, anorexia, vômitos, dor abdominal e mudanças súbitas do humor. Estes sintomas são comuns a qualquer processo inespecífico, além de rigidez de nuca (75% dos adultos e incomum em crianças) com sinais de Kernig e Brudzinski (a rigidez de nuca é um sinal inespecífico também). Nessa fase, o paciente pode encontrar-se lúcido e o diagnóstico geralmente é estabelecido pelos achados do LCR.

**Estádio II:** Após uma ou duas semanas, a doença se caracteriza pela persistência dos sintomas sistêmicos, mas surgem evidências de dano cerebral manifestada pelos sinais de localização e de hipertensão intracranianos (principalmente com acometimento nervos cranianos III, V, VII), anisocoria, vômitos, ausência de reflexos abdominais e convulsões que podem ser tônicas ou clônicas, focais ou generalizadas. Nessa fase, alguns pacientes apresentam manifestações de encefalite com tremores periféricos, distúrbios da fala e movimentos atetóides das extremidades.

**Estádio III:** O terceiro estágio, ou período terminal é caracterizado pelo déficit neurológico focal, opistótono, rigidez de nuca, alterações do ritmo cardíaco e da respiração, seguidos de graus variados de perturbação da consciência, incluindo o coma. Nos casos não-tratados, a morte ocorre após cinco a oito semanas do início da doença. Em qualquer estágio clínico da doença, podem-se observar convulsões focais ou generalizadas.

A apresentação clínica da meningite tuberculosa é semelhante às outras meningoencefalites. Como a cultura do LCR para MTB tem baixa sensibilidade e em alguns casos de MBK ou de meningites bacterianas não é possível identificar o agente causador, alguns critérios diagnósticos para MBK têm sido propostos como método auxiliar dos métodos laboratoriais, com o objetivo de acelerar o diagnóstico e o início da terapia específica.

Antes do surgimento da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS/SIDA) pela infecção por HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), a meningite tuberculosa afetava principalmente as crianças, principalmente as dos países em desenvolvimento. A infecção por HIV é um fator predisponente para a infecção com MTB, podendo a incidência variar de acordo com a raça, as condições socioeconômicas, a idade e o sexo. A apresentação clínica da tuberculose em pacientes imunodeprimidos é diferente dos imunocompetentes e, dentre as formas extrapulmonares a forma meníngea é a mais grave com alta morbidade e mortalidade. Porém a apresentação clínica da MBK não se altera com a co-infecção com o HIV (Chandramuki *et al*, 2002).

Thwaites *et al* (2002), propuseram um critério diagnóstico com sensibilidade de 98,4% e especificidade de 43,5% quando uma ou mais variáveis estão presentes e sensibilidade de 98,3% e especificidade de 54,5% quando três ou mais variáveis estão presentes. De acordo com este método, o diagnóstico de MBK é feito a partir do isolamento do MTB no LCR ou a presença de sinais e sintomas de meningite com microscopia negativa ou cultura para bactérias e fungos negativa no LCR, associado a

um ou mais dos seguintes características: **(i)** tomografia computadorizada de crânio compatível com MBK (hidrocefalia, edema, captação meníngea basal de contraste); **(ii)** radiografia de tórax com sinais de atividade de tuberculose pulmonar e **(iii)** boa resposta à terapia antituberculosa.

Porém, como o desempenho do método varia de acordo com a área de prevalência da doença e o início da terapia empírica para MBK, Thwaites et al (2002) desenvolveram um método diagnóstico usando dados clínicos e laboratoriais de adultos com suspeita de MBK, em área endêmica, que apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 79%. Foram desenvolvidas duas classificações diagnósticas: a primeira durante a admissão do paciente e a segunda após 48 horas do uso de um antibiótico de largo espectro:

1. Durante a admissão do paciente, se o exame de LCR mostrar uma leucometria menor que  $760 \times 10^3$  cel/ml associado a uma história de doença menor que seis dias e leucocitose menor que  $10200 \times 10^3$  cel/mL, trata-se de MBK. Neste mesmo paciente, se a leucocitose for maior que  $10200 \times 10^3$  cel/ml, trata-se de meningite bacteriana. Caso o exame de LCR mostre uma leucometria menor que  $760 \times 10^3$  cel/ml associado a uma história de doença maior que 6 dias, trata-se de MBK. Se o exame de LCR mostrar uma leucometria maior que  $760 \times 10^3$  cel/ml associado a uma história de doença menor que 7 dias, trata-se de meningite bacteriana. E se o exame de LCR mostrar uma leucometria maior que  $760 \times 10^3$  cel/ml associado a uma história de doença maior que 7 dias e idade menor que 42 anos, trata-se de MBK. Neste caso, se a idade for maior que 42 anos, trata-se de meningite bacteriana (Thwaites *et al*, 2002).

2. Após 48 horas de uso de um antibiótico de largo espectro, se a história da doença for menor que oito dias, associado a neutrófilos no sangue menor que 80% e neutrofilorraquia menor que 81%, trata-se de MBK. Neste mesmo caso, se a neutrofilorraquia for maior que 81%, trata-se de meningite bacteriana. Se a história da doença for menor que 8 dias, associado a neutrófilos no sangue maior que 80%, trata-se de meningite bacteriana. Já, se a história da doença for maior que 8 dias e a proporção de glicose no LCR/soro for menor que 100%, trata-se de MBK. Neste mesmo caso, se a proporção for maior que 100%, trata-se de meningite bacteriana (Thwaites *et al* 2002).

Sunbul *et al* (2005) realizaram um estudo retrospectivo em pacientes com sorologia negativa para HIV com meningite, para avaliar a aplicabilidade dos critérios diagnósticos de Thwaites. Este estudo concluiu que os critérios são úteis para o diagnóstico da MBK, porém deve ser validado em uma amostra maior de pacientes com meningite viral e glicorraquia baixa. A sensibilidade e a especificidade foram de 95,6% e 70,8%, respectivamente, enquanto que nos casos microbiologicamente provados, a sensibilidade e a especificidade foram de 91,7% e 79,7%, respectivamente.

Kumar *et al* (1999) usando critérios clínicos e laboratoriais para diferenciar MBK e meningite bacteriana em crianças, o diagnóstico de MBK foi definido positivo quando a cultura ou baciloscopia no LCR era positiva, ou havia captação meníngea de contraste na base à tomografia computadorizada e resposta clínica à terapia antituberculosa. Os critérios foram utilizados na presença de uma das seguintes características: a) sinais

prodrômicos mais que 7 dias; b) fundoscopia com atrofia óptica; c) déficit focal; d) desordens do movimento e d) leucorraquia com menos de 50% de neutrófilos a sensibilidade do critério foi de 98,4% e especificidade de 43,5%. Se três ou mais estiverem presentes, a sensibilidade será de 54,5% e a especificidade de 98,3%.

Alguns trabalhos sugerem que a co-infecção HIV-BK além de aumentar as chances de desenvolvimento da TB, altera a apresentação clínica desta e também aumenta as chances de seu envolvimento extrapulmonar. Entre as formas extrapulmonares da tuberculose em pacientes imunodeprimidos, como meningoencefalite, abscesso cerebral e tuberculoma, a forma meníngea é a principal causa de meningite nesses pacientes em áreas endêmicas e também é a forma mais grave com alta morbimortalidade, sendo que seu risco aumenta com a diminuição da carga de CD4 (Berenguer *et al*, 1992; Thwaites *et al*, 2000; Thwaites & Tran, 2005; Yechoor *et al*, 1996).

Embora a MBK em pacientes HIV positivos não altere a sua apresentação clínica, laboratorial, resposta ao tratamento e prognóstico, altera o número e a natureza das complicações da doença (Garg *et al*, 1999).



## 1.9- DIAGNÓSTICO

A MBK é uma grave doença, que se não for diagnosticada e tratada precocemente, leva a uma alta taxa de mortalidade e de morbidade. Os métodos laboratoriais têm um papel importante no seu diagnóstico e no monitoramento da resposta terapêutica.

O diagnóstico precoce da MBK é de difícil realização. O diagnóstico é estabelecido através da suspeita da história e dos sintomas clínicos, associado ao exame citológico do LCR. Apesar das anormalidades do LCR na MBK serem sugestivas, a sua apresentação clínica é similar às outras meningoencefalites de etiologias viral, bacteriana (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*) e fúngica (*Cryptococcus neoformans*) (Fundação Nacional de Saúde, 2002).

O diagnóstico definitivo é feito pela demonstração do MTB no LCR, mas os testes microbiológicos são morosos e raramente positivos, assim testes alternativos (ELISA e “proteín chain reaction”) foram desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da MBK e diferenciá-la das outras meningites (Martins *et al*, 2000; Nunes *et al*, 1998; Daniel *et al*; 1987; Newton *et al*, 1994; Kumar *et al*, 1999; Chandramuki *et al*, 2002).

O diagnóstico precoce aumenta as chances de sobrevivência e existe uma relação direta entre a precocidade diagnóstica e o prognóstico. Porém, infelizmente, a maioria só é diagnosticada nos estádios avançados, justificando assim, a alta letalidade e as

freqüentes seqüelas. A morte ocorre nos casos de meningite tuberculosa não-tratados após 5 a 8 semanas do início da doença, com taxa de mortalidade de quase 100%. Nos pacientes tratados tardiamente, já em coma, a taxa de mortalidade é de quase 50%. A taxa de mortalidade global dos pacientes com tuberculose do SNC é significativa (cerca de 10%) com um risco maior nos lactentes e idosos. Estes dados refletem o resultado do diagnóstico tardio bem como a emergência de cepas infectantes resistentes às drogas tuberculostáticas (Fundação Nacional de Saúde, 2002; Bonington *et al*, 2000; Katrak *et al*, 2000).

Como a meningite tuberculosa não tratada geralmente é fatal, um critério clínico diagnóstico ou exame laboratorial para MBK deve ser sensível. Por isso, ao se desenvolver novos testes que auxiliem no diagnóstico da MBK, busca-se uma boa sensibilidade e especificidade associadas à facilidade operacional e rapidez. Porém, no momento, nenhum critério laboratorial simples, rápido, barato e acurado para o diagnóstico da MBK satisfaz essas exigências (Li *et al*, 1991; Kennedy *et al*, 1979).

### **1.9.1- Baciloscopia**

A pesquisa direta do bacilo pela técnica de Ziehl-Neelsen é o principal método de rotina laboratorial para o diagnóstico da MBK, por ser o mais simples e rápido. Porém a confirmação bacteriológica é difícil, pois sua sensibilidade varia entre 10%–40% (Chandramuki *et al*, 2002; Thwaites *et al*, 2004). No Brasil, a sensibilidade varia de 4,8% a 91% (Ceuci *et al*, 1998; 1996; Martins *et al*, 2000; Heringer *et al*, 2005).

O LCR contém poucos bacilos (paucibacilar), assim a sensibilidade da bacterioscopia varia de acordo com o local da coleta, com o volume de LCR examinado, com a velocidade e a duração da centrifugação, o tempo gasto no exame da microscopia, além da quantidade de coletas seriadas feitas. Radhakrishnan et al (1990) e Heringer et al (2005) sugerem que o local da coleta influi na positividade, pois quanto mais próximo do local da lesão, ou seja, o exsudato inflamatório localizado na cisterna da base, maior deve ser a acurácia da baciloscopia. Fallon & Kenned (1993) mostraram que ao se examinar três ou mais amostras de LCR do mesmo paciente, em punções seriadas, a positividade da baciloscopia aumenta de 37% para 81%. Já Thwaites et al (2004) mostraram que a acurácia da baciloscopia aumenta quando o volume de LCR coletado é maior que seis mL e examinado por pelo menos 30 minutos, preferencialmente nas áreas da lâmina que contém maior densidade celular.

### **1.9.2- Cultura**

A cultura de LCR no meio de Lowenstein-Jensen para o isolamento do bacilo é considerada o método-padrão, para a confirmação diagnóstica da meningite tuberculosa. Porém, este exame é importante do ponto de vista epidemiológico e não clínico, pois demora de 45 a 60 dias para ser obtido o resultado. Além disso, sua sensibilidade varia entre 25 a 70% (Fundação Nacional de Saúde, 2002; Chandramuki *et al*, 2002).

Selvakumar et al (1996) sugerem em seu trabalho que a associação da centrifugação e filtração do LCR possa aumentar a positividade da cultura. Radhakrishnan et al (1991) mostraram positividade maior da cultura com LCR coletado na cisterna da base (87.5%) e nos ventrículos (75%), em comparação com o LCR lombar (20%), o que também sugere que a sensibilidade da cultura pode variar de acordo com a localização da coleta, assim como ocorre na baciloscopia.

Tan et al (1999) analisaram os aspectos clínicos de 18 pacientes com sorologia negativa para HIV que tiveram cultura positiva e observaram que a positividade da cultura está relacionada a um mal-prognóstico da MBK, estando mais positiva em pacientes nos estádios avançados da doença e com hidrocefalia.

### **1.9.3- Método Radiométrico (BACTEC)**

A técnica do BACTEC utiliza os princípios de radiometria. O LCR é semeado em um meio de cultura líquido (Middlebrook 7H-12A ou 7H-12B) que contém antibióticos, suplementos e o ácido palmítico marcado com substância radioativa, Carbono 14 ( $^{14}\text{C}$ ). Durante o crescimento, MTB metaboliza essa substância, convertendo-a em  $\text{CO}_2$  radioativo, que é detectado pelo aparelho após 14 dias, aproximadamente (Brooks *et al*, 1998; Katoch *et al*, 2004).

Dos 58 pacientes com MBK estudados por HOOKER et al (2003), o BACTEC foi positivo em 20 casos, enquanto que a cultura somente foi positiva em 12 casos e a PCR em um caso.

### 1.9.4- Reação em Cadeia de Polimerase

Desde o isolamento do bacilo de MTB H37Rv, em 1905, várias pesquisas foram desenvolvidas explorando seu potencial de virulência em modelos animais de tuberculose, inclusive sua manipulação genética para o desenvolvimento de métodos moleculares de auxílio ao diagnóstico (Cole *et al*, 1998 a, b; Cole & Barrel, 1998).

Os métodos moleculares vêm se tornando úteis para o diagnóstico das doenças infecciosas. Os métodos convencionais são de baixa sensibilidade em materiais paucibacilares, como o LCR, pois são dependentes da carga bacilar, assim como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Mas esta técnica é de alta sensibilidade podendo, teoricamente, amplificar o DNA alvo de apenas um bacilo (Katoch *et al*, 2004).

Basicamente existem duas técnicas da PCR para identificar o DNA de MTB: a primeira pela amplificação da seqüência de DNA que contém genes que codificam antígenos micobacterianos específicos; a segunda utiliza sondas genéticas baseadas na amplificação de seqüências repetitivas, específicas de MTB, tais como a IS6110. No caso da primeira, a especificidade varia de acordo com a escolha da seqüência a ser amplificada, podendo chegar a 100% caso a técnica seja realizada em local adequado e com profissionais especializados, de modo a evitar a contaminação cruzada. Para tal deve-se ter o cuidado de coletar o material em dois tubos, para que possam ser estocados separadamente para posterior contra-prova. Outra desvantagem desta técnica é a presença de substâncias, que funcionam como fatores inibidores nos

materiais analisados, que podem impedir a amplificação da seqüência de DNA, diminuindo a sua sensibilidade (Shankar *et al*, 1991; Monteyne *et al*, 1995).

Alguns métodos baseados nas sondas genéticas são licenciados pelo FDA (Food and Drug Administration, USA) para o uso em amostras de tuberculose pulmonar: o teste direto de amplificação de MTB (Gen-Probe, Inc., San Diego, Califórnia) e o teste AMPLICOR (Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, Ind.). Este métodos não foram liberados para uso em amostras de tuberculose extrapulmonar, inclusive no LCR. Existem vários estudos avaliando a acurácia deste método nos pacientes com MBK. Em 2003, Pai *et al* publicaram uma revisão sistemática com meta-análise de 49 testes PCR para MBK. Destes, 14 testes comerciais mostraram as melhores sensibilidade e especificidade (56% e 98%, respectivamente). Katoch *et al* (2004) comparou dados publicados sobre a acurácia dos testes baseados na PCR-IS6110, PCR-TRC-4 (seqüência de inserção TRC-4) e PCR-MPB64 observando sensibilidades 81%, 91% e 75%, e especificidade de 80%, 76% e 100%, respectivamente. Também em 2004, Thwaites *et al* e Johansen *et al* sumarizaram os dados estatísticos de estudos usando o Gen-Probe no LCR para o diagnóstico da MBK. A sensibilidade e a especificidade do teste variou entre 33% a 100% e 96 a 100%, respectivamente.

Apesar de ser um teste sensível e específico para o diagnóstico da MBK, esta técnica é laboriosa e o seu uso só é viável em centros com pessoal qualificado e estrutura física adequada, o que não atende as necessidades da rede pública de saúde dos países em desenvolvimento, que requer método diagnóstico simples, rápido e de baixo custo.

### 1.9.5- Enzime-Linked Immunosorbent Assay

Apesar da resposta imune não ser protetora na tuberculose, antígenos micobacterianos induzem a produção de anticorpos nos indivíduos doentes, os quais podem ser potencialmente úteis no diagnóstico precoce da MBK.

O teste Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) utiliza o conceito que antígenos ligados a uma fase sólida podem ser usados para determinar a presença de anticorpos em uma dada amostra. A quantidade de anticorpos ligados ao antígeno na fase sólida é uma medida da concentração de anticorpos da amostra original. Esta reação pode ser detectada pela adição de enzimas conjugadas a um segundo anticorpo em uma reação colorimétrica em presença do substrato da enzima ou pela adição de anticorpo conjugado com um marcador radioativo (Radio-imunoensaio) (Mims *et al*, 1995).

Vários estudos baseados na resposta imune aos antígenos micobacterianos foram realizados, sendo os testes imunoenzimáticos os mais atraentes por serem rápidos, de fácil operacionalidade, sensíveis e de relativo baixo custo. Radhakrishnan *et al* (1991) e Radhakrishnan & Mathai (1993), compararam a positividade da cultura a detecção de antígenos micobacterianos pelo método do ELISA nos compartimentos ventricular, cisternal e lombar. O trabalho mostrou que a cultura obteve uma positividade no LCR lombar, cisternal e ventricular de 20%, 75% e 87,5%, respectivamente, enquanto que a detecção de anticorpos contra o antígeno 5 não mostrou diferença estatística, estando

presente em concentração significativa, o que sugere que apesar da presença do bacilo variar, a presença de anticorpos é uniforme nos três compartimentos.

A sensibilidade e a especificidade do teste do ELISA no LCR como método diagnóstico da meningite tuberculosa varia de acordo com os antígenos e anticorpos estudados, além da diluição do LCR utilizada (Mathai et al 1990). Além de método diagnóstico, o teste ELISA pode ser usado como parâmetro para avaliar a resposta terapêutica através da presença de antígenos e anticorpos no LCR. O estudo de Desai et al (1993) mostrou que, após 4 semanas de tratamento, os antígenos persistiam no LCR, enquanto que o estudo de Kadival et al (1994) mostrou que em 6 semanas de acompanhamento os níveis de anticorpos caíram em todos os pacientes.



Tabela I. Resumo dos principais estudos da resposta imune no LCR, por ELISA, com diferentes antígenos micobacterianos e tipos de anticorpos.

TESTE ELISA	ANTIGENOS	ANTICORPO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	REFERENCIA
In-house	H37RV	IgG	79,73	100	DESAI 1993
Comercial	BCG-HRP	IgG	67,57	100	
In-house	CFP	Ac-HRPO conjugado	86	95	KASHYAP RS 2003
	CFP	IgG	85	94	2004
	30 kDa		80	91	
	30kDa		100	100	2005
In-house	MSE	IgG	97,72	95,35	MANIAR P 1990
In-house	PPD	IgG	90	100	BAIG SM 1995
In-house	Ag-5	IgG	84	92	MATHAI A 1990
In-house	H37Rv	IgG	67,8	100	RADHAKRISHNAN VV 1990
In-house	A60	IgG	60	100	SINGH 1999
	A60	IgM	75	100	
	A60	IgM + IgG	60	100	
In-house	H37RV	IgG	90	95,83	SRIVASTAVA KL 1998
In-house	A60	IgG	62,5	100	MAHESHUARI 2000
	A60	IgM	66,7	100	
	A60	IgA	75	100	
	A60	IgA + IgM	79,1	100	
	A60	IgG + IgA + IgM	79,1	100	
Comercial	A60	IgG	73,8	96,1	ALIFANO M 1998
	A60	IgA	69	93,6	
	A60	IgG + IgA	80,9	92,3	
In-house	38kDa	IgG	80	95	KADIVAL GV 1994
In-house	ESAT-6	IgG	10	100	CHANDRAMUKI A 2002
	14kDa	IgG	56	100	
	MPT-63		8	100	
	19kDa		6	100	
	MPT-64		12	100	
	38kDa		8	100	
Comercial	38 kDa/16 kDa	IgG	42	96	DEMLOW 2004
In-house	14kDa	IgG	75,67	100	SUMI MG 2002
			55,5 a 100	100	SUMI MG 2000
In-house	LAM	IgG	70,58	92,5	PATIL S.A 1996
	38kDa		41,17	92,5	
In-house	14kDa/LAM	IgG	74	100	CHANDRAMUKI A 1989
	14kDa/LAM/19kDa/38kDa		61	100	
In-house	CFP	IgG	70	100	ANNAMMA M 1990
In-house	Ag-5	IgG	70	100	RADHAKRISHNAN VV 1991
In-house	BCG	IgM + IgG	52	96	WATT G 1988

LAM: Lipoarabinomanan; H37RV: cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37; BCG: Bacilo de Calmette-Guerin; CFP: Proteína filtrada de cultura; kDa: Kilodalton; PPD: Derivado protéico purificado; Ag: antígeno; IgG: imunoglobulina G; IgM: imunoglobulina M; IgA: imunoglobulina A

### 1.9.6- Exames de Neuroimagem

A tomografia computadorizada (TC) e a ressonância nuclear magnética de crânio (RNM) são exames radiológicos importantes na definição do diagnóstico da MBK, pois são capazes de mostrar as alterações patológicas da doença além de dar informações sobre o prognóstico do paciente (Thwaites *et al*, 2000; Thwaites & Tran, 2005).

Os achados radiológicos incluem: captação de contraste na meninge basal e na fissura silviana, tuberculomas, hidrocefalia, infartos isquêmicos nas regiões talâmicas, nos gânglios da base e na cápsula interna. A angiorressonância pode também mostrar alterações nos vasos do polígono de Willis, como estreitamento ou a completa oclusão dos vasos (Garg *et al*, 1999; Thwaites *et al*, 2000; Berger *et al*, 1994; Jinkins *et al*, 1995).

Apesar de poucos trabalhos terem sido feitos com o objetivo de diferenciar os achados da MBK de outras doenças neurológicas, estes sugerem que a RNM é melhor que a TC para mostrar as alterações da MBK. Porém a RNM não é mais sensível para diferenciar a MBK de outras doenças, como meningite criptocócica, encefalite viral, sarcoidose, carcinomatose meníngea e linfoma (Thwaites *et al*, 2005; Offenbacher *et al*, 1991; Tartaglione *et al*, 1998; Kumar *et al*, 1999).

Thwaites et al 2002, usou as características neurorradiológicas da MBK determinadas pela TC, como hidrocefalia, edema e captação meníngea basal de contraste, como critério para o diagnóstico diferencial da MBK com a meningite bacteriana. Kumar et al (1996) comparou a TC de 94 crianças com MBK e 52 crianças com meningite piogênica, tendo concluído que a presença de captação meníngea basal de contraste ou tuberculoma, ou ambos, tem sensibilidade e especificidade de 89% e 100%, respectivamente. Verdon et al (1996) revisaram 48 casos de MBK, e 51% apresentaram hidrocefalia, 38% captação meníngea, 36% ambas as características, 13% infartos isquêmicos e em 11% tuberculomas. Garg et al (1999) em sua revisão sobre a MBK, mostraram que a frequência de infartos na TC varia de 20,5% a 38%. Monteyne et al (1995) descreveu uma associação entre tuberculomas e MBK que varia de 28% a 65%. Segundo Andronikou et al (2004), a característica mais específica da MBK é o sinal de hiperdensidade na base antes da administração de contraste e a característica mais sensível é a captação de contraste na meninge basal. A combinação de hidrocefalia, infartos e captação de contraste são específicas, mas tem baixa sensibilidade (41%).

## 2- JUSTIFICATIVA

As dificuldades de se realizar o diagnóstico precoce da MBK estão bem ilustradas na literatura descrita.

O diagnóstico precoce aumenta as chances de sobrevivência e existe uma relação direta entre a precocidade diagnóstica e o prognóstico, porém, infelizmente, a maioria só é diagnosticada nos estágios avançados, justificando assim, a alta letalidade e as freqüentes seqüelas.

Nos casos de meningite tuberculosa não-tratados, após 5 a 8 semanas do início da doença, evolui para o óbito. A gravidade da MBK é confirmada pela alta taxa de mortalidade (58,6%), que se acentua ainda mais nos menores de 4 anos (73,3%) (Nunes *et al*, 1998).

Estes dados refletem a emergência da resistência aos agentes anti-tuberculose em alguns pacientes bem como o diagnóstico tardio, ocasionada pela falta de métodos sensíveis e específicos. Portanto, testes acurados, de operacionalidade simples e de baixo custo seriam importantes para auxiliar o diagnóstico na rede pública (Davis *et al*, 1993).

Como a meningite tuberculosa não tratada geralmente é fatal, um critério clínico diagnóstico ou exame laboratorial para MBK deve ser sensível. No momento, nenhum critério laboratorial rápido e barato para o diagnóstico da MBK satisfaz essa exigência.

Estudos baseados na resposta imune para os antígenos micobacterianos têm sido realizados, sendo os testes imunoenzimáticos mais atraentes por serem rápidos, de fácil operacionalidade, sensível e relativo baixo custo, quando comparado aos testes moleculares. Porém, devido a variação na sua sensibilidade e especificidade, estes testes ainda não são usados na rotina laboratorial.

Com o desenvolvimento dos métodos moleculares e elucidação do genoma de MTB H37Rv, foram disponibilizados antígenos específicos de natureza protéica, sendo necessária a avaliação da reatividade desses antígenos nas infecções tuberculosa extra-pulmonares em áreas endêmicas.

## 3- OBJETIVO

### 3.1- Objetivo Geral

Avaliar a imunorreatividade dos anticorpos do tipo IgG, IgM e IgA no LCR, aos antígenos micobacterianos obtidos por recombinação genética, MT-10.3 e MPT-64, na meningite tuberculosa.

### 3.2- Objetivos específicos

- 1) Estimar a sensibilidade, especificidade, dos testes imunoenzimático “in house” para IgG, IgM e IgA, utilizando os antígenos, MT-10.3 e MPT-64, no LCR de pacientes com meningite tuberculosa.
- 2) Correlacionar os parâmetros de celularidade e bioquímicos nos LCR com a resposta imune aos antígenos MPT-64 e MT-10.3.

## 4- MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1- DESENHO DO ESTUDO

Consiste em um estudo retrospectivo, transversal, envolvendo o uso de sobras de amostras da rotina, estocadas nos Laboratórios de Líquido Cefalorraquiano do HUCFF/UFRJ e do Laboratório NEUROLIFE LTDA, Rio de Janeiro, durante o período de junho de 1999 a maio de 2005. O desenvolvimento dos testes imunoenzimáticos para avaliação da resposta imune humoral foi realizado no Departamento de Micobacterioses-IOC, Fundação Oswaldo Cruz.

### 4.2- CASUÍSTICA

O estudo inclui sobras de amostras de LCR de pacientes que tiveram cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis*. Como controle não inflamatório, foram utilizadas sobras de amostras de LCR provenientes da rotina de pacientes com queixas de cefaléia e exame do LCR normal. Sobras de amostras de pacientes com o diagnóstico de esclerose múltipla (EM), definida por critérios clínicos de McDonald *et al* e Índice de IgG maior que 0,7 foram utilizadas como controle inflamatório (McDonald *et al*, 2001). A esclerose múltipla é uma doença inflamatória, auto-imune caracterizando-se pela presença de placas de desmielinização no SNC e se apresenta clinicamente

por surtos de parestesias, paresias, ataxia, neurite óptica, alterações esfínterianas e outras síndromes neurológicas (McDonald *et al*, 2001; Poser, 1993).

.As amostras foram obtidas na liquoteca do LABORATÓRIO NEUROLIFE LTDA, a partir do banco de dados PGLAB, que é um laboratório de análise de LCR para dar apoio diagnóstico aos hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro. Os dados de anamnese são sucintos e o material é cadastrado ao entrar no laboratório de acordo com a suspeita diagnóstica do médico solicitante. Portanto, não há dados disponíveis sobre vacinação, PPD e contatos com portadores de tuberculose, bem como dados de acompanhamento diagnóstico e terapêutico. As amostras foram obtidas de pacientes com suspeita de MBK que foram submetidos à raquicentese e examinados para citologia global e específica, dosagem de glicose e proteínas, exame direto para germes comuns (coloração de Gram), BAAR (coloração de Zielh-Neelsen) e fungos, látex para germes comuns e criptococos, cultura para bactéria, fungo e BK. A detecção de anticorpos anti-HIV foi realizada pelo teste de ELISA Genscreen (BioRad, França). Após a realização dos testes de rotina, as amostras foram aliquotados em tubos de microcentrífuga e estocados em freezer -20 °C até o uso.

### 4.3- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- 1- Controle Positivo: Amostras de pacientes que preencheram os critérios diagnósticos para meningite tuberculosa, caracterizada por sinais meníngeos, cefaléia, febre, vômito, alteração do nível de consciência,



déficit neurológico focal, alteração clínica dos nervos cranianos e crises convulsivas, associado à demonstração do agente etiológico no LCR (cultura ou baciloscopia positiva).

- 2- Controle Negativo Inflamatório: Amostras de pacientes que preencheram os critérios diagnósticos de Esclerose Múltipla, segundo Critérios de Mc Donald e Índice de IgG maior que 0,7.
- 3- Controle Negativo Não-Inflamatório: Amostras de pacientes com cefaléia e exame de LCR normal.

#### 4.4- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Amostras de pacientes menores de 18 anos.

#### 4.5- AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Para os experimentos de detecção de anticorpos foram utilizadas a técnica de ELISA que foi padronizada “in house”.

#### 4.6- ANTÍGENOS

Os antígenos protéicos utilizados neste trabalho, MT-10.3 e MPT-64, foram gentilmente doados pelo Dr. M. Singh (Lionex Diagnostics & Therapeutics GmbH, Braunschweig, Germany) dentro do acordo de Cooperação Brasil x Alemanha com o

Departamento de Micobacterioses da Fundação Oswaldo Cruz. Os antígenos foram obtidos por recombinação genética e expressos em *Escherichia coli*, resumidamente: os genes codificantes de cada antígeno foram submetidos à amplificação por PCR, os fragmentos obtidos foram clonados em vetor plasmidial e as proteínas foram expressas em *E. coli* e purificadas (*amylose resin affinity chromatography*). Contaminação das frações antigênicas foram purificadas pelo sistema *Mono Q anion exchange chromatography*. Purificação final foi feita por diálise e as proteínas foram aliquotadas e liofilizadas. A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Lowry.

#### 4.7- ENSAIO IMUNOEZIMÁTICO PARA LCR COM OS ANTÍGENOS MPT-64 E MT-10 (**Liq-EIA**)

##### 4.7.1- Adsorção dos antígenos ao suporte sólido (poços da microplaca)

Os antígenos foram diluídos nas concentrações de 1 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato. Cinquenta µl de cada antígeno foram depositados nos poços das microplacas de ELISA (Nunc flat bottom, immunoplate C96 Maxisorp, Thomas Sci, USA), e em seguida incubadas por duas horas a 37°C. Ligações inespecíficas foram bloqueadas pela adição de 100 µl, em cada poço, de solução tampão salina fosfato adicionado de Tween 20 a 0,01% (PBSt) e contendo albumina sérica bovina a 5% (BSA, (fraction V, Sigma, USA) e novamente incubada por duas horas a 37°C. Em seguida os poços foram lavados quatro vezes com 200 µl de PBSt e utilizadas

imediatamente ou armazenadas a 4°C em sacos plásticos selados por no máximo, uma semana.

Para os testes de padronização e controle das placas foram preparados concentrados de controles positivos e negativos contendo alíquotas de 10 µl de 16 diferentes amostras de LCR oriundos de pacientes com MBK, para os controles positivos, e de Esclerose Múltipla e cefaléias (Não-MTB), para os controles negativos, que foram aliqüotados em microtubos contendo glicerol volume a volume (Vetec, RJ). Os concentrados de positivos e negativos foram diluídos seriadamente de 1:10 a 1:1600 (razão de 2x) em PBSt-BSA 1% e 50 µl de cada diluição foram adicionados aos poços previamente adsorvidos com os antígenos. Depois de incubação por 60 min a 37°C, as placas foram lavadas como descrito acima e 50 µl de cada solução de anticorpos anti IgG e A humana ligadas a peroxidase (conjugados) (Sigma, USA) e anticorpos anti IgM humana (Pierce, Germany), previamente diluídas a 1:800, 1:2000 e 1:20000 em solução de PBSt-BSA a 1%, respectivamente, foram depositadas nos respectivos poços. Após incubação de 1h/37°C, procedeu-se a lavagem como descrito acima. As reações foram revolvidas com a adição de 50 µl de solução substrato de trimetilbenzidina (TMB, SH, Germany) e as placas foram incubadas em local escuro à temperatura ambiente. A reação de cor foi interrompida com a adição de 100 µl de ácido sulfúrico 2,5 M. A intensidade das reações foi determinada com o uso de leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS Plate Reader, USA) em dois comprimentos de onda (450/630 nm) com movimento contínuo, para controlar possíveis variações de absorbância (condensação, impressão digital). Os resultados serão expressos em densidade ótica (DO) x 1000.

As diluições das amostras de LCR e conjugados a serem utilizadas para testar a amostragem proposta, foram definidas pelas reações antígeno x anticorpo ideal, isto é, as que mostraram maior discriminação entre os concentrados de MBK em relação aos concentrados de não MBK.

Em todas as placas teste foram adicionados os concentrados positivos (MTB) e negativos (não MTB) em no mínimo quatro diluições para servir como controle das placas nos testes realizados no mesmo dia ou em dias diferentes. Cada placa continha um poço com controle branco e a DO da solução branco (Solução substrato) não ultrapassou o valor de 100. Quando isto ocorreu, devido a um erro operacional nas etapas de lavagem, os testes foram repetidos. Todos os testes foram realizados em duplicata e os seus valores não excederam 25% do valor médio das duplicatas. Quando isto ocorreu o teste foi repetido.

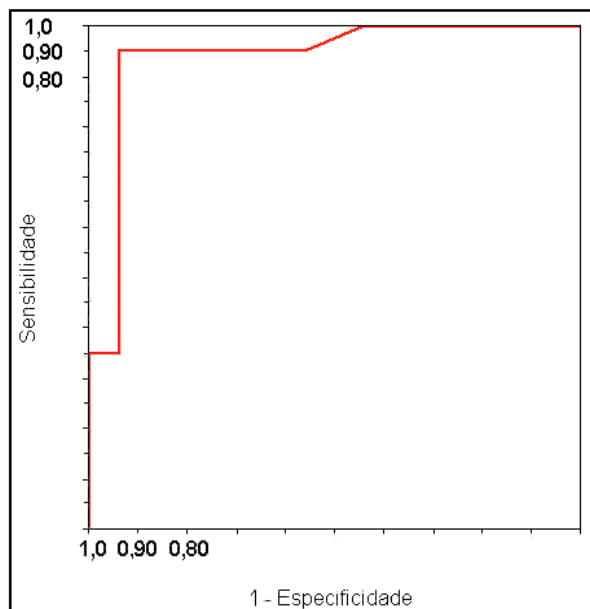
#### 4.8- ESTUDO ESTATÍSTICO

Resultados dos exames bioquímico-celular e dos testes imunoenzimáticos nas amostras de LCR foram introduzidos em uma planilha Microsoft Excel. Os dados foram transferidos para o programa SPSS 11.0 para análise estatística (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Um teste qualitativo tem como resultados possíveis, negativos ou positivos. Em um teste quantitativo é necessário estabelecer um valor de corte a partir do qual ele será considerado positivo; isto é, um valor que forneça maior sensibilidade possível sem

afetar a especificidade do teste. Sua finalidade é determinar o valor diagnóstico ótimo de um método que expressa resultados na forma de valores contínuos.

Com esta finalidade, pode-se utilizar a fórmula de inserção dos resultados obtidos de uma amostragem estudada em uma curva do tipo *receiving operator characteristic curve* - ROC (curva de operação característica). Na curva ROC, o diagnóstico é considerado uma variável estável, composta de dois valores possíveis (neste caso, TB ou não TB). Um teste ideal deve fornecer sensibilidade e especificidade altas, e no gráfico da curva ROC, este valor ideal deve estar próximo do ângulo superior esquerdo. Quanto mais próximo desse ângulo, melhor o teste (Figura 2).



**Figura 2.** Curva do tipo *receiving operator characteristic curve* (ROC) hipotética e ideal

A comparação das médias de variáveis não contínuas foi realizada pelo teste “t” de Student. Para comparar as diferenças nas freqüências dos resultados obtidos nos diferentes grupos avaliados com os diferentes antígenos foi utilizado o teste Anova. A

comparação das médias entre os grupos foi realizada pelo teste de Student-Newman-Keuls. O grau de concordância entre os antígenos testados com as diferentes imunoglobulinas foi determinado pelo teste de correlação ( $r$ ) e a significância pelo teste de Pearson.

A presença de anticorpos para os antígenos de *M. tuberculosis* em pacientes com meningite tuberculose, será a variável preditiva e espera-se positividade dos testes.

#### 4.9- ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo obteve aprovação dos Comitês de Ética do HUGG e HUCFF, além de dispensa do termo de Consentimento informado para uso de amostras estocadas, baseado na resolução nº 01/88 publicado na revista Bioética, CNS (vol.3 nº 2, 1995), Diretriz 9: "Estudos epidemiológicos que requerem o exame de documentos, tais como prontuários médicos, ou de sobras anônimas de amostras de sangue, urina, ou espécimes de tecidos podem ser realizadas sem o consentimento dos indivíduos envolvidos, desde que seu direito ao sigilo seja garantido, pelos métodos em estudo" e na consulta junto ao CRM-RJ, o qual garante que a norma também se refere ao uso de amostras deste fluido.

## 5- RESULTADOS

### 5.1-AMOSTRAGEM

Dos LCR estocados no Laboratório NEUROLIFE no período de junho de 1999 a maio de 2005 foram selecionados 90 assim divididos: 19 oriundos de pacientes com meningite tuberculosa diagnosticados pela cultura positiva para *M. tuberculosis* (Grupo I), 26 oriundos de pacientes com esclerose múltipla (Grupo II) e 45 indivíduos com cefaléia e exame de LCR normal (Grupo III). As características clínicas e demográficas dos pacientes estão descritas na Tabela II .

O Grupo II (esclerose múltipla) é composto de indivíduos mais jovens que os pacientes dos Grupos I e III ( $p=0,03$ ). Houve uma predominância do sexo feminino nos pacientes dos Grupos II/III ( $p=0,004$ ) e o sexo masculino foi predominante no Grupo I ( $p<0,05$ ). Todos os LCR dos pacientes do Grupo I apresentaram Gram e BAAR negativos e cultura para MTB positiva.

**Tabela II.** Características clínicas e demográficas dos diferentes grupos de LCR.

<u>Características</u>	Diagnóstico			
	Número de pacientes (%)			P valor
	<u>Grupo I</u> N= 19	<u>Grupo II</u> N= 26	Grupo III N= 45	
Idade $x \pm$ (SE)	47,89 (17,6)	34,53 (10,42)	45,75 (22,97)	0,03
Sexo				
Masculino	12 (63)	4 (15,38)	16 (35,5)	
Feminino	7 (37)	22 (84,62)	29 (64,5)	
Sorologia para HIV				
positivo	8 (42,1)			
negativo	6 (31,6)	26 (100)	45 (100)	
Não Realizado	5 (26,3)			
Bacterioscopia				
BAAR Positiva	0	0	0	
BAAR Negativa	100%	0	0	
Cultura positiva	100%	0	0	

HIV: Vírus da Imunodeficiência Adquirida. BAAR: Bacilos álcool-ácido resistente. ( $x \pm$  SE): Média  $\pm$  Desvio Padrão. Grupo I (meningite tuberculosa), Grupo II (esclerose múltipla) e Grupo III (cefaléia).



Os resultados dos exames bioquímico-celular das amostras de LCR estudados estão mostrados na Tabela III. Como esperado, de um modo geral, os valores médios de todos os parâmetros mostram-se mais elevados nos estados de MBK que nos controles negativos. Contrariamente, às outras células encontradas no LCR, os plasmócitos, basófilos e macrófagos não estão presentes em quantidades significativamente diferentes aos outros Grupos. Os leucócitos, hemácias, neutrófilos, eosinófilos e proteínas foram significativamente mais elevadas no Grupo I ( $p < 0,05$ ), já a glicose, embora significativamente diferente entre os três Grupos, apresentou concentração média menor no Grupo I ( $p < 0,05$ ).

Baseado no critério de gravidade da doença em relação à proteínorraquia, de acordo com FUNASA 2002, os pacientes do grupo I ( $n=19$ ) foram subdivididos em três Sub-Grupos (SG): SG I.1=  $PR \leq 40$  mg/dl; SG I.2 =  $40 > PR < 300$  mg/dl e SG I.3 =  $PR \geq 300$  mg/dl. Como mostrado na Tabela IV a leucometria acompanhou o padrão de aumento da concentração de proteínas. O número de neutrófilos aumentou nos LCR do SGI.1 para o SGI.3, enquanto que o número de linfócitos mostrou-se mais elevado no SGI.1, mas sem significância estatística, provavelmente devido ao baixo número de LCR em cada SG.

**Tabela III.** Resultados dos exames bioquímico-celular dos LCR nos diferentes grupos de LCR.

Características	<i>X ± SE</i>			P valor
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	
Leucócitos (cel/mm <sup>3</sup> )	196,2 ± 259	7,25 ± 13,68	1,73 ± 1,05	<0,05
Hemácias (cel/mm <sup>3</sup> )	9,68 ± 22,49	1,74 ± 5,22	1,55 ± 3,42	0,01
Neutrófilos (%)	53,52 ± 22,32	0,14 ± 0,45	0,04 ± 0,29	<0,05
Eosinófilos (%)	0,36 ± 0,59	0,03 ± 0,19	0	<0,05
Linfócitos (%)	36,7 ± 22	33,75 ± 44,86	8,15 ± 26,43	<0,05
Monócitos (%)	8,26 ± 3,12	3,11 ± 4,44	0,68 ± 2,53	<0,05
Plasmócitos (%)	0,1 ± 0,45	0	0	0,155
Basófilos (%)	0	0	0	0
Macrófagos (%)	1 ± 0,88	0	0	<0,05
Proteínas (mg/dL)	221,3 ± 278	35,4 ± 20,7	29,8 ± 4,38	<0,05
Glicose (mg/dL)	34,31 ± 12,3	52,3 ± 12,7	60,35 ± 10,81	<0,05

Grupo I: Meningite tuberculosa; Grupo II: Esclerose Múltipla; Grupo III: Cefaléia.

x ± SE: Média ± Desvio Padrão.

**Tabela IV:** Características clínicas e citotóxicas dos LCR provenientes de pacientes com MBK e sub-agrupados de acordo com a concentração protéica do LCR

Características	SUB-GRUPO I			P valor
	SG I.1 n=2	SG I.2 n=12	SG I.3 n=5	
HIV n (%)				
Soropositivo	0	5 (41,7)	3 (60)	
Soronegativo	100	5 (41,7)	1 (20)	
Não realizado	0	2 (16,6)	1 (20)	
Citoquímica (x± SE)				
Leucócitos (cel/mm <sup>3</sup> )	16,5 ± 0,7	152,33 ± 185,80	373,4 ± 381,95	0,164
Neutrófilos (%)	31 ± 36,76	56,5 ± 23	55,2 ± 12,65	0,337
Linfócitos (%)	61,5 ± 40,3	35 ± 21,72	31 ± 10,81	0,239
Monócitos (%)	5,5 ± 2,12	7,33 ± 2,5	11,6 ± 2,3	0,007
Glicose (mg/dL)	46 ± 7	33,9 ± 11,7	30,6 ± 14,4	0,343

SUB-GRUPO I : pacientes com Meningite tuberculosa; SG I.1= Proteínoorraquia ≤40 mg/dl; SG I.2 = 40>Proteínoorraquia<300 mg/dl e SG I.3 = Proteínoorraquia ≥300 mg/dl. x± SE: Média±Desvio Padrão

Quando se analisou os resultados bioquímicos-celular do LCR do SG I co-infectado ou não por HIV, observou-se que os leucócitos, proteínas e a glicose estão mais elevados no LCR oriundos de pacientes HIV positivos ( $p < 0,05$ ). Os neutrófilos, linfócitos e monócitos não mostraram diferença significativa entre os HIV positivo e negativo (Tabela V).

**Tabela V.** Resultados dos exames bioquímico-celular dos LCR do SubGrupo I Infetados ou não pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV)

Exames Bioquímico- Celular	SUBGRUPO I		
	(x ± SE)		
	HIV Soropositivo N= 8	HIV Soronegativo N= 6	P Valor
Leucócitos (cel/mm <sup>3</sup> )	236,87 ± 260,18	115 ± 76,67	0,292
Neutrófilos (%)	55,87 ± 19,05	60,5 ± 23,08	0,688
Linfócitos (%)	34,2 ± 18,59	30,83 ± 20,97	0,753
Monócitos (%)	8,62 ± 2,82	7,33 ±	0,426
Proteínas (mg/dL)	324,87 ± 400,61	159 ± 102,9	0,346
Glicose (mg/dL) <sup>6</sup>	38,62 ± 14,16	25,83 ± 8,84	0,077

SUB-GRUPO I : pacientes com Meningite tuberculosa; x ± SE: Média ± Desvio Padrão

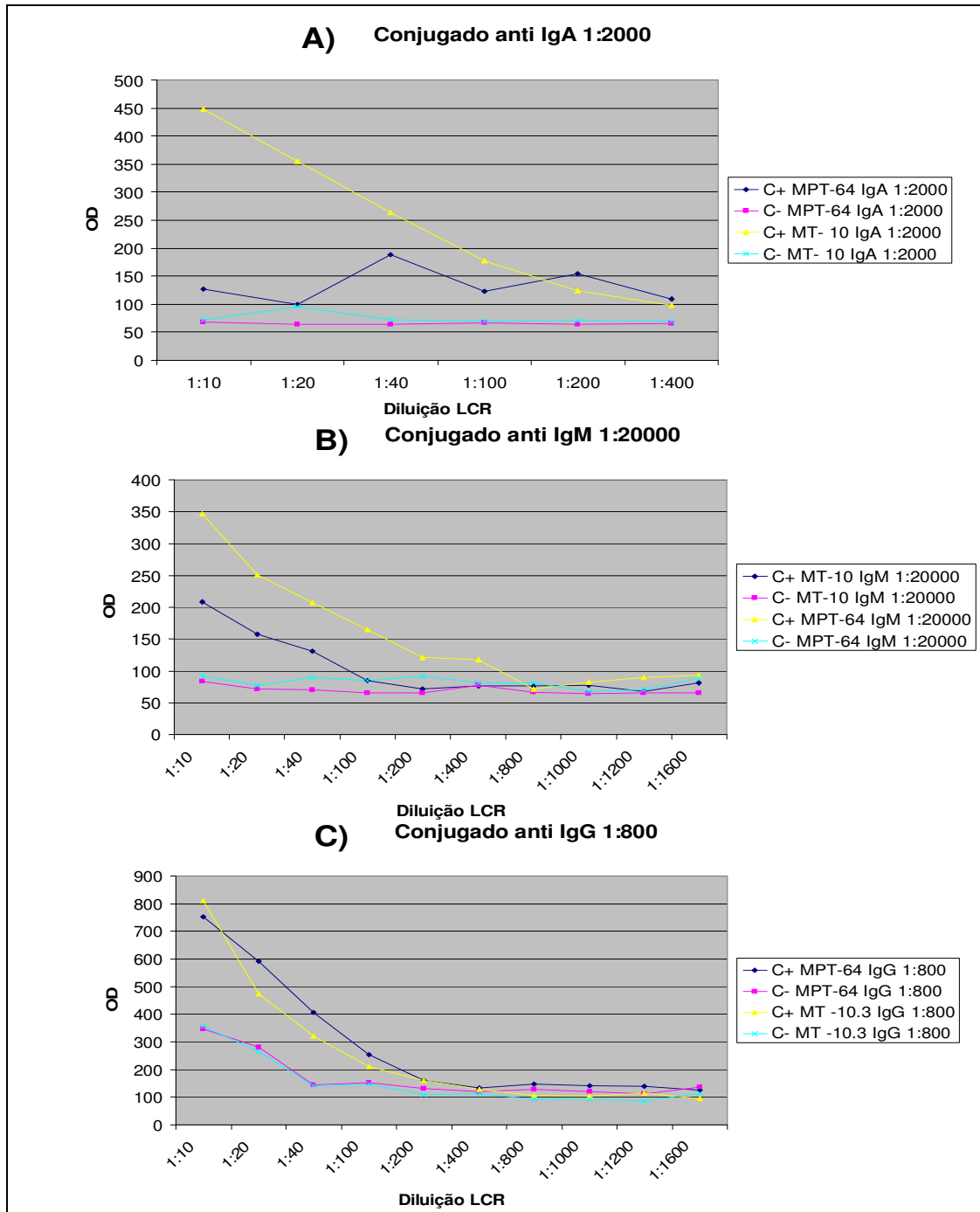
## 5.2- PADRONIZAÇÃO DO LIQ-EIA:

A padronização do Liq-EIA com os antígenos MPT-64 a MT-10.3 foi realizada com os concentrados de LCR de pacientes MBK e Não-MBK. A Figura 3, mostra as melhores diluições dos LCR e conjugados para a detecção dos diferentes tipos de imunoglobulinas. O melhor resultado discriminatório das reações antígeno x anticorpo nos LCR controle positivo (MBK) e negativo (Não MTB) foi obtido com a diluição a 1:40 e os conjugados anti-IgG, IgM e IgA diluídos respectivamente a 1:800, 1:20.000 e 1:2000.

## 5.3- TESTE IMUNOEZIMÁTICO EM LCR (LIQ-EIA)

Todos os LCR arrolados no estudo foram ensaiados para o método imunoenzimático com os antígenos MPT-64 a MT-10.3. A Figura 4 mostra os resultados das densidades óticas nos LCR individualmente. As médias de DO para os diferentes antígenos e tipos de anticorpos foram significativamente diferentes entre o Grupo I e os Grupos controles (Grupo II/III,  $p < 0,05$ ). As médias de reatividade para os antígenos MPT-64 e MT-10.3 foram maiores para a IgG ( $311,5 \pm 145,5$  e  $215,8 \pm 130,1$ , respectivamente) no Grupo I. Para a IgM ( $153,9 \pm 184,26$  e  $86,15 \pm 49,14$ , respectivamente) e IgA ( $141,36 \pm 94,9$  e  $168,26 \pm 119,6$ , respectivamente) as médias de DO foram significativamente diferente entre os Grupos I e II/III, embora com menor reatividade que para IgG. Não houve diferença significativa entre as médias de DO dos LCR Não-MBK ( $p > 0,22$ ).

Figura 3. Resultado da padronização com o concentrado de LCR MBK (controle positivo) e Não TB (controle negativo) com o antígeno MPT-64 e MT-10.3 (1 µg/ml) e conjugados A) anti IgA, B) anti IgM e C) anti IgG



DO= Densidade Óptica x 1000. C+ = Concentrado de LCR controles positivos (MBK). C- = Concentrado de LCR controle negativo (Não-MBK)

A Figura 5 mostra a curva ROC de sensibilidade x especificidade do Liq-EIA para detecção dos diferentes tipos de Acs reativos aos Ags MT10.3 e MPT-64. Os pontos de cortes obtidos foram respectivamente 212, 94,5 e 98,5 para IgG, IgM e IgA-MPT64 e 109,5, 62,5 e 84,5 para MT10.3. A IgG-MT-10.3 mostrou a melhor sensibilidade (100%) com boa especificidade (92%) e a IgG-MPT-64 a melhor especificidade (94%), mas com menor sensibilidade (90%) seguidos da IgA MPT-64 (90% e 92 %), IgM-MT-10.3 (90 % e 78%), IgA-MT-10.3 (79 % e 75 %) e IgM-MPT-64 (68 % e 66 %) quanto a sensibilidade e especificidade, respectivamente (Figura 4 e Tabela VI).

A análise global e cumulativa, dos ensaios imunoenzimáticos com as IgA, IgM e IgG dos LCR para cada um dos antígenos testados estão mostrados na Tabela VI. Embora a sensibilidade dos testes com a IgG MT-10.3/MPT-64 e IgA-MT10.3/MPT-64 tenha se mostrado mais elevada (100 %) houve um decréscimo na sensibilidade (<90%), aliás isto ocorreu para todas as combinações analisadas (Tabela VIII).

Tabela VI: Sensibilidade e especificidade do Liq-EIA na detecção de diferentes tipos de anticorpos reativos aos antígenos MPT-64 e MT-10.3

	Número de positivos /total (%)					
	IgM		IgG		IgA	
	MPT-64	MT-10.3	MPT-64	MT-10.3	MT-10.3	MPT-64
SENSIBILIDADE	13/19 (68)	16/ 19 (90)	17/ 19 (90)	19/ 19 (100)	15/ 19 (79)	15/ 19 (90)
ESPECIFICIDADE	24/ 71 (66)	16/ 71 (78)	4/ 71 (94)	5/ 71 (92)	18/ 71 (75)	6/ 71 (92)



Tabela VII: Frequência da resposta imune de IgG, IgM e IgA aos antígenos MPT-64 e MT-10.3 no LCR de pacientes MBK subdivididos quanto a sorologia para HIV e proteinorraquia (PR).

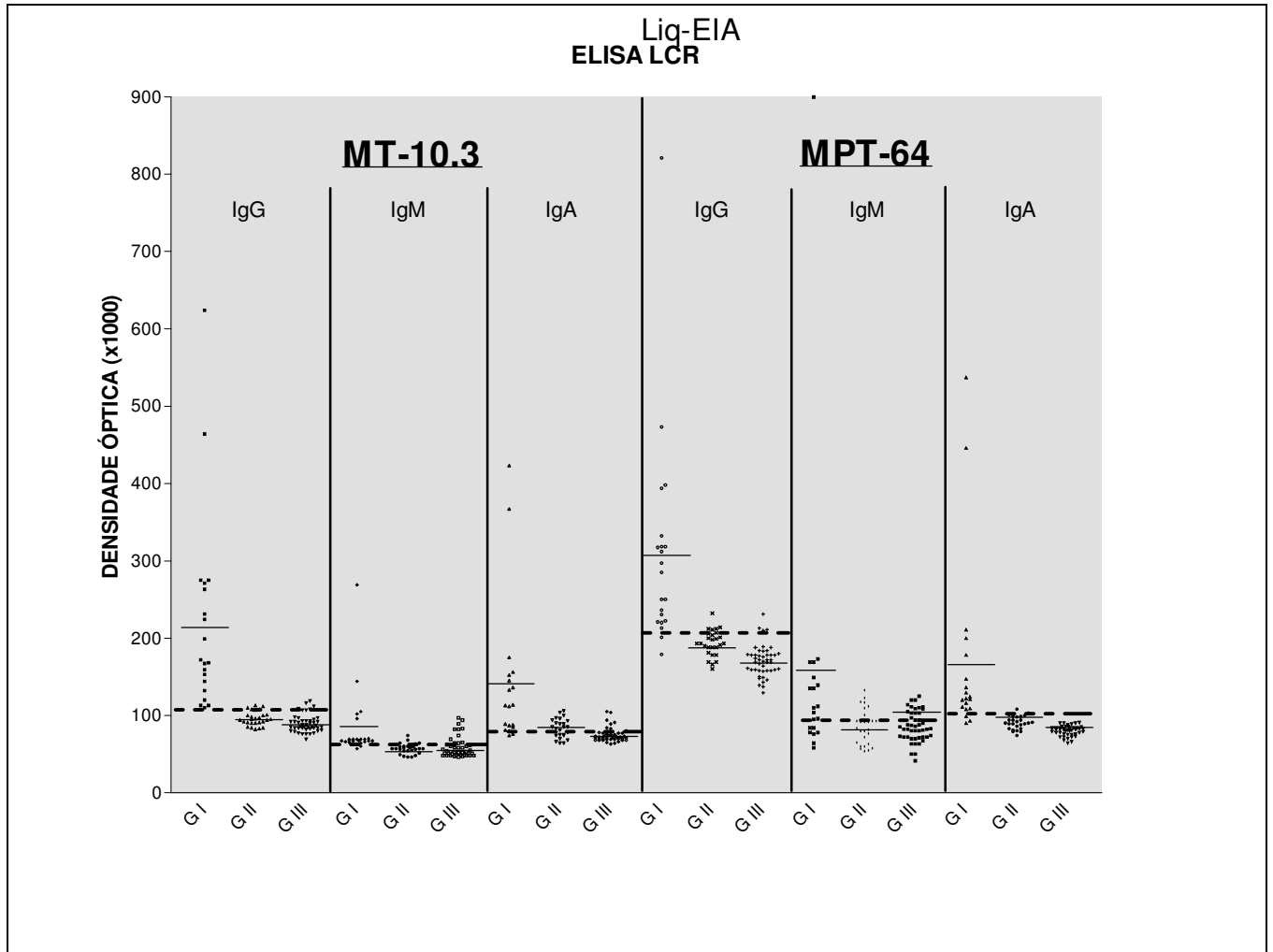
	Número de positivo/ Total (%)					
	Ig G		Ig M		Ig A	
	MPT-64	MT-10.3	MPT-64	MT-10.3	MT-10.3	MPT-64
HIV +	8/8 (100)	8/8 (100)	6/8 (75)	8/8 (100)	7/8 (86)	7/8 (86)
HIV -	5/6 (83)	6/6 (100)	4/6 (67)	4/6 (67)	4/6 (67)	5/6 (83)
SG I.1	1/2 (50)	2/2 (100)	1/2 (50)	1/2 (50)	1/2 (50)	2/2 (100)
SG I.2	11/12 (92)	12/12 (100)	8/12 (67)	10/12 (83)	9/12 (75)	8/12 (67)
SG I.3	5/5 (100)	5/5 (100)	4/5 (80)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)

HIV +/- = Human Immunodeficiency Vírus soro-positivo/negativo; SGI= Grupo I (MBK), subdividido quanto a proteinorraquia: SGI.1 < 40mg/dl; SGI.2 40<PR<300 mg/dl; SGI.3 > 300 mg/dl.

Tabela VIII: Sensibilidade e especificidade do Liq-EIA analisando os resultados cumulativamente.

		IgM		IgG		IgA
		MPT-64	MT-10.3	MPT-64	MT-10.3	MPT-64
MT-10.3	S (%) =	89,5				
IgM	E (%) =	49,3				
MPT-64	S (%) =	89,5	94,7			
IgG	E (%) =	64,8	71,8			
MT-10.3	S (%) =	100	100	100		
IgG	E (%) =	63,4	71,8	88,7		
MPT-64	S (%) =	100	100	100	100	
IgA	E (%) =	59,1	73,2	86	84,5	
MT-10.3	S (%) =	94,7	94,7	100	100	89,5
IgA	E (%) =	43,7	60,5	70,4	69	73,2

Figura 4. Resultados do Liq-EIA expressos em densidade ótica com os antígenos MPT-64 e MT-10.3 para detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA.



G I- Grupo I (Meningite tuberculosa); G II- Grupo II (Esclerose Múltipla); G III- Grupo III (Cefaléia), Liq-EIA – Ensaio imunoenzimático no LCR.

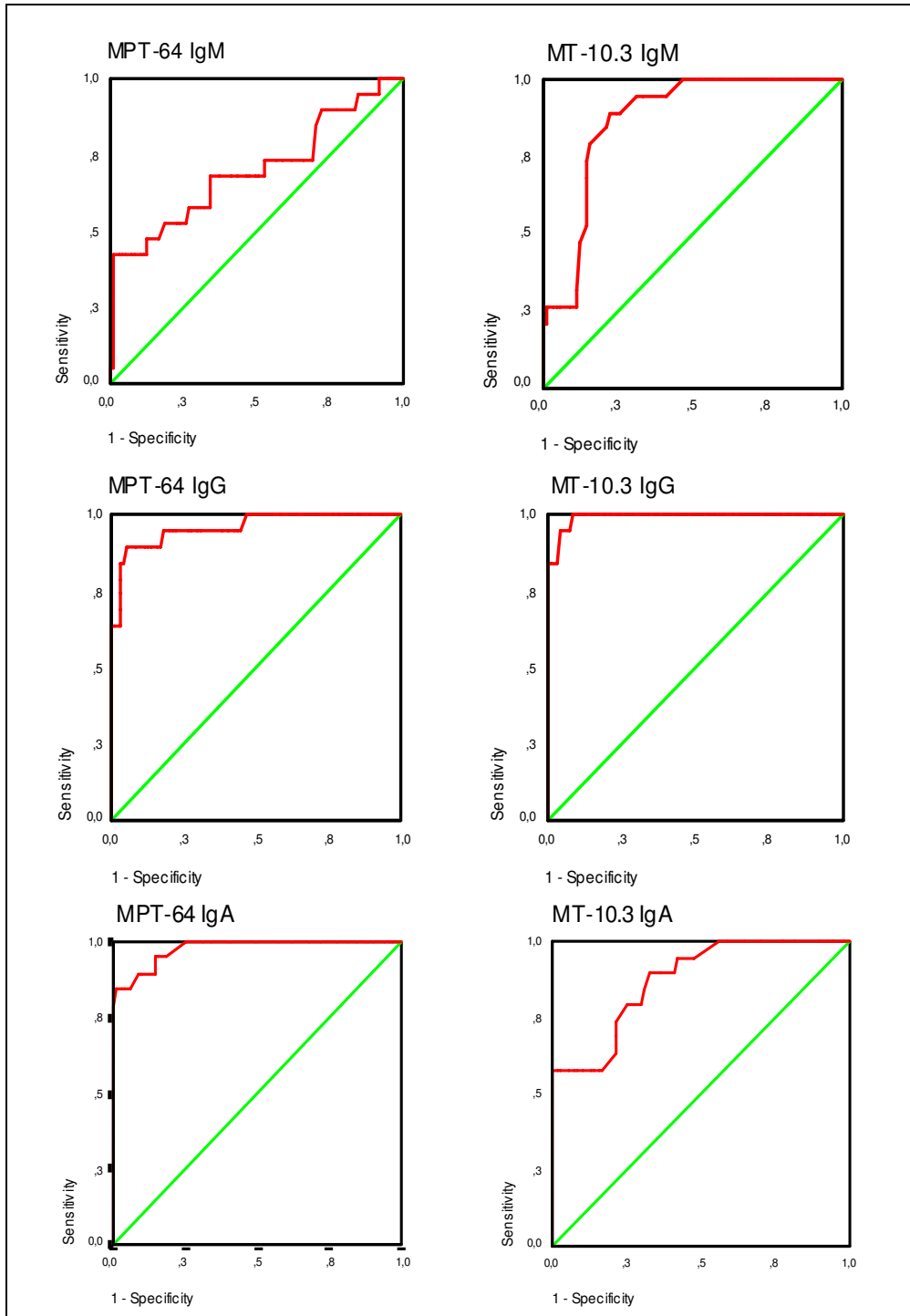
----- Cut off ou ponto de corte      ————— Média de Densidade Óptica nos grupos

Analisando-se os resultados da leucometria e os valores médios da reatividade, observou-se existir uma baixa correlação para todas as imunoglobulinas com os diferentes antígenos ( $r < 0,45$ ). Foi encontrada alta correlação entre a proteinorraquia e as médias de DO, variando entre 88% e 89% para o teste IgA e IgM a 91,1% para IgG MPT-64 ( $p=0,01$ ).

Ao avaliar os dados dos LCR subdivididos em relação à concentração protéica, não foi encontrada diferença entre os SG quanto a média das DOs para IgM MPT-64 ( $p=0,18$ ) e IgG MT-10.3 ( $p=0,11$ ). A média de reatividade da IgG MT-10.3 no SG I.3 ( $321,2 \pm 178,6$ ) foi maior que os demais SG embora sem diferença significativa ( $p=0,09$ ). Porém as médias de reatividade das demais imunoglobulinas para ambos os antígenos foram significativamente diferentes entre o SG I.3 x SGI.1/I.2 ( $p < 0,007$ ). Comparando a frequência de resposta imune em todos os SG, foi encontrada alta frequência de reatividade para IgG MT10.3 (100%), seguida pelas IgA e IgG MPT-64 (Tabela VII).

Analisando-se o Grupo I de acordo com o status do HIV, observou-se que não houve diferença significativa de imunoreatividade para os diferentes Ac com ambos os Ags ( $p > 0,05$ ), entretanto a frequência de resposta foi mais elevada para IgG-MT10.3 (100%) seguida da IgG MPT-64 (100% e 83%, respectivamente para HIV soropositivo e negativo) (Tabela VII).

Figura 5. Curva ROC de sensibilidade x especificidade do Liq-EIA para detecção dos diferentes tipos de Acs reativos aos Ags MT10.3 e MPT-64.



## 6- DISCUSSÃO

Tanto o Brasil, como os países em desenvolvimento, enfrentam o desafio de diagnosticar precocemente as doenças cuja morbidade e letalidade são elevadas, objetivando reduzir o impacto econômico destas na política de saúde pública, pois geram gastos excessivos.

A MBK, apesar de ter baixa prevalência no Brasil, entre 0,15 e 0,34/100.000 habitantes, apresenta uma taxa geral de mortalidade de 10% e para os tratados tardiamente de 50%, podendo chegar a 100% caso não sejam tratados após 5 a 8 semanas do início da doença (GT-MENINGITE/COVER/CGVEP/CENEPI/FUNASA/MS 2000; Nunes *et al*, 1998a; 1998b).

Os métodos diagnósticos de rotina utilizados na MBK ainda se baseiam nos microbiológicos e na bioquímica, sendo o padrão-ouro o microbiológico (cultura). Entretanto, a cultura é morosa, laboriosa e de sensibilidade variável, comprometendo o rápido diagnóstico. Com o desenvolvimento da biologia molecular, métodos alternativos têm sido pesquisados nos últimos anos, entre estes os baseados na estrutura dos ácidos nucléicos e na resposta imune do hospedeiro (Thwaites *et al*, 2002).

O imunodiagnóstico na tuberculose apresenta sensibilidade e especificidade variadas devido à heterogeneidade dos antígenos e da resposta imune do hospedeiro. Com o desenvolvimento da biologia molecular, vários antígenos específicos do MTB

têm sido obtidos, mas poucos são os estudos avaliando seu potencial para uso diagnóstico na tuberculose extra-pulmonar. Entre os métodos imunodiagnósticos, o teste de ELISA apresenta vantagem de ser de fácil realização, relativo baixo custo e sensível. Portanto, seria um método útil em saúde pública se demonstrasse acurácia adequada. O método de ELISA para o imunodiagnóstico precoce da MBK tem sido estudado nas últimas décadas. Alguns trabalhos têm descrito as vantagens e desvantagens do método direto (pesquisa de Antígenos) e indireto (pesquisa de Anticorpos) no diagnóstico da MBK. (Chandramuki *et al*, 2002)

No presente trabalho, foi avaliada a imunorreatividade de IgG, IgM e IgA aos antígenos micobacterianos, MPT-64 e MT-10.3 no LCR de MBK. O Liq-EIA IgG MT-10.3 mostrou a mais alta sensibilidade e especificidade (100% e 92%), seguidos das IgG MPT-64 (90% e 94%), IgA MPT-64 (90% e 92%), IgM MT-10.3 (90% e 78%), IgA MT-10.3 (79% e 75%) e IgM MPT-64 (68% e 66%). Os valores médios de DO no grupo com MBK, para IgG MPT-64 ( $311,5 \pm 145,5$ ) e IgG MT-10.3 ( $215,8 \pm 130,2$ ), foi significativamente mais elevado que para os controles negativos ( $p < 0,005$ ). Não há relatos de estudos envolvendo a resposta imune ao antígeno MT-10.3 no LCR, portanto esta é a primeira vez que este antígeno é avaliado quanto a sua imunoreatividade no LCR de pacientes com MBK.

O Liq-EIA IgM MT-10.3, IgG e IgA MPT-64, resultou em menor sensibilidade (90%), sendo que a IgG MPT-64 forneceu maior especificidade (94%). Entretanto, Chandramuki *et al* (2002) estudando LCR de pacientes com MBK cultura positiva da Índia, encontrou baixa sensibilidade para IgG MPT-64 (12%). Estes achados,

acentuadamente discrepantes, podem estar relacionados à qualidade do antígeno utilizado, às diluições empregadas ou ao tamanho da amostragem testada, já que o número de pacientes indianos foi de 50 e a nossa de 19. A especificidade do teste encontrada por estes autores foi de 100%, similar ao encontrado em nosso estudo (94%). Estes achados aliados a alta especificidade da IgG MT-10.3, corrobora a hipótese de Chandramuki et al (2002) de que em regiões de alta endemicidade para tuberculose (aproximadamente 40% de infecção latente na população adulta), a tuberculose ativa estaria preferencialmente associada a detecção de anticorpos para os antígenos micobacterianos no LCR. O presente trabalho mostra que o Liq-EIA para IgG MT-10.3 foi capaz de detectar todos os LCR de MBK, apresentando menos de 10% de falso-positivos. O fato do Liq-EIA IgG MT-10.3 mostrar alta sensibilidade favorece o diagnóstico rápido de uma doença que apresenta rápida evolução e que pode levar ao óbito, caso não seja diagnosticada e tratada precocemente.

Vários autores consideram que o uso de múltiplos antígenos na composição de um teste diagnóstico seria uma estratégia importante para detectar um maior número de pacientes com tuberculose, já que estes parecem responder de forma heterogênea aos diferentes antígenos micobacterianos. Em nossa análise global e cumulativa de diferentes imunoglobulinas com ambos os antígenos estudados, mostrou um aumento da sensibilidade, porém com comprometimento da especificidade e nenhuma das combinações apresentou melhor resultado que a IgG MT-10.3 (Tabela VIII).

Segundo Watt et al (1988), a baixa sensibilidade dos testes de ELISA pode estar associada à ausência de anticorpos no LCR nos estádios iniciais da infecção ou com a



evolução do tratamento. Mas, em nosso estudo, dos dois pacientes do SGI.1 (baixa concentração de proteínas), todos responderam para a IgG MT-10.3 (100%) (Tabela VII). Os valores médios de DO neste grupo de pacientes, foi mais elevado que nos controles negativo, embora sem diferença significativa ( $207 \pm 8 / 179,5 \pm 22$ ,  $p= 0,39$ ).

Recentes estudos populacionais de pacientes com MBK têm mostrado uma variação na incidência entre os sexos e na média de idade. O estudo de Tan et al (1999) mostrou média de idade de  $37,9 \pm 14,9$  (9 a 63 anos) e predomínio de pacientes do sexo feminino (1,44:1). Verdon et al (1996) em uma revisão de 46 casos de MBK na França, encontraram média de idade de 46 anos (18 a 83) e um predomínio de pacientes do sexo masculino (32 homens e 16 mulheres). No estudo de LAU et al (2005) com 166 pacientes com MBK, em Hong Kong, média de idade foi 42,9 e 50% dos pacientes eram do sexo masculino. Em nosso estudo, com pacientes brasileiros, os resultados foram similares aos franceses e chineses, com predominância de pacientes do sexo masculino (63%) e médias de idade acima de 45, embora não haja relevância. Com relação à população controle, em nosso meio houve predomínio de indivíduos do sexo feminino, o que também corrobora os achados na literatura internacional onde pacientes com EM são predominantemente deste sexo. (Poser, 1992).

O Grupo II, em nosso estudo, é composto por indivíduos significativamente mais jovens quando comparados com os pacientes dos Grupos I ( $47,89 \pm 17,6$ ) e Grupo III ( $45,75 \pm 22,97$ ) ( $p=0,03$ ), resultados estes similares aos encontrados em estudos prévios. (Arruda *et al*, 2001; Ferreira *et al*, 2004).

As anormalidades no exame do LCR de pacientes com MBK são bem descritas na literatura. Geralmente, a meningite tuberculosa apresenta-se com uma pleocitose com predomínio de neutrófilos, nas fases iniciais, e à medida que a doença progride, ocorre predomínio de linfócitos, aumento nos níveis de proteína e diminuição nos níveis de glicose. Em nosso estudo, a média de todos os parâmetros citoquímicos mostra-se mais elevada nos estados de MBK que nos controles negativos, exceto para a glicose, que apresentou menor concentração média ( $p < 0,05$ ), corroborando os estudos anteriores (Heringer *et al*, 2005; Verdon *et al*, 1996; Tan *et al*, 1999; Klein *et al*, 1985).

A infecção por MTB é uma complicação comum da infecção do HIV contribuindo para aumentar a incidência da MBK. Segundo a literatura internacional, apesar deste aumento de incidência, as características clínicas, laboratoriais e radiológicas ou a resposta ao tratamento da MBK não se altera com a co-infecção HIV/TB (Yechool *et al*, 1996; Berenger *et al*, 1992). Em nosso estudo, entretanto, o grupo dos pacientes com MBK co-infectados pelo HIV, além de predominar o sexo masculino, a média dos leucócitos, proteínas e da glicose está mais elevada. Esta discrepância pode estar relacionada ao pequeno número de LCR testados.

A infecção causada pelo HIV tem dimensões pandêmicas e atinge áreas de alta endemicidade para TB, sendo, portanto necessário investigar sua significação na resposta imune dos infectados por MTB. Em nossos resultados, não houve diferença significativa da imunorreatividade da IgG e IgA, aos antígenos testados, nos LCR de pacientes MBK co-infectados ou não pelo HIV (Grupo I,  $p > 0,05$ ), sugerindo que em

nossas amostras, a co-infecção HIV/MBK não interfere na resposta imune aos antígenos MPT-64 e MT-10.3. Estes resultados estão em desacordo com os descritos por Chandramuki et al (2002), que mostraram que a resposta imune em pacientes com co-infecção MTB/HIV está diminuída. Entretanto, eles não encontraram diferença na reatividade de anticorpos de pacientes MBK/HIV positivos diagnosticados clinicamente e aqueles com cultura positiva, concluindo que o HIV parece reduzir a capacidade de produção de anticorpos no LCR de MBK, mas não acentuadamente, o que na verdade apóia os nossos achados.

Deeny et al (1985) e Nunes et al (1998) observaram que a MBK pode estar associada a uma neutrofilia persistente, o que pode ser um fator de confusão para o diagnóstico. Da mesma forma, Marinho et al (1997) mostraram que a MBK pode se apresentar como uma meningite neutrofílica persistente em pacientes com SIDA, pois supõe que o paciente co-infectado pelo HIV desenvolve uma resposta parcial inicial de defesa, ocorrendo maior resposta de fase aguda, caracterizada pela contínua liberação de fatores quimiotáxicos para neutrófilos, impedindo o predomínio linfocitário. Apesar de não haver diferença estatística entre as médias dos linfócitos e neutrófilos ( $p > 0,05$ ) do Grupo I em nosso meio, existe um predomínio neutrofílico, corroborando os relatos da literatura. Porém, nos dois pacientes do SGI, a análise sugere que níveis normais de proteína estão associados a um predomínio de linfócitos e apesar de não dispormos de dados clínicos evolutivos, foi evidenciada neste estudo a ocorrência de meningite neutrofílica nos LCR de pacientes HIV soropositivos e negativos (tabela V). Este é um dado importante, pois não condiz com o padrão evolutivo da doença onde é esperado

um predomínio linfomonocitário (Deeny *et al*, 1985; Nunes *et al*, 1988). Conseqüentemente, estes achados dificultam o diagnóstico apenas pelos métodos citoquímicos. Portanto, considerando que a maioria dos LCR de MBK, infectados ou não pelo HIV e com proteinorraquia elevada ou não, continha anticorpos IgG e IgA que reconhecem os antígenos MT-10.3 e MPT-64, o imunodiagnóstico parece ser uma alternativa potencial (Tabela V).

Fatores como diagnóstico tardio, introdução de terapia específica tardiamente, idades extremas, estágio avançado da doença, presença de hidrocefalia e hipertensão intracraniana, durante o curso da doença, e associação com doenças sistêmicas crônicas estão associados ao mau prognóstico. Basicamente existem dois métodos propostos na literatura para avaliar o prognóstico: a proteinorraquia e o estágio clínico da doença. Entretanto há divergências entre os investigadores. Nunes *et al* (1998), Tan *et al* (1999) e Wang *et al* (2002) mostraram que não há relação entre os níveis elevados de proteína no LCR e o mau prognóstico da doença, enquanto que em outros estudos foi sugerido que níveis > 300mg/dl de proteína no LCR são um marcador de pior prognóstico. (Boissonnas *et al*, 1983; Fundação Nacional de Saúde, 2002; Porkert *et al*, 1997; Misra *et al*, 1996).

No presente estudo, o Grupo I foi subdivididos em 3 subgrupos de acordo com a concentração de proteínas. O SG I.3, que apresentou maior concentração proteica, foi também o grupo com maior imunorreatividade média para os antígenos micobacterianos ( $p < 0,007$ ), exceto para IgG MT-10.3 e IgM MPT-64 ( $p > 0,11$ ). Portanto em nossos resultados, o aumento da imunorreatividade em amostras com

proteínoorraquia alta sugere que a produção de anticorpos aumenta com a gravidade da doença, ou decorrente da disfunção da BHL e migração de proteínas do sangue para o LCR, visto que os SG I.1 e 2 apresentaram menor média de reatividade que o SG I.3, mas sem diferença significativa entre esses grupos ( $p > 0,5$ ). Mas a frequência de respondedores em todos os SG I foi alta principalmente para IgG MT-10.3 (100%), seguido de IgA e IgG MPT-64 (Tabela VII). Entretanto maiores estudos são necessários para elucidar se o aumento médio de anticorpos é de produção intratecal ou provenientes do aumento de transudação do soro para o LCR.

Um desafio importante do diagnóstico precoce da MBK está na diferenciação com as meningites não-tuberculosas ou as meningites bacterianas parcialmente tratadas. A falha no tratamento das meningites piogênicas pode produzir achados LCR semelhantes à MBK, além de interferir no diagnóstico bacteriológico. Os métodos convencionais de diagnóstico da MBK são pouco sensíveis ou exigem um tempo de conclusão prolongado, como ocorre na baciloscopia líquórica (exame direto) e a cultura em meio de LJ, respectivamente. Portanto, são necessário estudos futuros para avaliar o Liq-EIA no diagnóstico diferencial das meningites infecciosas não-tuberculosas.

## 7- CONCLUSÕES

- O Liq-EIA para MT-10.3, neste estudo, foi pela primeira vez utilizado na detecção de Ac em LCR na meningite tuberculosa mostrando seu potencial imunodiagnóstico ao detectar todos os LCR de MBK cultura positiva, e apresentando menos de 10% de falso-positivos.
- Liq-EIA para IgG MT-10 mostrou alto percentual de respondedores nos LCR, de pacientes com MBK, com diferentes concentrações de proteínas, sugerindo a presença de Ac para este antígeno.
- Os pacientes com MBK, co-infectados ou não pelo HIV, não apresentaram diferença significativa na imunorreatividade da IgG e IgA aos antígenos testados, sugerindo que em nossas amostras, a co-infecção HIV/MBK não interfere na resposta imune aos antígenos MPT-64 e MT-10.3.
- A resposta imune não sofreu interferência dos níveis de proteína e do status do HIV, portanto o Liq-EIA seria potencialmente útil para auxiliar no diagnóstico.
- Os pacientes com maior concentração protéica apresentaram maior imunorreatividade média para os antígenos micobacterianos, sugerindo que o aumento da imunorreatividade em amostras com proteinorraquia alta pode ser consequência do aumento da concentração de anticorpos associado à gravidade da MBK.

Os resultados encontrados em nosso estudo são encorajadores quanto ao potencial imunodiagnóstico dos antígenos estudados, entretanto pesquisas continuadas são necessárias para elucidar questões tais como:

- Se a presença de Ac no LCR reflete uma produção intratecal ou é devido a transudação do soro para o LCR.

- Estudar a correlação entre a proteinorraquia e a resposta imune em uma população maior de pacientes em todos os subgrupos

- Estudar a imunorreatividade dos Ags no diagnóstico diferencial com outras meningites infecciosas

Futuros estudos envolvendo maior número de amostras com os antígenos estudados, favoreceria a validação de um teste para o diagnóstico da MBK.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERSON M.R., BEMENT T., DAY C.H., ZHU L., MOLESH D., SKEIKY Y.A., COLER R., LEWINSOHN D.M., REED S.G., DILLON D.C., 2000; Expression cloning of an immunodominant family of Mycobacterium tuberculosis antigens using human CD4(+) T cells; *J Exp Med*; 191(3):551-60.

-ALIFANO M., DE PASCALIS R., SOFIA M., FARAONE S., DEL PEZZO M., COVELLI I., 1998; Detection of IgG and IgA against the mycobacterial antigen A60 in patients with extrapulmonary tuberculosis; *Thorax*; 53(5):377-80.

- ANNAMMA M., RADHAKRISHNAN V.V., SHOBHA S., 1990; Diagnosis of tuberculous meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay to detect mycobacterial antigen and antibody in cerebrospinal fluid; *Med Microbiol Immunol* ;179(5):281-8.

- ANDERSEN A.B., LJUNGQVIST L., HASLOV K., BENTZON M.W., 1991; MPB 64 possesses 'tuberculosis-complex'-specific B- and T-cell epitopes; *Scand J Immunol*.;34(3):365-72.

- ANDERSEN P., ASKGAARD D., LJUNGQVIST L., BENTZON M.W., HERON I., 1991; T-cell proliferative response to antigens secreted by Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*; 59(4):1558-63.



- ANDRONIKOU S., SMITH B., HATHERHILL M., DOUIS H., WILMSHURST J., 2004; Definitive neuroradiological diagnostic features of tuberculous meningitis in children; *Pediatr Radiol*; 34(11):876-85.
  
- ARRUDA W.O., SCOLA R.H., TEIVE H.A., WERNECK L.C., 2001; Multiple sclerosis: report on 200 cases from Curitiba, Southern Brazil and comparison with other Brazilian series; *Arq Neuropsiquiatr* ;59(2-A):165-70.
  
- AYVAZIAN, L.F., 1993; History of Tuberculosis in: *Tuberculosis a comprehensive international approach*. New York: Dekker, 1993. v 66 p.1-20.
  
- BAIG S.M., 1995; Anti-purified protein derivative cell-enzyme-linked immunosorbent assay, a sensitive method for early diagnosis of tuberculous meningitis; *J Clin Microbiol*; 33(11):3040-1.
  
- BERENQUER J., MORENO S., LAGUNA F., VICENTE T., ADRADOS M., ORTEGA A., GONZALEZ-LAHOZ J., BOUZA E., 1992; Tuberculous meningitis in patients infected with the human immunodeficiency virus; *N Engl J Med*; 326(10):668-72.
  
- BERGER J.R., 1994; Tuberculous meningitis; *Curr Opin Neurol*; 7:191-200.
  
- BOISSONNAS A., GAUDOUEN C., SERENI D., SICARD D., CHRISTOFOROV B., MODAI J., CREMER G.A., PEQUIGNOT H., LAROCHE C., 1983; Tuberculous meningitis in adults. Prognostic factors; *Presse Med* ;12(39):2435-8.

- BONINGTON A., STRANG J.I., KLAPPER P.E., HOOD S.V., PARISH A., SWIFT P.J., DAMBA J., STEVENS H., SAWYER L., POTGIETER G., BAILEY A., WILKINS E.G., 2000; TB PCR in the early diagnosis of tuberculous meningitis: evaluation of the Roche semi-automated COBAS Amplicor MTB test with reference to the manual Amplicor MTB PCR test; *Tuber Lung Dis*; 80(4-5):191-6.
  
- BROOKS G.F.; BUTEL J.S.; MORSE A.S., 1998; Mycobacteria in *Medical Microbiology* 31<sup>a</sup> edição. Stamford: Appleton & Lange, cap. 24 p. 279-288.
  
- CAILHOL J., CHE D., JARLIER V., DECLUDT B., ROBERT J., 2005; Incidence of tuberculous meningitis in France, 2000: a capture-recapture analysis; *Int J Tuberc Lung Dis*; 9(7):803-8.
  
- CASTILLA J., URTIAGA M., HUETO J., SOLA J., DORRONSORO I., TORROBA L., DOMINGUEZ F.J., BERNAOLA E., RUBIO M.T., IRISARRI F., BARRICARTE A., 2005; Evolution of the epidemiological characteristics of tuberculosis in Navarra (1994-2003); *An Sist Sanit Navar*; 28(2):237-45.
  
- CLARCK, R.G. *Neuroanatomia e neurofisiologia clínica de Manter e Gatz*. 5a edição. Rio de Janeiro Editora Interamericana. 1976. 148-149.
  
- (a) COLE S.T. et al. 1998; Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence; *Nature*; .393 (6685): 537-44.

- (b) COLE S.T., 1998; Comparative mycobacterial genomics; *Curr Opin Microbiol*; 1(5): 567-71.
  
- COLE S.T., BARRELL B.G., 1998; Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; *Novartis Found Symp*; .217: 160-72 discussion 172-7.
  
- COOPER A.M., DALTON D.K., STEWART T.A., GRIFFIN J.P., RUSSELL D.G., ORME I.M., 1993; Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice; *J Exp Med*; 178(6):2243-7.
  
- COUSINS D.V., BASTIDA R., CATALDI A., QUSE V., REDROBE S., DOW S., DUIGNAN P., MURRAY A., DUPONT C., AHMED N., COLLINS D.M., BUTLER W.R., DAWSON D., RODRIGUEZ D., LOUREIRO J., ROMANO M.I., ALITO A., ZUMARRAGA M., BERNARDELLI A., 2003; Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov; *Int J Syst Evol Microbiol*; 53(Pt 5):1305-14.
  
- CHANDRAMUKI A., LYASHCHENKO K., KUMARI H.B., KHANNA N., BRUSASCA P., GOURIE-DEVI M., SATISHCHANDRA P., SHANKAR S.K., RAVI V., ALCABES P., KANAUIA G.V., GENNARO M.L., 2002; Detection of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* protein antigens in the cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis; *J Infect Dis*; 186(5):678-83.

- CHANDRAMUKI A., BOTHAMLEY G.H., BRENNAN P.J., IVANYI J., 1989; Levels of antibody to defined antigens of Mycobacterium tuberculosis in tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol*; 27(5):821-5.
  
- DAVIS L.E., RASTOGI K.R., LAMBERT L.C., SKIPPER B.J., 1993; Tuberculous meningitis in the southwest United States: a community-based study; *Neurology*; 43(9):1775-8.
  
- DASTUR D.K.; MANGHANI D.K.; UDANI P.M., 1995; Pathology and pathogenetic mechanisms in neurotuberculosis. *Radiol Clin North Am*; 33(4):733-52.
  
- DANIEL T.M., 1987; New approaches to the rapid diagnosis of tuberculous meningitis; *J Infect Dis*; 155:599–603.
  
- DANIEL TM, JANICKI, BW. Mycobacterial Antigens: a Review of Their Isolation, Chemistry, and Immunological Properties. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, Mar., 1978, P. 84-113. 1978 American Society for Microbiology Vol. 42, No. 1 Printed in U.S.A
  
- DANIEL T.M.; ELLNER J.J. Immunology of Tuberculosis. In: *Tuberculosis a comprehensive international approach* New York: Ed. Dekker, v. 66, 1993p. 75

- DEENY J.E., WALKER M.J., KIBEL M.A., MOLTENO C.D., ARENS L.J., 1985; Tuberculous meningitis in children in the Western Cape. *Epidemiology and outcome. S Afr Med J*; 68(2):75-8.
  
- DEMKOW U., FILEWSKA M., BIALAS B., SZTURMOWICZ M., ZIELONKA T., WESOLOWSKI S., KUS J., ZIOLKOWSKI J., AUGUSTYNOWICZ-KOPEC E., ZWOLSKA Z., SKOPINISKA-RABEWSKA E., ROWINSKA-ZAKRZEWSKA E., 2004; Antimycobacterial antibody level in pleural, pericardial and cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis; *Pneumonol Alergol Pol*; 72(3-4):105-10.
  
- DESAI T., 1993; Enzyme-linked immunosorbent-assay for antigen detection in tuberculous meningitis; *Indian J Pathol Microbiol*; 36 (4):348-55.
  
- FALLON R.J.; KENNED D.H., 1993; Rapid diagnosis of tuberculous meningitis; *J Infect*; 26(2): 226.
  
- FERREIRA M.L., MACHADO M.I., VILELA M.L., GUEDES M.J., ATAIDE L. JR, SANTOS S., LAURENTINO S.G., 2004; Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauracao, Recife, Pernambuco, Brazil; *Arq Neuropsiquiatr*; 62(4):1027-32.
  
- FISHMAN RA. *Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1980.

- FLYNN J.L., CHAN J., TRIEBOLD K.J., DALTON D.K., STEWART T.A., BLOOM B.R., 1993; An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection; *J Exp Med*; 178(6):2249-54.
  
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 5ª edição. Brasília. FUNASA. 605-612.
  
- GARG R.K., 1999; Tuberculosis of the central nervous system. *Postgrad Med J*;75(881):133-40
  
- GAUDELUS J., DE PONTUAL L., 2005; Epidemiology of tuberculosis in France; *Arch Pediatr*, 12 (2): S83-7.
  
- GENNARO, M. L., 2000; Immunologic diagnosis of tuberculosis; *Clin. Infect. Dis*; 30(3): S243–S246.
  
- GERBER J., TUMANI H., KOLENDA H., NAU R., 1998; Lumbar and ventricular CSF protein, leukocytes, and lactate in suspected bacterial CNS infections; *Neurology*; 51(6):1710-4.
  
- GROSSET JH. Bacteriology of Tuberculosis in: *Tuberculosis a comprehensive international approach* 1993 vol 66 Ed. Dekker, New York. Pg 49-74.

- GT-MENINGITE/COVER/CGVEP/CENEPI/FUNASA/MS. *Casos de meningite por tuberculose por faixa etária. 2000.* Disponível em:  
<<http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/Tuberculose/meningitepdf.pdf>>. Acesso em 23 mar. 2006
  
- HARBOE M., NAGAI S., PATARROYO M.E., TORRES M.L., RAMIREZ C., CRUZ N., 1986; Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of Mycobacterium bovis BCG; *Infect Immun*; 52(1):293-302.
  
- HERINGER R.R., FERNANDES L.E., GONCALVES R.R., PUCCIONI-SOHLER M., 2005; Location of the lesion and the cerebrospinal fluid findings in tuberculous meningitis: differences in the lumbar, cisternal and ventricular compartments; *Arq Neuropsiquiatr*; 63(2B):543-7.
  
- HOOKER J.A., MUHINDI D.W., AMAYO E.O., MC'LIGEYO S.O., BHATT K.M., ODHIAMBO J.A., 2003; Diagnostic utility of cerebrospinal fluid studies in patients with clinically suspected tuberculous meningitis; *Int J Tuberc Lung Dis*; 7(8):787-96.
  
- HOUGHTON R.L., LODES M.J., DILLON D.C., REYNOLDS L.D., DAY C.H., MCNEILL P.D., HENDRICKSON R.C., SKEIKY Y.A., SAMPAIO D.P., BADARO R., LYASHCHENKO K.P., REED S.G., 2002; Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis; *Clin Diagn Lab Immunol*; 9(4):883-91.

- HUI A.C., NG K.C., TONG P.Y., MOK V., CHOW K.M., WU A., WONG L.K., 2005; Bacterial meningitis in Hong Kong: 10-years' experience; *Clin Neurol Neurosurg*; 107(5):366-70.
  
- JINKINS J.R., GUPTA R., CHANG K.H., RODRIGUEZ-CARBAJAL J., 1995; MR imaging of central nervous system tuberculosis; *Radiol Clin North Am*; 33(4):771-86.
  
- JOHANSEN I.S., LUNDGREN B., TABAK F., PETRINI B., HOSOGLU S., SALTOGLU N., THOMSEN V.O., 2004; Improved sensitivity of nucleic acid amplification for rapid diagnosis of tuberculous meningitis; *J Clin Microbiol*; 42(7):3036-40.
  
- JIMENEZ A.J., GARCIA A.T., ARTIGAO F.B., DEL CASTILLO MARTIN F., ANDRES C.B., ROMERO M.P., MIGUEL M.J.G., 2005; Tuberculous meningitis: a review of 27 years. *An Pediatr*; 62(3):215-20.
  
- JURADO R., WALKER, H.K. *Cerebrospinal fluid in Clinical Methods* 3<sup>a</sup> ed. Stoneham (MA): Butterworth Publishers; 1990. pg 371-382.
  
- KASHYAP R.S., KAINTHLA R.P., BISWAS S.K., AGARWAL N., CHANDAK N.H., PUROHIT H.J., TAORI G.M., DAGINAWALA H.F., 2003; Rapid diagnosis of tuberculous meningitis using the Simple Dot ELISA method; *Med Sci Monit*; 9(11):MT123-6.
  
- KASHYAP R.S., KAINTHLA R.P., SATPUTE R.M., CHANDAK N.H., PUROHIT H.J., TAORI G.M., DAGINAWALA H.F., 2004; Demosntration of IgG antibodies to 30 Kd



protein antigen in CSF for diagnosis of tuberculous meningitis by antibody-capturing ELISA. *Neurol India*; 52(3): 359-62.

- KASHYAP R.S., DOBOS K.M., BELISLE J.T., PUROHIT H.J., CHANDAK N.H., TAORI G.M., DAGINAWALA H.F., 2005; Demonstration of components of antigen 85 complex in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis patients; *Clin Diagn Lab Immunol*;12(6):752-8.

- KATOCH V.M., 2004; Newer diagnostic techniques for tuberculosis; *Indian J Med Res*; 120: 418-428.

- KATRAK S.M., SHEMBALKAR P.K., BIJWE S.R., BHANDARKAR L.D., 2000; The clinical, radiological and pathological profile of tuberculous meningitis in patients with and without human immunodeficiency virus infection; *J Neurol Sci*;181(1-2):118-26.

- KADIVAL G.V., KAMESWARAN M., DOSHI R., TODIWALA S.S., SAMUEL A.M., 1994; Detection of antibodies to defined M. tuberculosis antigen (38 kDa) in cerebrospinal fluids of patients with tuberculous meningitis; *Zentralbl Bakteriol*; 281(1):95-101.

- KENNEDY D.H., FALLLON R.J., 1979; Tuberculous Meningitis; *JAMA*; 241: 264-268.

- KINGSLEY, R.E.: *Manual de Neurociências*, 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. 35-37.

- KLEIN N.C., DAMSKER B., HIRSCHMAN S.Z., 1985; Mycobacterial meningitis. Retrospective analysis from 1970 to 1983; *Am J Med*;79(1):29-34.
- KUMAR R., SINGH S.N., KOHLI N., 1999; A diagnostic rule for tuberculous meningitis; *Arch Dis Child*; 81: 221-224.
- KUMAR R., KOHLI N., THAVNANI H., KUMAR A., SHARMA B., 1996; Value of CT scan in the diagnosis of meningitis; *Indian Pediatr*; 33(6):465-8.
- LI Z., 1991; Clinical early diagnosis of tuberculous meningitis; *Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi*; 24(6): 376-378, 386.
- LI H., ULSTRUP J.C., JONASSEN T.O., MELBY K., NAGAI S., HARBOE M., 1993; Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG; *Infect Immun*; 61(5):1730-4.
- MACHADO, A. *Neuroanatomia funcional*. 1991 Rio de Janeiro-São Paulo. Ed Atheneu. 57-64.
- MAHESHWARI A., GUPTA H.L., GUPTA S., BHATIA R., DATTA K.K., 2000; Diagnostic utility of estimation of mycobacterial antigen A60 specific immunoglobulins in serum and CSF in adult neurotuberculosis; *J Commun Dis*; 32(1):54-60.

- MANIAR P., JOSHI L., 1990; ELISA--its evaluation in diagnosis of tuberculosis meningitis. *Indian J Pediatr*, 57(5):667-72.
  
- MARTINS L.C., PASCHOAL I.A., VON NOWAKONSKI A., SILVA S.A., COSTA F.F., WARD L.S., 2000; Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis; *Rev Soc Bras Med Trop*; 33(3):253-7.
  
- MATHAI A., RADHAKRISHNAN V.V., SEHGAL S., 1990; IgG antibody to Mycobacterium tuberculosis antigen-5 in cerebrospinal fluid and its diagnostic application in tuberculous meningitis; *Indian J Exp Biol*; 28(9):816-20.
  
- MARINHO S.F., PACIULLO V.H., FONSECA M.O., KHOURY Z., YAMIN M.A., MINKOVES R., ANDRADE M.O., CAVALLARI M.M., 1997; Persistent neutrophilic meningitis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome; *Rev Soc Bras Med Trop*; 30(3):241-5.
  
- MCDONALD W.I., COMPSTON A., EDAN G., GOODKIN D., HARTUNG H.P., LUBLIN F.D., MCFARLAND H.F., PATY D.W., POLMAN C.H., REINGOLD S.C., SANDBERG-WOLLHEIM M., SIBLEY W., THOMPSON A., VAN DEN NOORT S., WEINSHENKER B.Y., WOLINSKY J.S., 2001; Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis; *Ann Neurol*; 50:121-127.

- MIMS C.A. ET AL. Avaliação do Sistema de defesa do hospedeiro e antígenos microbianos. Em: *Microbiologia Médica* 1995. São Paulo. Ed Manole LTDA. 8.1-8.10
- MINNIKIN D.E. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. Em *The biology of the Mycobacteria*. Capítulo 3. Vol 1. 1982. Academic Press. Londres, pg 95-184
- MISRA U.K., KALITA J., SRIVASTAVA M., MANDAL S.K., 1996; Prognosis of tuberculous meningitis: a multivariate analysis; *J Neurol Sci* ; 137: 57-61.
- MONTEYNE P., SINDIC C.J., 1995; The diagnosis of tuberculous meningitis; *Acta Neurol Belg*; 95(2):80-7.
- MUSSER J.M., AMIN A., RAMASWAMY S., 2000; Negligible Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure; *Genetics*;155: 7-16
- NEWPORT M.J., HUXLEY C.M., HUSTON S., HAWRYLOWICZ C.M., OOSTRA B.A., WILLIAMSON R., LEVIN M., 1996; A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection; *N Engl J Med*; 335(26):1941-9.
- NEWTON R.W., 1994; Tuberculous meningitis; *Arch Dis Child*; 70:364–6.

- NUNES C., CUNHA S., GOMES N., TAVARES A., AMORIM D., GOMES I., MELO A., 1998; Meningoencefalite tuberculosa: avaliação de 231 casos; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*; 31(5): 441-447.
  
- NUNES C., CUNHA S., GOMES I., LUCENA R., MORAES D., MELO A., 1998; Fatores prognósticos de letalidade na meningoencefalite tuberculosa; *Arq. Neuro-Psiquiatr*; 56 (4): 772-777.
  
- NUNES C., GOMES I., TAVARES A., MELO A., 1996; Clinical and laboratory characteristics of 62 tuberculous meningoencephalitis cases; *Arq Neuropsiquiatr*; 54(2):222-6.
  
- OETTINGER T., HOLM A., MTONI I.M., ANDERSEN A.B., HASLOOV K., 1995; Mapping of the delayed-type hypersensitivity-inducing epitope of secreted protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*; *Infect Immun*; 63(12):4613-8.
  
- OEITINGER T., ANDERSEN A.B., 1994; Cloning and B-Cell-Epitope Mapping of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; *Infect Immun*; 62(5): 2058-2064.
  
- OFFENBACHER H., FAZEKAS F., SCHMIDT R., KLEINERT R., PAYER F., KLEINERT G., LECHNER H., 1991; MRI in tuberculous meningoencephalitis: report of four cases and review of the neuroimaging literature; *J Neurol*; 238(6):340-4.

- PAI M., FLORES L.L., PAI N., HUBBARD A., RILEY L.W., COLFORD J.M. JR., 2003; Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis; *Lancet Infect Dis*; 3(10):633-43.
  
- PATEL V.B., BHIGJEE A.I., BILL P.L., CONNOLLY C.A., 2002; Cytokine profiles in HIV seropositive patients with tuberculous meningitis; *JNNP*;73:598-599.
  
- PATIL S.A., GOURIE-DEVI M., ANAND A.R., VIJAYA A.N., PRATIMA N., NEELAM K., CHANDRAMUKI A., 1996; Significance of mycobacterial immune complexes (IgG) in the diagnosis of tuberculous meningitis; *Tuber Lung Dis*;77(2):164-7.
  
- PCT/SES/RJ-TUBERCULOSE. Programa de Controle de Tuberculose do Estado do Rio de Janeiro. *Boletim Informativo*. 2005
  
- PORKERT M.T., SOTIR M., PARROTT-MOORE P., BLUMBERG H.M., 1997; Tuberculous meningitis in adults at a large inner-city medical center; *Am J Méd Sci*; 313: 325-331
  
- POSER C.M., 1993; The pathogenesis of multiple sclerosis. Additional considerations; *J Neurol Sci*; 115 Suppl:S3-15.
  
- POTTUMARTHY S., WELLS V.C., MORRIS A.J., 2000; A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis; *J Clin Microbiol*; 38(6):2227-31.

- PUCCIONI-SOHLER M., 1996; Esclerose Múltipla: novas aquisições tecnológicas para a análise do líquido cefalorraquiano (LCR); *Rev bras Neurol*; 32(3): 95-99.
  
- ROCHE P.W., FENG C.G., BRITTON W.J., 1996; Human T-cell epitopes on the Mycobacterium tuberculosis secreted protein MPT64; *Scand J Immunol*; 43: 662-670.
  
- ROCHE P.W., WINTER N., TRICCAS J.A., FENG C.G., BRITTON W.J., 1996; Expression of Mycobacterium tuberculosis MPT64 in recombinant Myco. Smegmatis: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis; *Clin Exp Immunol*; 103: 226-232.
  
- ROSENKRANDS I., WELDINGH K., RAVN P., BRANDT L., HOJRUP P., RASMUSSEN P.B., COATES A.R., SINGH M., MASCAGNI P., ANDERSEN P., 1999; Differential T-cell recognition of native and recombinant Mycobacterium tuberculosis GroES; *Infect Immun*; 67(11):5552-8.
  
- REIBER H., 1998; Cerebrospinal fluid – physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases; *Multiple Sclerosis*; 4: 99-107.
  
- REIBER H., 2001; Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid; *Clinica Chimica Acta*; 310 (2): 173-186.
  
- RIEDER H.L., 2001; *Bases Epidemiológicas do Controle da Tuberculose*.

- RADHAKRISHNAN V.V., SEHGAL S., MATHAI A., 1990; Correlation between culture of Mycobacterium tuberculosis and detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis; *J Med Microbiol*; 33(4):223-6
  
- RADHAKRISHNAN V.V., MATHAI A., THOMAS M., 1991; Correlation between culture of Mycobacterium tuberculosis and antimycobacterial antibody in lumbar, ventricular and cisternal cerebrospinal fluids of patients with tuberculous meningitis; *Indian J Exp Biol*; 29(9):845-8.
  
- RADHAKRISHNAN V.V., MATHAI A., 1993; Correlation between the isolation of Mycobacterium tuberculosis and estimation of mycobacterial antigen in cisternal, ventricular and lumbar cerebrospinal fluids of patients with tuberculous meningitis; *Indian J Pathol Microbiol*; 36(4):341-7.
  
- SELVAKUMAR N., VANAJAKUMAR, THILOTHAMMAL N., PARAMASIVAN C.N., 1996; Isolation of Mycobacterium tuberculosis from cerebrospinal fluid by the centrifugation & filtration methods. *Indian J Med Res*;103:250-2.
  
- SHANKAR P., MANJUNATH N., MOHAN K.K., PRASAD K., BEHARI M., SHRINIWAS, AHUJA G.K., 1991; Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet*; 337: 5-7.



- SINDIC C.J.M., VAN-ANTWERPEN M.P., GOFFETTE S., 2001; The intrathecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevance; *Clin Chem Lab Med*; 39(4): 330-340.
  
- SINDIC C.J., BOUCQUEY D., VAN ANTWERPEN M.P., BAELDEN M.C., LATERRE C., COCITO C., 1990; Intratecal synthesis of anti-mycobacterial antibodies in patients with tuberculous meningitis. An immunoblotting study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 53:662-666.
  
- SINGH P., BAVEJA C.P., TALUKDAR B., KUMAR S., MATHUR M.D., 1999; Diagnostic utility of ELISA test using antigen A60 in suspected cases of tuberculous meningitis in paediatric age group. *Indian J Pathol Microbiol*;42(1):11-4.
  
- SKJOT R.L., BROCK I., AREND S.M., MUNK M.E., THEISEN M., OTTENHOFF T.H., ANDERSEN P., 2002; Epitope Mapping of the Immunodominant Antigen TB10.4 and the Two Homologous Proteins TB10.3 and TB12.9, Which Constitute a Subfamily of the *esat-6* Gene Family; *Infect Immun*; 70(10):5446–5453.
  
- SORENSEN A.L., NAGAI S., HOUEN G., ANDERSEN P., ANDERSEN A.B., 1995; Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*; 63 (5): 1710-1717.

- SRIVASTAVA K.L., BANSAL M., GUPTA S., SRIVASTAVA R., KAPOOR R.K., WAKHLU I., SRIVASTAVA B.S., 1998; Diagnosis of tuberculous meningitis by detection of antigen and antibodies in CSF and sera; *Indian Pediatr*, 35(9):841-50.
  
- SUMI M.G., ANNAMMA M., SARADA C., RADHAKRISHNAN V.V., 2000; Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a dot-immunobinding assay. *Acta Neurol Scand*; 101(1):61-4.
  
- SUMI M.G., MATHAI A., REUBEN S., SARADA C., RADHAKRISHNAN V.V., INDULAKSHMI R., SATHISH M., AJAYKUMAR R., MANJU Y.K., 2002; A comparative evaluation of dot immunobinding assay (Dot-Iba) and polymerase chain reaction (PCR) for the laboratory diagnosis of tuberculous meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 42(1):35-8
  
- SUNBUL M., ATILLA A., ESEN S., EROGLU C., LEBLEBICIOGLU H., 2005; Thwaites' diagnostic scoring and the prediction of tuberculous meningitis. *Med Princ Pract*; 14(3):151-4.
  
- TAN E.K., CHEE M.W., CHAN L.L., LEE Y.L., 1999; Culture positive tuberculous meningitis: clinical indicators of poor prognosis. *Clin Neurol Neurosurg*;101(3):157-60.
  
- TARTAGLIONE T., DI LELLA G.M., CERASE A., LEONE A., MOSCHINI M., COLOSIMO C., 1998; Diagnostic imaging of neurotuberculosis. *Rays*; 23(1):164-80.

- THWAITES G., CHAU T.T., MAI N.T., DROBNIIEWSKI F., MCADAM K., FARRAR J., 2000; Tuberculous meningitis; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 68(3):289-99
- THWAITES G.E., CHAU T.T., STEPNIIEWSKA K., PHU N.H., CHUONG L.V., SINH D.X., WHITE N.J., PARRY C.M., FARRAR J.J., 2002; Diagnosis of adult tuberculous meningitis by use of clinical and laboratory features. *Lancet*; 360(9342):1287-92.
- THWAITES G.E., CAWS M., CHAU T.T., DUNG N.T., CAMPBELL J.I., PHU N.H., HIEN T.T., WHITE N.J., FARRAR J.J., 2004; Comparison of conventional bacteriology with nucleic acid amplification (amplified mycobacterium direct test) for diagnosis of tuberculous meningitis before and after inception of antituberculosis chemotherapy; *J Clin Microbiol*; 42(3):996-1002.
- THWAITES G.E., CHAU T.T.H., FARRAR J.J., 2004; Improving the bacteriological diagnosis of tuberculous meningitis; *J Clin Microb*; 42 (1): 378-379.
- THWAITES G.E., TRAN T.H., 2005; Tuberculous meningitis: many questions, too few answers; *Lancet Neurol*; 4(3):160-70.
- THOMPSON E.J., 1995; Cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosur Psych* ; 59: 349-357.
- YECHOOR V.K., SHANDERA W.X., RODRIGUEZ P., CATE T.R., 1996; Tuberculous meningitis among adults with and without HIV infection. Experience in an urban public hospital. *Arch Intern Med*;156(15):1710-6.

- YOUNG D. B., KAUFMANN S.H.E., HERMANS P.W.M., AND THOLE J.E.R., 1992; Mycobacterial protein antigens. *Mol Microbiol*; 3:133-145.
  
- WATT G., ZARASPE G., BAUTISTA S., LAUGHLIN L.W., 1988; Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay to detect mycobacterial antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *J Infect Dis*;158(4):681-6.
  
- WOLINSKY E. Mycobacteria in: *Microbiology* cap 37 3<sup>a</sup> edição Editora Harper & Row, Philadelphia. 724-742
  
- WANG J.T., HUNG C.C., SHENG W.H., WANG J.Y., CHANG S.C., LUH K.T., 2002; Prognosis of tuberculous meningitis in adults in the era of modern antituberculous chemotherapy. *J Microbiol Immunol Infect*;35(4):215-22
  
- WHO, 2005. *Global Tuberculosis Control, Country Profile* p.67-70.
  
- VAN-CREVEL R., OTTENHOFF T.H.M., VAN-DER-MEER J.W.M., 2002; Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*; 15 (2): 294-309.
  
- VERDON R., CHEVRET S., LAISSY J.P., WOLFF M., 1996; Tuberculous meningitis in adults: review of 48 cases. *Clin Infect Dis*;22(6):982-8.