

Daniel Marques de Oliveira

***Mycobacterium Tuberculosis* e a resistência do bacilo de Koch**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Daniel Marques de Oliveira

***Mycobacterium Tuberculosis* e a resistência do bacilo de Koch**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

***Mycobacterium Tuberculosis* e a resistência do bacilo de Koch**

*Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas*

(Daniel Marques de Oliveira)

Resumo

Ao longo dos últimos tempos, a *Mycobacterium tuberculosis* tem sido alvo de estudos mais aprofundados, visto ser um dos agentes infecciosos que mais pessoas infeta em todo mundo, quer sob a forma ativa, quer sob a forma latente. Assim sendo, têm sido desenvolvidas várias estratégias para o seu controlo e tratamento, que se mostram bastante promissoras. Atualmente existe ainda uma preocupação especial relativamente ao aparecimento de resistências ao bacilo de Kock. Desta forma, são importantes algumas medidas que promovam a diminuição destes casos de resistência, nomeadamente o supervisionamento por um profissional de saúde, como garantia que o tratamento medicamentoso é feito de forma completa e correta. Apesar de tudo, os últimos desenvolvimentos no controlo e tratamento da tuberculose apresentam algumas falhas, desde a falta de eficácia até ao aparecimento de efeitos adversos indesejados, o que alarga ainda mais o período que leva até que um novo tratamento e/ou vacina possam ser inseridos no sistema de saúde. Este trabalho tem como objetivo a revisão do estado atual dos desenvolvimentos em torno do tratamento e controlo da tuberculose nomeadamente da forma resistente, assim como o seu atual impacto na sociedade.

Abstract

Over the recent years, *Mycobacterium tuberculosis* has been the subject of extra study, since it is one of the infectious agents that infect more people around the world, either in his active or latent form. Therefore, several strategies have been developed for control and treatment, which appear quite promising. It has also been given special importance to the development of resistance by the Koch bacillus, and, to diminish these cases, efforts have been made, more particularly at the supervising level by a health professional to ensure that the pharmacological treatment is carried out complete and correctly. Though, those recent developments in the area of controlling and treating tuberculosis have some flaws, like the lack of efficacy and the appearance of adverse effects, which delays the time it takes until the new treatment or vaccine is inserted in the health system. This work aims to present the state of the art regarding the treatment and control of tuberculosis namely the resistant tuberculosis, as well as its current impact in the society.

“I’m a greater believer in luck, and I find the harder I work the more I have of it”

Thomas Jefferson

Agradecimentos

Com o termo desta etapa da minha vida académica, quero agradecer a todos os intervenientes na minha formação e educação, quer a nível pessoal, quer a nível profissional.

À minha Universidade, a muy nobre Universidade Fernando Pessoa, um obrigado a todo o corpo docente e pessoal auxiliar, que ajudaram a enriquecer o meu conhecimento e que fizeram com que construí-se e molda-se o perfil social e profissional que me acompanhará ao longo da minha vida.

À Professora Sandra Soares fico grato pela disponibilidade e amabilidade com que me apoiou na elaboração desta dissertação.

Quero também agradecer a todos os membros da Tuna Académica da Universidade Fernando Pessoa por me terem proporcionado alguns dos melhores momentos da minha vida académica e por me terem transmitido os ensinamentos que em escola nenhuma se aprende.

A todos os amigos que fizeram parte da minha vida nestes últimos 5 anos, agradeço e espero que a nossa amizade perdure durante muitos mais.

À minha família fico grato por toda a motivação e apoio. Em especial aos meus pais, um obrigado pelo apoio, dedicação, amor e esforço que demonstraram para comigo.

Por fim, quero agradecer à Catia Soares, minha colega de curso, amiga e namorada, pelo enorme apoio, pela extrema dedicação e pelo grande pilar que representou ao longo de todo este percurso.

Índice

| | |
|---|------|
| Índice | V |
| Índice de Figuras | VI |
| Índice de Tabelas | VII |
| Índice de Abreviaturas | VIII |
| I. Introdução..... | 1 |
| II. Bacilo de Koch | 3 |
| 1. Constituição geral do bacilo | 3 |
| 2. Fatores de virulência | 5 |
| III. Infecção por <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> | 6 |
| 1. Epidemiologia | 6 |
| 2. Tuberculose | 7 |
| 3. Co-infecção pelo VIH | 9 |
| 4. Diagnóstico | 10 |
| 5. Prevenção | 13 |
| i. Estirpes atenuadas de <i>Mycobacterium</i> | 14 |
| ii. BCG recombinada | 14 |
| IV. Interação da <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com o hospedeiro | 15 |
| 1. Resposta das células T..... | 16 |
| 2. Latência | 20 |
| V. Terapêutica clássica contra infecção por <i>Mtb</i> | 21 |
| 1. Resultados do tratamento | 23 |
| 2. Tuberculose Multi-resistente (MDR-TB) | 24 |
| 3. Tuberculose pluri-resistente (XDR-TB) | 27 |
| VI. Conclusão..... | 29 |
| VII. Bibliografia | 30 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Parede celular da Mtb | 4 |
| Figura 2 - Mecanismo de ação das células Th e Tc na tuberculose | 18 |
| Figura 3 – Papel do granuloma na TB | 19 |
| Figura 4 – Infecção latente vs infecção ativa | 21 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Referências para a interpretação do teste de Mantoux | 12 |
| Tabela 2 - Doses recomendadas dos medicamentos de primeira linha para a TB em adultos | 22 |
| Tabela 3 - Classificação de resultados de tratamento em pacientes com TB | 23 |
| Tabela 4 – Classificação e dosagens utilizadas nos fármacos para o tratamento MDR-TB | 26 |

Índice de Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

BCG - Bacilo Calmette-Guerin

IFN- γ - Interferão γ

LAM - Lipoarabinomanano

MDR-TB - Tuberculose Multi-resistente

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

PAMPS - Padrão Molecular associado a Agente Patogénico

PPD - Proteínas purificadas derivadas

PRRs - Recetores de reconhecimento padrão

OMS - Organização Mundial de Saúde

SOD - Superóxido Dismutase

TB - Tuberculose

TB-P - Tuberculose Pulmonar

TB-E - Tuberculose Extra Pulmonar

Tc - Células T citotóxicas ou CD8+

Th - Células T helper ou CD4+

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

TLR - Recetores *Toll-like*

TST - Teste da Tuberculina

XDR-TB - Tuberculose Pluri-resistente

VIH - Vírus da imunodeficiência humana

I. Introdução

A tuberculose (TB) é a patologia causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A infecção é adquirida pela inalação do agente etiológico sob a forma de aerossóis e/ou poeiras. A transmissão aérea da TB dá-se de forma eficiente visto que os indivíduos infetados expetoram grandes quantidades de micobactérias, projetando estes microrganismos no ambiente, onde, com a sua cobertura externa lipídica, resistem contra o ressecamento, sobrevivendo por longos períodos de tempo no ar e na poeira (Mims *et al.*, 2004).

Evidências de que a TB já era uma doença comum no antigo Egito e no antigo Perú advêm da identificação de lesões ósseas características da infecção nas múmias que remontam há alguns milhares de anos (Ballows *et al.*, 1991).

Contudo, a origem da doença manteve-se um mistério. Por um longo período de tempo, acreditava-se que se tratava uma patologia hereditária ou uma doença de evolução espontânea (Gordon *et al.*, 2009).

A primeira sugestão de que a TB pudesse ser uma doença infecciosa foi feita por Benjami Martens, em 1720 (Doetsch, 1978). Cerca de 150 anos depois, Antoine Villemin demonstrou que a doença era transmissível de animal para animal. Por fim, em 1882, Robert Koch descobriu a Mtb, que estabeleceu a TB como uma doença infecciosa (Koch, 1882). A descoberta do organismo causador desta patologia teve um impacto semelhante a uma eventual descoberta da cura para o vírus da imunodeficiência humana (VIH) na década de 1990 (Ballows *et al.*, 1991). Aquando da descoberta do microrganismo, em 1883, Zoppf denominou-o de *Bacterium tuberculosis*, sendo que mais tarde, em 1886, Lehmann e Neumann alteraram o nome para *Mycobacterium tuberculosis*, presume-se que devido à sua semelhança com um fungo, tendo em conta a sua aparência e crescimento lento em cultura (Ballows *et al.*, 1991).

A *Mycobacterium tuberculosis* pertence ao género *Mycobacterium*, sendo este o único género da família das *Mycobacteriaceae* e está relacionado com outros géneros produtores de ácidos micólicos (Murray *et al.*, 2008). O diagnóstico atrasado da TB,

assim como a forma multi-resistente e pluri-resistente da doença constituem os maiores obstáculos ao controlo eficaz da TB no mundo (Bauquerez *et al.*, 2009).

A TB é uma das doenças mais antigas que afetam o homem, e, apesar dos avanços registados na última década relativamente à sua estrutura, ainda mantém vários segredos (Gordon *et al.*, 2009). A TB teve um grande impacto social e continua, nos dias de hoje, a ser determinante na saúde do Homem. Atualmente, a situação tem tendência a agravar-se nos países menos desenvolvidos, devido essencialmente ao sinergismo com o VIH e às estirpes de *Mtb* que se tornaram multi-resistentes (MDR) ou pluri-resistentes (XDR) a fármacos (Samper *et al.*, 2007).

Para o desenvolvimento de melhores ferramentas e estratégias para controlar e eliminar a doença são necessárias abordagens multidisciplinares, incluindo estudos epidemiológicos da TB, genómica comparativa, estudo da evolução e da interação do agente patogénico com o hospedeiro (Hoft *et al.*, 2008).

Esta dissertação tem como objectivo principal a elaboração de uma revisão sobre a *Mtb*, abordando vários pontos relacionados com a bactéria e a patologia causada: constituição do bacilo, da parede celular e identificação dos fatores de virulência subjacentes. Também será investigada a infeção, através da pesquisa científica de informação acerca da patologia, da sua epidemiologia e da coinfeção pelo VIH, focando a interação entre o agente etiológico e o hospedeiro. Por fim, será investigada a terapêutica contra a infeção por *Mtb*, assim como as suas formas multi-resistentes e pluri-resistentes.

II. Bacilo de Koch

O género *Mycobacterium* compreende uma série de bactérias gram-positivas, em forma de bastonete, aeróbios e compreende o único membro da família *Mycobacteriaceae* dentro da ordem *Actinomycetales*. À semelhança de outros *Actinomycetales*, como *Nocardia* e *Corynebacterium*, as micobactérias têm um elevado teor genómico de ligações Guanina-Citosina no seu ADN e são capazes de produzir ácidos micólicos, como principais componentes da sua parede celular.

O *taxon* da *M. tuberculosis* é complexo e inclui *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii* e *M. pinnipeddi*, formado um pequeno e discreto grupo de organismos, que exibem mais de 95% de homologia no que diz respeito ao seu ADN. A Mtb tem um nível de variação genética muito baixo, sugerindo que toda a população de organismos Mtb resultou da expansão clonal após um estrangulamento evolutivo à cerca de 35000 anos atrás (Murray *et al.*, 2008).

A Mtb é o agente causador da TB - uma doença infecciosa crónica, com uma incidência crescente em todo o mundo. Esta espécie tem uma maior morbilidade em seres humanos do que qualquer outra patologia de origem bacteriana.

1. Constituição geral do bacilo

Esta bactéria é intracelular facultativa, quase estritamente aeróbia e possui um crescimento extremamente lento. A taxa de crescimento lento é resultado da parede celular resistente que se opõe à passagem de nutrientes para o interior da célula e impede a excreção de resíduos de produtos para fora da célula. A parede celular deste microorganismo assemelha-se a uma parede celular gram-positiva modificada, contendo a típica camada polipeptídica, a camada de peptidoglicano e lípidos livres; o alto teor lipídico destas bactérias fazem delas ácido-alcool resistentes (Groisman *et al.*, 1997).

A parede celular das micobactérias é uma estrutura complexa e única, que contém proteínas, lípidos e carboidratos, alguns dos quais componentes altamente virulentos, e excelentes alvos terapêuticos (Smith, 2003).

A parede celular (Figura 1) é composta por três tipos de macromoléculas, mais concretamente, peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos. No exterior da membrana celular encontra-se peptidoglicano, que estabelece ligações covalentes com o arabinogalactano, o qual por sua vez está ligado a ácidos micólicos, também por ligações covalentes. Este é designado como o núcleo da parede celular - o complexo Micolil-Arabinogalactano-Peptidoglicano. A parede celular também contém outras proteínas intercaladas, como por exemplo, o manosídeo de fosfatidilinositol e os lípidos de tiocerol, lipomanano e lipoarabinomanano- LAM (Brennan, 2003).

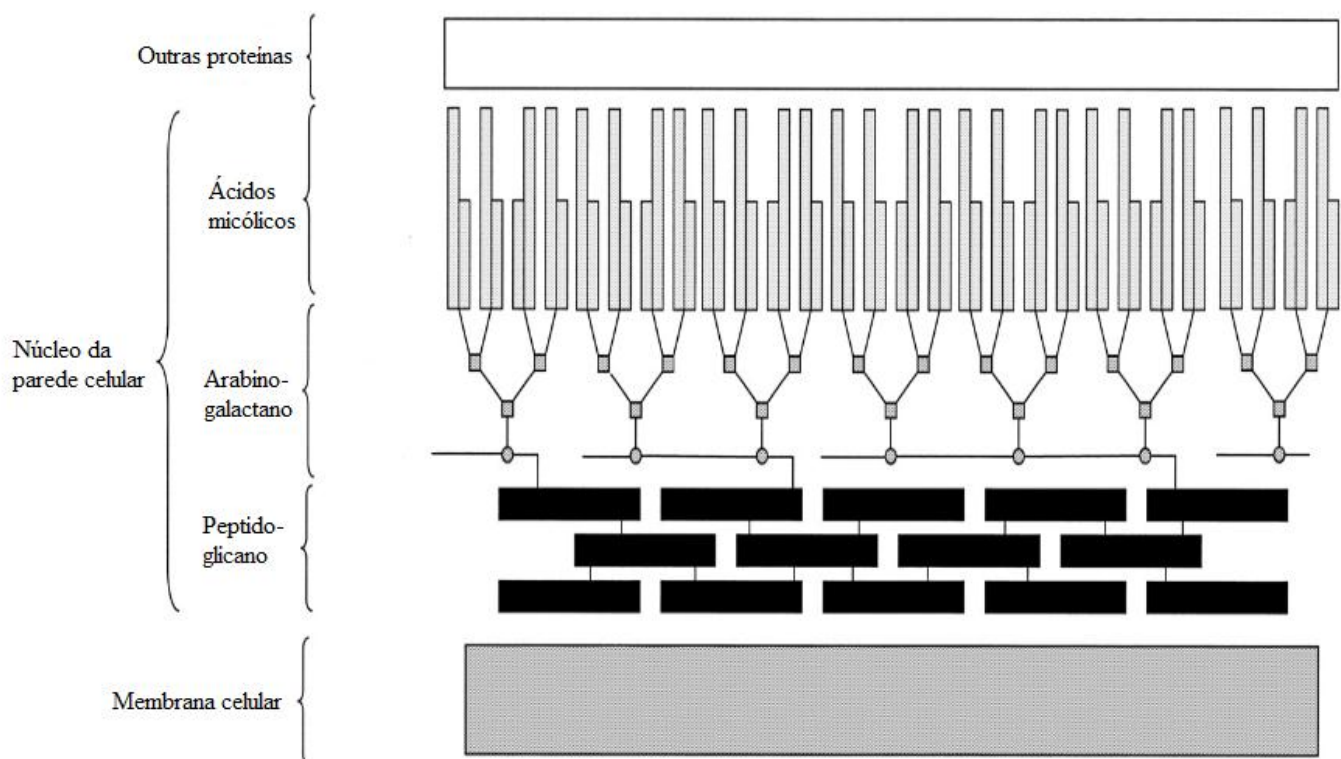


Figura 1 - Parede celular da Mtb (adaptado de Crick *et al.*, 2001).

A parede celular contém ácidos gordos complexos, tais como os ácidos micólicos responsáveis pela aparência cerosa e impermeabilidade da parede assim como pela sua patogenicidade. Estes ácidos encontram-se ligados à membrana celular, mas também, quando acoplados a um componente carbohidratado, formam uma estrutura típica denominada de cordão- dimicolato de trealose, um glicolípido que consiste em duas moléculas de ácidos micólicos (um ácido gordo α -ramificado e β -hidroxilado, com 90 átomos de carbono) com ligações à trealose (Forreland *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2001).

2. Fatores de virulência

Nos últimos anos houve avanços consideráveis no que toca ao entendimento da base molecular da patogenicidade, virulência e persistência das micobactérias. Um destes avanços consistiu na identificação de alguns genes de virulência micobacterianos essenciais. A maioria dos genes associados a virulência codificam enzimas para vários tipos de lípidos, proteínas da superfície celular e proteínas de transdução de sinal (Forreland *et al.*, 2013).

Os principais fatores de virulência são: a biossíntese de ácidos micólicos, visto que formam uma barreira permeável da parede celular do agente patogénico e que, em caso de alteração podem levar ao aumento da sua patogenicidade; a biossíntese de lípidos complexos; o catabolismo do colesterol- quando no meio intracelular, a Mtb altera o seu metabolismo à base de carboidratos para um metabolismo à base de ácidos gordos, utilizando assim o colesterol como fonte de energia e para a biossíntese de lípidos complexos; as proteínas existentes na parede celular, responsáveis pela adesão, infeção, transporte de solutos (porinas) e pela sobrevivência da micobactéria nas células do hospedeiro; as proteínas existentes na parede celular que permitem à bactéria resistir ao stress provocado, por espécies reativas de oxigénio e azoto, no macrófago; a capacidade do agente patogénico interromper o processo normal de maturação do fagócito, o que permite a sua sobrevivência no interior do macrófago; os fatores capazes de inibir a ocorrência da apoptose, evitando assim a morte das células infetadas; e a existência de reguladores da expressão de genes, que permitem a adaptação da Mtb aos potenciais fatores adversos no organismo do indivíduo infetado (Forreland *et al.*, 2013).

No hospedeiro, sob circunstâncias normais de fagocitose de um microorganismo, os fagossomas fundem-se com os lisossomas e o conteúdo do fagossoma é exposto a hidrolases lisossomais e a espécies reativas do oxigênio e azoto que destroem o mesmo. A Mtb desenvolveu vários mecanismos para contornar o ambiente hostil do macrófago, tal como inibir a fusão entre o fagossoma e o lisossoma e a escapar do ambiente ácido dentro do fago-lisossoma, fazendo destes mecanismos fatores de virulência chave desta bactéria (Janeway *et al.*, 2002).

Como tal, os complexos de ácidos gordos e carboidratos que o agente patogénico forma e inibem a fusão entre o fagossoma e lisossomas são, frequentemente, considerados como indicadores de estirpes virulentas. É de se salientar que as formas não virulentas de Mtb são rapidamente destruídas, intracelularmente (Klein, 1982).

É notório a falta de fatores de virulência clássicos tais como toxinas, típicos de outros agentes patogénicos bacterianos, além de que, muitos dos genes de virulência da espécie *Mycobacterium* encontram-se também em micobactérias não patogénicas. Isto sugere que as espécies patogénicas adaptaram os seus genomas para o meio intracelular, com a aquisição mínima de genes virulência exclusivos (Forreland *et al.*, 2013).

III. Infecção por *Mycobacterium Tuberculosis*

1. Epidemiologia

No mundo atual industrializado, os locais com maior prevalência da TB incluem populações mais pobres, sem-abrigo, presidiários, alcoólicos, consumidores de drogas administradas por via intravenosa e idosos em geral (Murray *et al.*, 2008).

Geralmente, pessoas com infecção latente têm um risco de 10% durante a sua vida para o desenvolvimento de TB ativa. Por outro lado, pacientes com infecção pelo VIH têm um risco acrescido de 10 a 15% de a doença se manifestar (Murray *et al.*, 2008).

Em 2011, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existiram aproximadamente 8,7 milhões casos de incidência da TB (dos quais 13% co-infectados pelo VIH). Registaram-se também 1,4 milhões de mortes causadas pela TB, sendo que 990 000 mortes decorreram em doentes não infectados pelo VIH e 430 000 em doentes infectados pelo VIH. De entre estas mortes, estão incluídas 0,5 milhões de mulheres, fazendo da TB uma das principais causas de morte entre as mulheres, a um nível mundial (WHO, 2012).

Em Portugal, em 2011, foram diagnosticados 2388 casos de TB, incluindo casos novos e repetições do tratamento, dos quais 2016 são nacionais e 372 são estrangeiros residentes em Portugal. A incidência foi de 2231 novos casos. Isto representa uma redução de 9,6% relativamente à taxa de incidência definitiva em 2010, dando continuidade à evolução para uma diminuição consistente desde 2002. Tendo em conta a evolução desde 2002, Portugal teve um decréscimo médio anual de 6,4% da taxa de incidência da TB (Ministério da Saúde, 2012).

2. Tuberculose

A Mtb é transportada em partículas suspensas no ar (gotículas), originadas no momento em que um doente, com tuberculose pulmonar (TB-P), tosse. Estas partículas, de 1 a 5 nanómetros de diâmetro, são mantidas suspensas por correntes de ar normais e a infeção ocorre quando uma pessoa suscetível inala os aerossóis infectados. Uma vez nos alvéolos, os organismos são fagocitados pelos macrófagos alveolares (Murray *et al.*, 2008).

A infeção primária, como acima referido, ocorre por inalação do organismo em gotículas, sob a forma de aerossóis expelidas por uma pessoa infectada. O microorganismo inicialmente replica-se em células epiteliais e macrófagos dos alvéolos pulmonares que após necrose e/ou apoptose permitem a disseminação da bactéria a outras áreas dos pulmões e aos gânglios linfáticos da região. Desenvolve-se então uma reação imune celular, que actua limitando a bacteria espacialmente e induzindo a diminuição da sua replicação, através da formação de uma estrutura celular sólida. (Gengenbacher e Kaufmann, 2012). Normalmente, a resposta imune, mediada pelas

células do hospedeiro, limita as multiplicações e a consequente disseminação da Mtb. No entanto, alguns bacilos podem permanecer viáveis mas latentes por muitos anos após a infecção inicial (McMurray, 1996).

O macrófago alveolar infetado pela Mtb assume uma forma alongada e característica, que se assemelha a uma célula epitelial, organizando-se de forma concêntrica, e formando um pequeno nódulo. À medida que este cresce, as células no seu centro fundem-se para formar células gigantes com dezenas de núcleos na sua periferia e bacilos viáveis no citoplasma – células epitelióides gigantes. A superfície do nódulo reveste-se com uma “película” de linfócitos T e fibroblastos em proliferação, formando o chamado granuloma ou tubérculo; as células no núcleo desta estrutura morrem, devido à falta de oxigénio e nutrientes, e este pode calcificar e dar origem à sombra característica, visível em imagens de raio-X de pulmões tuberculosos. Alguns dos tubérculos podem romper, libertando bacilos infecciosos para as zonas vizinhas do pulmão e deixando uma cavidade no parênquima pulmonar. À medida que a doença progride, cada vez mais o parênquima é destruído, até que é atingida uma fase em que o pulmão não é mais capaz de suprir o corpo com a quantidade suficiente de oxigénio (Klein, 1982). A infecção dos pulmões tem sintomas muito característicos como a tosse crónica e expectoração com sangue, devido à destruição tecidual. A necrose pode ainda causar erosão dos vasos sanguíneos, levando assim à morte por hemorragia (Mims *et al.*, 2004).

Apesar da infecção inicial ser pulmonar, podem ser estabelecidos focos de infecção pela Mtb em quase todos os locais do organismo humano e as manifestações clínicas passam pela tosse seca e contínua, perda de peso, fadiga, fraqueza e febre (Mims *et al.*, 2004).

A TB em adultos é uma patologia de progressão lenta, caracterizada por uma inflamação crónica e transformação do tecido pulmonar afetado numa massa caseosa. Os focos de infecção podem romper nos brônquios, permitindo que um grande número de bactérias se espalhe para outras áreas dos pulmões (Murray *et al.*, 2008).

A infecção latente pela TB consiste no estado em que o bacilo está adormecido, não revelando sinais clínicos, sintomas ou alterações nas radiografias ao tórax, e não podendo ser transmitida para outro indivíduo (Druscynska *et al.*, 2012). Em alguns indivíduos, nomeadamente imunodeprimidos, a infecção latente pode progredir para TB ativa, revelando-se as manifestações habituais referidas atrás e sendo transmissível (Center for Disease Control and Prevention, 2012).

A TB-P refere-se a qualquer caso bacteriologicamente confirmado ou diagnosticado clinicamente de TB envolvendo o parênquima pulmonar ou a árvore brônquica. A Tuberculose miliar é classificada como TB-P, visto que há lesões nos pulmões. A linfadenopatia intra-torácica tuberculosa (mediastino e/ou hilar) ou derrame pleural tuberculoso, sem alterações radiográficas nos pulmões, constitui um caso de tuberculose extrapulmonar. Um paciente com TB-P e extrapulmonar deve ser classificado como um caso de TB-P (WHO, 2013).

Tuberculose extrapulmonar (TB-EP) refere-se a qualquer caso bacteriologicamente confirmado ou diagnosticado clinicamente da TB envolvendo outros órgãos além dos pulmões, por exemplo, pleura, gânglios linfáticos, abdómen, trato urinário, pele, articulações e ossos, meninges, entre outros (WHO, 2013).

As manifestações extra-pulmonares da infecção por *Mtb* incluem linfadenopatia cervical, pleurite, pericardite, sinovite, meningite, e infeções da pele, articulações, ossos e órgãos internos (Murray *et al.*, 2008).

3. Co-infeção pelo VIH

Nos dias de hoje, a infecção pelo VIH é o maior fator de risco conhecido para a progressão de infecção latente para tuberculose ativa. A co-infeção por VIH, especialmente combinada com a resistência a fármacos, tem originado surtos da doença com altas taxas de mortalidade. Outros grupos com maior probabilidade de progressão da infecção latente para a TB ativa também incluem indivíduos com condições médicas

subjacentes, crianças com quatro anos ou menos, e pessoas com lesões fibróticas e cancerígenas detetadas em radiografias de tórax (Murray *et al.*, 2008).

Em relação ao quadro clínico da TB, a doença pulmonar em pacientes com infecção pelo VIH, muitas vezes difere em imagens radiológicas, pois é rapidamente progressiva e dissemina com mais frequência, às vezes mesmo sem a formação de granulomas (Murray *et al.*, 2008).

Existe também uma classificação da TB, baseada na seropositividade para o VIH. Assim sendo, e segundo a OMS, existem 3 grupos: paciente com TB e VIH-positivo, ou seja, qualquer caso bacteriologicamente confirmado ou diagnosticado clinicamente de TB, que tenha associado um resultado positivo no teste do VIH; paciente com TB e VIH-negativo, que se atribui aos casos bacteriologicamente confirmados ou diagnosticados clinicamente de TB, acompanhados de um resultado negativo no teste do VIH; e paciente com TB e VIH-desconhecido, ou seja, um paciente com TB bacteriologicamente confirmada ou diagnosticada clinicamente, que não tem resultado no teste de VIH, por não o ter feito, ou por aguardar o resultado. Se o estado da infecção por VIH do paciente é posteriormente determinado, a condição deve ser reclassificado em conformidade (WHO, 2013).

4. Diagnóstico

Um caso de TB bacteriologicamente confirmado é aquele de quem a amostra biológica é positiva por baciloscopia, cultura ou por métodos de diagnóstico rápidos aprovados pela OMS. Todos esses casos devem ser notificados, independentemente do fato do tratamento da TB ter sido iniciado, ou não (WHO, 2013).

Um caso de TB diagnosticado clinicamente é aquele que não cumpre os critérios para a confirmação bacteriológica, mas foi diagnosticado como tuberculose ativa por um médico clínico ou outro que decidiu dar ao paciente o percurso de tratamento da TB. Esta definição inclui os casos diagnosticados com base em anomalias nos raios-X ou nas análises histológicas, que sejam sugestivas ou casos extra-pulmonares sem confirmação laboratorial. Casos clinicamente diagnosticados posteriormente

considerados bacteriologicamente positivos (antes ou depois do início do tratamento) devem ser reclassificados como bacteriologicamente confirmados (WHO 2013).

A infecção num indivíduo assintomático pode ser diagnosticada com a ajuda do Teste da Tuberculina - TST, que consiste na injeção intradérmica de proteínas purificadas derivadas da Mtb- PPD, inicialmente purificadas com ácido tricloroacético e depois com sulfato de amónio. A introdução intradérmica de PPD em pessoas previamente infetadas resulta no aparecimento de uma reação celular retardada (48 a 72h), com ou sem eritema, no local em questão. A reação reflete um infiltrado de linfócitos, monócitos e macrófagos que no contato com o antígeno libertam citocinas e mediadores inflamatórios causando edema, inchaço e dor - pápula. Contudo, o resultado positivo no TST não permite distinguir se a infecção é presente ou se ocorreu no passado. Caso ocorra uma alteração do resultado negativo para positivo, o indivíduo requer a atenção de um profissional de saúde (McMurray, 1996).

O TST ou Teste de Mantoux requer que seja injetado intradermicamente um volume de 0,1 mililitros com uma determinada quantidade de PPD (5 unidades de tuberculina). O diâmetro do endurecimento no local de aplicação é medido de 48 a 72 horas depois da injeção. A interpretação do resultado varia, como se pode observar na tabela apresentada (Tabela 1) (McMurray, 1996).

Tabela 1 - Referências para a interpretação do teste de Mantoux (adaptado de McMurray, 1996)

| Diâmetro de endurecimento (em milímetros) | Pessoa em que a reação de endurecimento é considerada positiva |
|--|---|
| ≥ 5 | Indivíduos imunossuprimidos, ou que tenham tido um recente contato íntimo com uma pessoa com TB ativa, ou um indivíduo com uma radiografia do tórax anormal e compatível com TB |
| ≥ 10 | Nascidos em países com alta prevalência de TB, pessoas com baixo rendimento, usuários de drogas injetáveis, os residentes em instalações de correção ou lares de idosos, ≥ 70 anos, ≤18 anos, profissionais de saúde, funcionários de laboratórios que trabalhem com micobactérias, condição médica associada a um aumento do risco de ser infectado pela TB (diabetes mellitus, uso de corticosteróides de forma prolongada, gastrectomia, má absorção crônica, silicose, ≥ 10% abaixo do peso ideal). |
| ≥ 15 | Todos os outros indivíduos |

Caso um indivíduo apresente sintomas sugestivos de TB, devem ser recolhidas amostras clínicas (como a expectoração), sendo estas amostras analisadas em meio de cultura para bacilos álcool-ácido resistentes. Para a detecção de micobactérias, são usados fluorocromo e carbol fucsina, sendo o primeiro o mais recomendado pela bibliografia. Se o esfregaço for corado com carbol fucsina, as micobactérias, geralmente, aparecem com uma forma de barras vermelhas, com cerca de 1-10 µm de comprimento e 0.2-0.6 µm de largura, muitas vezes com uma forma frisada, podendo aparecer também com uma forma de coco ou filamentosa. Em geral, a aparência microscópica de micobactérias não proporciona uma identificação da espécie, mas pode ser sugestiva (McMurray, 1996). Um método de coloração amplamente utilizado para a identificação da Mtb é a coloração de Ziehl-Neelsen - a mais adequada para a Mtb uma vez que esta é um bacilo álcool-ácido resistente, devido ao elevado teor de ácidos micólicos na sua

parede celular, o que torna este microorganismo hidrofóbico, ou seja, os corantes aquosos não têm a capacidade de o corar (Chen *et al.*, 2012).

5. Prevenção

A vacina Bacilo Calmette-Guerin (BCG) foi introduzida à quase cem anos atrás e ainda hoje é a única vacina disponível e usado contra a TB (Morandi *et al.*, 2013). No que toca à segurança, a BCG tem um histórico que o comprova e é certamente uma das vacinas administradas com mais frequência em todo o mundo (Brennan *et al.*, 2007). Em países onde a TB é endêmica, os recém-nascidos são imunizados com BCG após o nascimento, uma vez que protege as crianças das formas mais insidiosas de TB, tal como a infecção disseminada e a meningite tuberculosa (Morandi *et al.*, 2013). No entanto, a eficácia da BCG no que toca à proteção contra as formas mais comuns de TB no adulto foi questionada por vários estudos clínicos, e existe um consenso comum que a BCG é incapaz de proporcionar uma proteção significativa contra a TB-P, que é a única forma de TB transmissível (Colditz *et al.*, 1995; Kaufmann, 2010).

Nas últimas duas décadas, graças à pesquisa em torno da TB, foram feitos grandes esforços para desenvolver uma vacina nova e melhorada: vacinas de ADN com subunidades para diversos antigénios de *Mtb* foram testadas em ensaios pré-clínicos em animais (Morandi *et al.*, 2013). Os resultados obtidos variaram de acordo com a vacina utilizada, embora muito poucas vacinas experimentais fossem capazes de induzir uma resposta imunitária protetora superior à induzida pela BCG (Aagaard *et al.*, 2011; Hinchey *et al.*, 2007; Sali *et al.*, 2008; Weinrich *et al.*, 2001). Por outro lado, têm sido feitas várias tentativas para obter estirpes atenuadas de *Mtb* que, sendo igualmente ou até menos virulentas do que a BCG, poderiam induzir uma melhor proteção contra a infecção (Sambandamurthy e Jacobs, 2005). Em qualquer situação, nenhuma destas novas vacinas foi capaz de prevenir a infecção. Estes resultados, juntamente com o fato de que a BCG é eficaz na prevenção das formas mais severas de TB em crianças, faz com que a substituição da BCG por uma nova vacina não seja, para já, viável (Brennan, 2005).

Assim sendo, o foco da investigação dirige-se para o desenvolvimento de uma versão melhorada da BCG que possa ser administrada em substituição da estirpe atualmente disponível: modificar a BCG de forma a que esta expresse antígenos selecionados da Mtb ou mesmo outras proteínas que possam melhorar a imunogenicidade e aumentar a atividade preventiva contra a TB. Algumas destas vacinas recombinantes passaram com sucesso os testes pré-clínicos e foram iniciados os ensaios em humanos (Morandi *et al.*, 2013).

i. Estirpes atenuadas de *Mycobacterium*

Uma vez que, por razões éticas, a imunização de crianças pela BCG não pode ser interrompida, foram feitos esforços para desenvolver melhores estirpes de micobactérias, vivas e atenuadas, capazes de induzir uma melhor e mais longa imunidade contra a Mtb. Diversos grupos têm tentado desenvolver novas estirpes atenuadas através da inativação de um ou mais genes selecionados na Mtb para se obter uma vacina segura capaz de expressar todos os antígenos do agente patogénico. Muitas estirpes foram obtidas e testadas e os resultados dos estudos pré-clínicos foram promissores, em alguns casos, com uma atividade protetora melhorada de algumas destas vacinas, quando comparado com a BCG. Entre as vacinas mais avançadas de Mtb atenuada, encontra-se a MTBVAC01. No entanto, mesmo sendo promissora em termos de proteção contra a infeção, as estirpes vivas atenuadas de Mtb têm de cumprir normas de segurança mais rigorosas do que a maioria das outras vacinas e a obtenção da aprovação pode levar um longo tempo. Assim sendo, a imunização com BCG continua a ser o caminho de escolha (Martins *et al.*, 2006; Morandi *et al.*, 2013).

ii. BCG recombinada

Outra opção para se desenvolver uma vacina viva atenuada melhorada consiste em alterar a vacina BCG atual para melhorar a sua ação preventiva. Nas últimas duas décadas, têm sido feitas várias tentativas e iniciaram-se os ensaios clínicos em humanos para três estirpes de BCG recombinadas: rBCG30, VPM1002 e a AERAS-422. A rBCG30 demonstrou a capacidade de induzir proteção melhorada em modelos animais, em comparação com a estirpe original, mantendo um bom histórico de segurança

(Horwitz e Harth, 2003). A VPM1002 induziu melhor proteção em relação à BCG e este efeito foi atribuído à sua capacidade de estimular diferentes populações de células T envolvidas na imunidade (Grode *et al.*, 2002). A VPM1002 está atualmente a passar por testes de fase II para que seja avaliada a sua imunogenicidade e segurança na população alvo (Kaufmann e Gengenbacher, 2012). Por fim, a AERAS-422 revela uma maior capacidade de induzir uma proteção eficaz em modelos animais pré-clínicos, no entanto, a fase I do estudo clínico foi interrompida por causa de um efeito adverso observado em dois participantes (Sun *et al.*, 2009).

IV. Interação da *Mycobacterium tuberculosis* com o hospedeiro

A capacidade de um agente patogénico bacteriano sobreviver num organismo hospedeiro requer a expressão de uma série de determinantes ambientais, genéticos e imunológicos envolvidos na interação patogénio-hospedeiro, permitindo assim que o agente em questão possa suportar o *stress* fisiológico e ambiental (Groisman *et al.*, 1997).

Os recetores de reconhecimento padrão – PRRs, reconhecem padrões moleculares associados aos agentes patogénicos (PAMPs) e este contato dá origem a uma sequência coordenada de eventos, que inclui o recrutamento de células e a formação de mediadores inflamatórios no local de contacto inicial com o patogénio (Arosa *et al.*, 2013). Os PRRs envolvidos no reconhecimento das micobactérias são maioritariamente os TLR – *Toll-like receptors*, os receptores de manose e os receptores NOD expressos por macrófagos e células dendríticas, (Huynh *et al.*, 2011)

Como foi atrás referido, após a infeção a fagocitose envolve a ingestão, a formação do fagossoma, a maturação do mesmo e fusão com lisossomas o que leva à eliminação das partículas ingeridas (Lim *et al.*, 2013).

Após o reconhecimento e ingestão do agente patogénico, este é retido no fagossoma que vai sofrer maturação. A maturação do fagossoma consiste na transformação do interior do mesmo num ambiente fortemente ácido e oxidante, enriquecido com enzimas

hidrolizantes que permitem então a degradação do microorganismo no seu interior – fusão fagolisossômica (Aderem e Underhill, 1999). A Mtb consegue, num estado inicial, evitar que a maturação do fagossoma avance, não ocorrendo então a fusão e ocorrendo o escape da micobactéria (Fischer *et al.*, 2013).

1. Resposta das células T

A TB, como atrás referido, é frequentemente, uma doença pulmonar. Aquando da inalação das gotículas infetadas pelo bacilo de Koch, estes são envolvidos por macrófagos alveolares que os transportam até aos gânglios linfáticos e dando início à resposta imunitária (Kaufmann, 2002). A reação imunitária do organismo passa por manter os microorganismos limitados aos granulomas (Mims *et al.*, 2004).

Diferentes células T, ativadas por células dendríticas e macrófagos maioritariamente, participam na resposta imunitária aos bacilos micobacterianos: células T CD4⁺ ou Th que reconhecem os péptidos antigénicos no contexto de MHC de classe II; células T CD8⁺ ou Tc que reconhecem péptidos antigénicos no contexto do MHC de classe I; células T $\gamma\delta$ que reconhecem ligandos antigénicos de natureza lipídica e células T CD1⁺ que reconhecem glicolípidos presentes na parede celular das micobactérias (Kaufmann, 2002).

As células Th sensibilizadas libertam citoquinas Th1- pro-inflamatórias, que ativam macrófagos e aumentam a sua capacidade de destruir as micobactérias (Mims *et al.*, 2004). As citoquinas são proteínas, que têm o papel de modular as respostas imunitárias, ativando macrófagos e células Tc e mediando o seu afluxo ao local (List e Neri, 2013; Ramesh *et al.*, 2013). Esta interação entre as células T e os macrófagos está na origem da formação dos granulomas (Kaufmann, 2002). Quando o granuloma deixa de ser capaz de conter as micobactérias ocorre a disseminação dos bacilos para outros locais do tecido, outros órgãos e até mesmo para o ambiente – a TB torna-se ativa e o paciente torna-se contagioso (Kaufmann, 2002).

Dentro das citocinas produzidas pelas células T na resposta à micobactéria destaca-se o interferão γ - IFN- γ , mediador central da ativação dos macrófagos. O IFN- γ sinergiza com o fator de necrose tumoral - TNF- α , outra citocina chave na ativação de macrófagos. Algumas das células T, nomeadamente, as Tc ou CD8+ secretam perforinas e granzimas, capazes de matar as micobactérias diretamente dentro dos macrófagos (Kaufmann, 2002).

As células Tc reconhecem macrófagos infectados que expressam antígenos micobacterianos e lisam essas células, libertando as micobactérias a partir da sua zona protegida e expondo-as a outros macrófagos ativados (McMurray, 1996).

O processo de resposta Th e Tc encontra-se sintetizado na Figura 2.

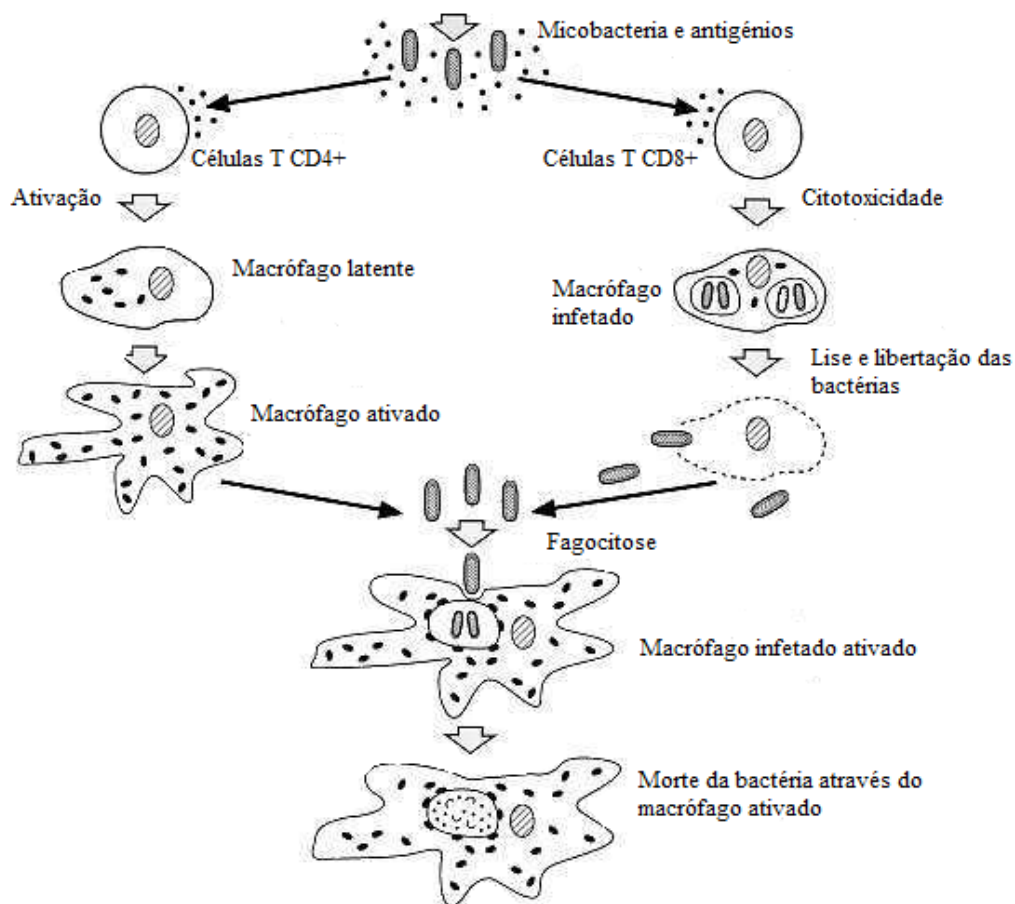


Figura 2 - Mecanismo de ação das células Th e Tc na tuberculose (adaptado de McMurray, 1996).

A imunidade adquirida após uma infecção micobacteriana geralmente desenvolve-se em 4 a 6 semanas e está associada ao aparecimento de hipersensibilidade retardada a antígenos derivados de micobactérias. Uma reação imunitária bem sucedida é mediada por linfócitos T uma vez, que apesar da presença de anticorpos antimicobacterianos, estes não desempenham um papel protetor na TB (McMurray, 1996).

Os indivíduos saudáveis podem controlar o agente patogénico após infecção inicial, mas permanecem infectados de forma latente e, portanto, em risco de reativação ao longo da vida. A maturação do granuloma (sólido, necrótico, caseoso) ocorre a velocidades diferentes e, normalmente, culmina na coexistência de TB ativa. O granuloma caseoso perde a sua solidez devido à decadência do centro da célula hospedeira, proveniente da

acumulação de detritos. A *Mtb* cresce até números elevados, é libertada para as vias aéreas e tossida como aerossol, sendo este contagioso. Este processo encontra-se ilustrado na figura abaixo apresentada (Figura 3) (Gengenbacher e Kaurmann, 2013).

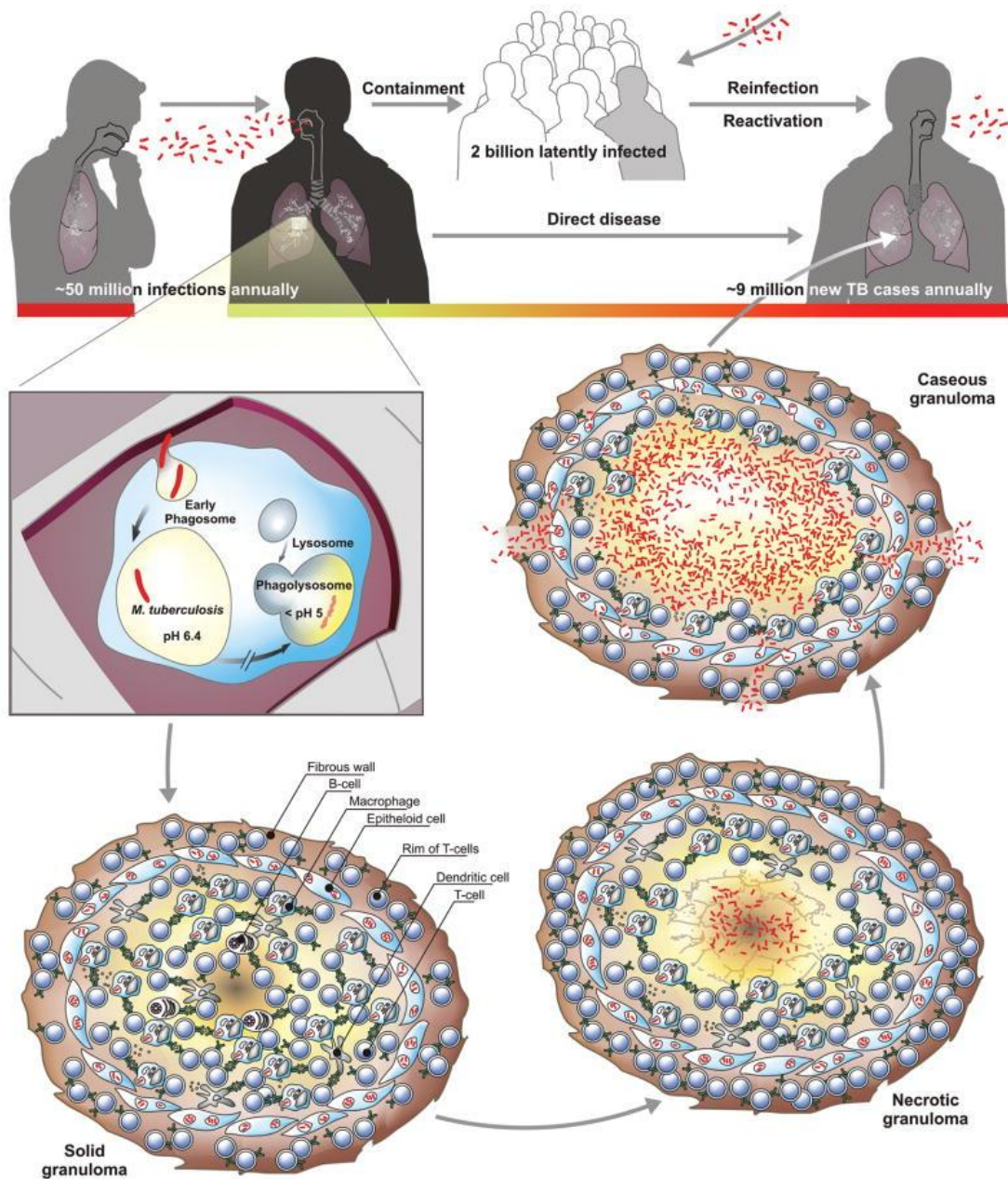


Figura 3 – Papel do granuloma na TB (adaptado de Gengenbacher e Kaurmann, 2013).

2. Latência

A *Mtb* pode estabelecer uma infecção persistente a longo prazo sem causar qualquer sintoma, sendo esta condição denominada de infecção latente de TB (Yamashita *et al.*, 2012). Apenas uma pequena porção dos indivíduos infectados desenvolvem doença clínica (ou seja, TB ativa), que ocorre quando o mecanismo de defesa para a TB é alterado devido às más condições de saúde, tais como desnutrição e envelhecimento, e/ou devido à imunodeficiência causada pela infecção com o VIH, como referido atrás (Lawn e Zumla, 2011). O risco da infecção no estado latente passar a ativa é cerca de 5-10%, ainda que este grupo de indivíduos (com infecção latente) possa beneficiar de um tratamento profilático (Horsburgh, 2004). Contudo, devido à grande maioria das pessoas com a infecção latente não desenvolver TB ativa, não é prático tratar todos estes indivíduos. O diagnóstico da TB latente é confirmado na presença de um resultado TST positivo em conjunto com raios-X da zona torácica não indicativos de TB ativa, com os testes microbiológicos negativos, e na ausência de sintomas clínicos (Dessein *et al.*, 2013).

Tal como ilustra a Figura 4, a infecção latente é caracterizada pelo predomínio de bacilos adormecidos e apenas uma diminuta porção dos bacilos se encontram ativos e no interior do granuloma sólido. Uma vez que o ambiente oferece condições mais favoráveis, por exemplo, num granuloma caseoso, os bacilos ativos fazem com que os bacilos dormentes se tornem ativos, provavelmente pela secreção de fatores promotores de crescimento (Rpf). Alguns organismos permanecem latentes e, portanto, resistentes aos medicamentos, explicando o longo tempo de tratamento necessário para curar a TB ativa (McMurray, 1996).

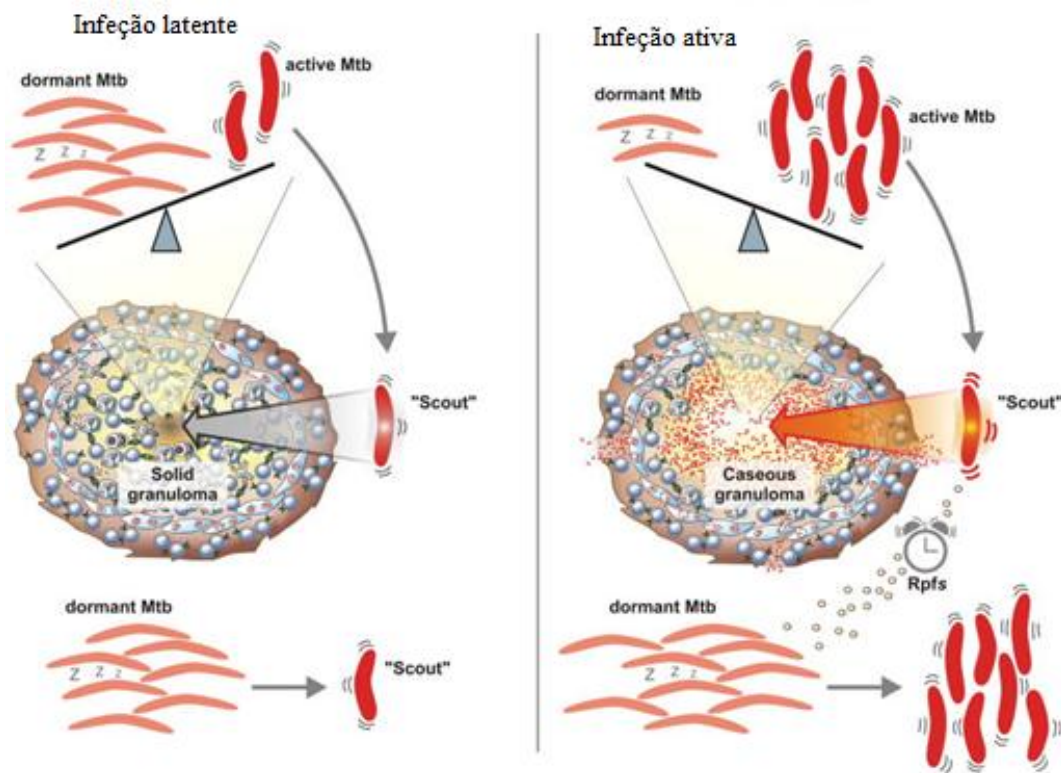


Figura 4 – Infeção latente vs infeção ativa (adaptado de McMurray, 1996).

V. Terapêutica clássica contra infecção por *Mtb*

A TB é uma doença curável e quando ativa, é tratada com recurso a um tratamento padrão de combinação de antibióticos que são fornecidos com a informação, supervisão e apoio ao paciente por um profissional de saúde. Sem essa supervisão e apoio, a adesão ao tratamento pode ser difícil e a doença pode se espalhar. A grande maioria dos casos de TB pode ser curada quando os medicamentos são fornecidos e tomados corretamente (WHO, 2013).

A TB é tratada com recurso a uma combinação de vários medicamentos, incluindo isoniazida, rifampicina, estreptomicina, pirazinamida e etambutol (Tabela 2); destacam-se a isoniazida como inibidora da síntese de ácidos micólicos e o etambutol como inibidor da formação de arabinogalactano (Coll, 2003; Hardman e Limbird, 2003).

A pirazinamida é um pro-fármaco que precisa de ser transformado no ácido pirazínico pela pirazinamidase bacteriana, e tem uma ação bactericida inibindo a síntese dos ácidos micólicos pela *Mtb* (Shi *et al.*, 2011).

A terapia de combinação de isoniazida e rifampicina (inibidora da síntese de DNA micobacteriano) tem sido particularmente eficaz. No entanto o crescimento intracelular da Mtb torna mais difícil para os fármacos alcançar os bacilos e por esse motivo, a terapia com o fármaco deve ser mantida durante pelo menos 9 meses para erradicar as bactérias. Alguns pacientes com TB não apresentam quaisquer sintomas clínicos, e alguns pacientes com sintomas começam a sentir-se melhor dentro de 2-4 semanas após o início do tratamento. Os efeitos colaterais associados à terapia com antibióticos são habituais, e como o paciente se sente melhor rapidamente, muitos param de tomar a medicação, muito antes de concluir o tempo de tratamento recomendado. Devido ao fato do tratamento poder não erradicar rapidamente os organismos, uma estirpe resistente pode emergir. O não cumprimento dos regimes de tratamento necessários são um dos aspetos mais preocupantes do grande número de casos de TB que aparecem todos os anos, o que compromete claramente os esforços para conter a disseminação da doença (Goldsby *et al.*, 2001).

Tabela 2 - Doses recomendadas dos medicamentos de primeira linha para a TB em adultos (adaptado de Cavalcante *et al.*, 2010).

| Medicamento | Dose recomendada | | | |
|-----------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| | Diariamente | | 3 vezes por semana | |
| | Dose e intervalo (mg/kg) | Máximo (mg) | Dose e intervalo (mg/kg) | Máximo diário (mg) |
| Isoniazida | 5 (4-6) | 300 | 10 (8-12) | 900 |
| Rifampicina | 10 (8-12) | 600 | 10 (8-12) | 600 |
| Pirazinamida | 25 (20-30) | - | 35 (30-40) | - |
| Etambutol | 15 (15-20) | - | 30 (25-35) | - |
| Estreptomicina | 15 (12-18) | | 15 (12-18) | 1000 |

Segundo a OMS, existem 2 grupos principais de doentes com TB, tendo por base o tratamento, sendo estes os “Novos pacientes”, que nunca fizeram antibioterapia ou não

completaram um mês da mesma e os “Pacientes já tratados anteriormente”, que receberam pelo menos um mês de antibioterapia (WHO, 2013).

Dado que a TB é uma doença curável e que a infecção pelo VIH pode agora ser controlada, embora com terapia medicamentosa ao longo da vida, a mortalidade persiste alta por três razões principais: a TB não foi diagnosticada nos indivíduos que se conhece a existência da infecção pelo VIH e que estavam a utilizar a terapia anti-retroviral; o VIH não era diagnosticado naqueles indivíduos com TB e, portanto, esses pacientes não beneficiaram de cuidados e de tratamento para a infecção pelo VIH; e, por fim, quando as duas doenças foram diagnosticadas e tentaram tratar as patologias, contudo, essas intervenções aconteceram tarde demais (Anthony *et al.*, 2012).

1. Resultados do tratamento

De acordo com os efeitos obtidos, podemos classificar os resultados do tratamento de TB, incluídos na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação de resultados de tratamento em pacientes com TB (adaptado de WHO, 2013).

| Resultado | Definição |
|-------------------------|--|
| Curado | Um paciente com TB-P bacteriologicamente confirmada no início do tratamento, que através de baciloscopia ou cultura obtém resultado negativo para o bacilo durante o último mês de tratamento. |
| Tratamento completo | Um paciente que completou o tratamento sem falhas, mas sem registo de resultados através de baciloscopia e cultura, durante o último mês de tratamento |
| Tratamento falhou | Um paciente com resultado positivo em baciloscopia ou cultura, 5 meses após o início do tratamento |
| Morte | O paciente morre por qualquer razão antes de começar ou durante o tratamento. |
| Perdeu o acompanhamento | Um paciente que não começou o tratamento ou que o tratamento foi interrompido durante 2 meses ou mais. |

| | |
|-----------------------|--|
| Não avaliado | Um paciente a quem o resultado do tratamento não foi atribuído. Isto inclui casos "transferidos" para outra unidade de tratamento, bem como os casos para os quais o resultado do tratamento é desconhecida para a unidade de comunicação. |
| Sucesso do tratamento | Encontro entre um paciente curado e com o tratamento completo |

2. Tuberculose Multi-resistente (MDR-TB)

Os micróbios são extremamente adaptáveis e surpreendentemente versáteis, desenvolvendo sofisticados mecanismos para a preservação e dispersão da sua informação genética de uma forma eficiente, assegurando assim a sua sobrevivência. Assim, o desenvolvimento de uma resistência num local, pode ser facilmente disseminada para o resto do mundo. Da mesma forma, o uso de antibióticos em animais é uma fonte potencial de resistência a estes no homem, por exemplo, microorganismos resistentes podem desenvolver-se como resultado do uso de antibióticos na criação de animais, podendo atingir o homem através do contato direto com os animais ou através dos alimentos (Greenwood, 1998).

A TB resistente aos antibióticos é uma grande ameaça à saúde pública e ameaça o progresso feito nos cuidados e controlo desta patologia em todo o mundo. A resistência à antibioterapia surge devido ao uso indevido de antibióticos na quimioterapia de pacientes com TB suscetível ao tratamento. Este uso indevido advém de um certo número de ações, incluindo a administração de regimes de tratamento impróprios e falhas na garantia que os pacientes completam todo o regime de tratamento. Essencialmente, a resistência à medicação surge em áreas com fracos programas de controlo da TB. Um paciente que desenvolve a doença ativa com resistência aos medicamentos pode transmitir esta forma de TB a outros indivíduos (WHO, 2013).

As micobactérias resistentes aos antibióticos utilizados no tratamento da TB suscetível, são comuns e ocorrem em todo mundo. A MDR-TB é causada por micobactérias resistentes aos 2 antibióticos de 1ª linha, mais eficazes: isoniazida e rifampicina, e esta

resistência deriva da extensão e/ou uso inapropriado dos antibióticos durante o tratamento da TB no paciente suscetível (WHO, 2013).

Quanto mais ativo é o antibiótico para a TB, mais facilmente ocorre o aparecimento de resistências, através da seleção dos bacilos resistentes devido ao uso impróprio do mesmo (Zhang e Yew, 2009). A resistência aos fármacos pela Mtb existe desde o início da era dos antibióticos (Council, 1948). A resistência a um antibiótico para a TB ocorre devido a 4 principais motivos: a parede celular funciona como uma barreira impermeável face às moléculas ativas dos fármacos; enzimas codificadas pela Mtb que modificam ou inativam as moléculas ativas dos fármacos; sistema de efluxo das moléculas ativas dos fármacos; e, como resultado de mutações que acompanham a replicação das micobactérias (Chang e Yew, 2013). A MDR-TB emergiu quando a isoniazida e a rifampicina foram usadas, em 1970 (Chang e Yew, 2013).

A gestão da MDR-TB requer uma supervisão intensiva de pacientes, recorrendo a testes bacteriológicos. Isto é importante para avaliar a resposta ao tratamento; para determinar se é necessário o isolamento do paciente, ou a alteração do regime terapêutico, ou até mesmo a terapia adjuvante; e para classificar os resultados do tratamento do paciente (Chunling *et al.*, 2013). Com o objetivo de otimizar a capacidade de detetar a falta de resposta ao tratamento, foram feitas alterações pela OMS às orientações para a gestão programática da TB resistente, onde se aumentou a frequência do supervisionamento, através do exame em meio de cultura da expectoração, de trimestral para mensal, até a obtenção de um resultado negativo. Esta recomendação foi o resultado de uma análise sistemática, que observou um aumento dos atrasos na deteção de falhas do tratamento devido ao uso de triagens bi-mensais ou tri-mestrais, com recurso ao exame da expectoração em meio de cultura (WHO, 2011).

Esta forma de TB, não respondendo aos fármacos padrão, possui um tratamento que decorre num período de dois ou mais anos com fármacos que são menos potentes, mais tóxicos e muito mais caros (Tabela 4) (WHO, 2013).

Tabela 4 – Classificação e dosagens utilizadas nos fármacos para o tratamento MDR-TB (adaptado de Chang e Yew, 2013).

| Descrição | Componentes | Dosagem diária (mg/kg) | Dosagem diária usual (mg) |
|---|--|--|--|
| Medicamentos por via oral de primeira linha | Isoniazida Rifampicina Pirazinamida Etambutol | 16-18 Não aplicável 15-20 20-30 | 800-1200 Não aplicável 800-1200 1000-2000 |
| Fluoroquinolonas | Levofloxacina Moxifloxacina Gatifloxacina Ofloxacina | - - - - | 750-1000 400-800 400-800 600-800 |
| Agentes injetáveis | Capreomicina Canamicina Amicacina Estreptomicina | 12-15 12-15 12-15 12-15 | 750-1000 750-1000 750-1000 750-1000 |
| Bacteriostáticas orais (agentes de segunda linha) | Etionamida Protionamida Ácido para-aminossalicílico Cicloserina Terizidona | 15 15 200 15 15 | 500-750 500-750 8000-12000 500-750 600 |
| Agentes com eficácia que não é totalmente claro (não recomendado para uso de rotina) | Linezolida Amoxicilina e Ácido clavulâmico Clofazimina Tiacetazona Rifabutina Claritromicina Tioridazina | - - 2.5 - - - - | 600 875-125 100 150 300 500 2000-125 25,aumento semanalmente até atingir os 200 |

As fluoroquinolonas são utilizadas no tratamento da TB devido à sua capacidade de inibir a ADN girase bacteriana e de penetrar através das porinas presentes na membrana (Ziganshina e Squire, 2009). A estreptomicina, um dos agente injetáveis utilizados, inibe a síntese proteica e provoca a morte das células microbianas (Kincade *et al.*, 1948). A etionamida, um dos bacteriostáticos orais, inibe a síntese dos ácidos micólicos, comprometendo assim a membrana celular da micobactéria (Arbex *et al.*, 2010).

Segundo a OMS, a proporção de casos de TB com resistência à medicação corresponde a cerca de 3,7% dos novos pacientes com TB no mundo. A proporção é muito mais elevada naqueles indivíduos tratados anteriormente - cerca de 20%. A frequência de MDR-TB varia substancialmente entre os países (WHO, 2013). Quando comparado com o tratamento da TB não resistente, a MDR-TB é mais difícil de tratar, tendo uma taxa de sucesso de apenas 60-80% (Orenstein *et al.*, 2009). A taxa de mortalidade da MDR-TB em zonas com uma grande prevalência da infeção pelo VIH é alarmante, alcançando os 71% (Gandhi *et al.*, 2010).

Em Portugal o número de casos de MDR-TB é diminuto tendo sido diagnosticados em Dezembro de 2012, apenas 14 casos, maioritariamente nas áreas metropolitanas de Lisboa e Porto (Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose, 2013).

3. Tuberculose pluri-resistente (XDR-TB)

O diagnóstico da MDR-TB dá ao médico mais uma oportunidade de curar o paciente, portanto, é imperativo que o melhor e mais compreensivo regime de tratamento seja usado, com o objetivo de tratar com sucesso o paciente. Caso o paciente não seja tratado eficazmente, haverá uma amplificação da resistência à medicação, levando então ao desenvolvimento de XDR-TB (Migliori *et al.*, 2010). O aumento do uso de fluoroquinolonas no tratamento da TB na década de 1990 promoveu o desenvolvimento da XDR-TB (Chang e Yew, 2013).

A XDR-TB é uma forma de TB causada por organismos que são resistentes à isoniazida e rifampicina (tal como a MDR-TB), assim como a qualquer fluoroquinolona e a qualquer um dos injetáveis de segunda linha para a TB (amicacina, canamicina ou capreomicina) (WHO, 2013).

Apesar dos pacientes com MDR/XDR-TB manifestarem a doença de uma forma mais agressiva, não há nenhuma evidência de que estes doentes, co-infectados pelo VIH ou não, são mais propensos a transmitir a infeção do que os pacientes com TB suscetível, nem que as estirpes resistentes são mais infecciosas do que as suscetíveis. Em doentes seronegativos para o VIH, a MDR/XDR-TB leva, frequentemente, a uma considerável

perda de peso, a insuficiência respiratória, e a formação de lesões pulmonares. Por outro lado, em pacientes seropositivos para o VIH, a MDR/XDR-TB desenvolve-se mais agressivamente, levando a altas taxas de mortalidade (Ducati *et al.*, 2006).

O tratamento da XDR-TB, quando comparado com o tratamento da TB suscetível, é mais difícil de tratar e moroso, tendo uma taxa de sucesso de apenas 44-60% (Migliori *et al.*, 2007; Kin *et al.*, 2007). A taxa de mortalidade da XDR-TB em zonas com grande prevalência de infeção pelo VIH atinge os 83% (Gandhi *et al.*, 2010).

A presença global da XDR-TB é um assunto de grande preocupação. Estas infeções são geralmente impossíveis de diagnosticar ou tratar em países com recursos limitados, e, portanto, as infeções são muito importantes para a saúde pública (Loddenkemper e Hauer, 2010).

Em março de 2013, 84 países relataram pelo menos um caso de XDR-TB (WHO, 2013).

E Portugal, em Dezembro de 2012, apenas 3 casos de XDR-TB foram sinalizados (Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose, 2013)

VI. Conclusão

Na última década presenciou-se um notável aumento do conhecimento sobre a Mtb, não só no próprio bacilo mas também na interação com o hospedeiro. Aprendemos que a Mtb desenvolveu mecanismos complexos para sobreviver no ambiente intracelular, que neutralizam ou evitam os inúmeros mecanismos de defesa dos macrófagos, e que a interação entre o agente patogénico e o sistema imunológico do hospedeiro ocorre, em grande parte, nos granulomas formados, que servem de *habitat* e de meio de contenção para Mtb.

Tendo em conta toda a pesquisa feita em torno do tema, são evidentes os progressos no que toca ao tratamento e controlo desta micobactéria.

Contudo, para anular a ameaça que esta patologia representa, é necessário que se desenvolvam novos métodos de diagnóstico, vacinas e medicamentos, juntamente com um uso mais amplo da tecnologia existente. Por exemplo, estudos de modelação demonstram que a eliminação da TB até 2050 exige uma combinação de um método mais sensível de diagnóstico da TB que permita a distinção entre suscetível ou resistente aos medicamentos, melhores e mais curtos tratamentos para todas as formas de TB, o desenvolvimento de um tratamento para a infeção latente de TB em grande escala (especialmente em populações de alto risco) e de um esquema de vacinação em massa com uma vacina mais eficaz do que BCG (Ottenhoff e Kaufmann, 2009).

VII. Bibliografia

Aagaard, C., Hoang, T., Dietrich, J., Cardona, P., Izzo, A., Dolganov, G., Schoolnik, G. Cassidy, J., Billeskov, R. e Andersen, P. (2011). A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nature Medicine*, 17, pp. 189-194.

Aderem, A. e Underhill, D. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17, pp. 593-623.

Arbex, M. Varella, M., Siqueira, H. e Mello, F. (2010). Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 2: Fármacos de segunda linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36, pp. 641-656.

Arosa, F., Cardoso, E. e Pacheco, F. 2013. *Fundamentos de Imunologia*. 2ª edição. Portugal, Lidel.

Balows, A, Hausler, W., Herrmann, K., Isenberg, Henry e Shadomy, H. (1991). *Manual of clinical microbiology*. 5ª edição. Washington, D.C., American Society of Microbiology, p. 323.

Bauquerez, R., Black, L., Bierrenbach, A., Brands, A., Ciceri, K., Falzon, D., Floyd, K., Glaziou, P., Gunneberg, C., Hiatt, T., Hosseini, M., Pantoja, A., Uplekar, M., Watt, C. e Wright, A. (2009). Global tuberculosis control: epidemiology, strategy and financing. *World Health Organization report*. [Em linha]. Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html>. [Consultado em 18/07/2013].

Botelho, J. e Grinstein, S. (2011). Phagocytosis. *Current Biology*, 21, pp. 533-538.

Brennan, M. (2005). The tuberculosis vaccine challenge. *Tuberculosis*, 85, pp. 7-12.

Brennan, M. Fruth, U., Milstien, J., Tiernan, R., Andrade, N. e Chocarro, L. (2007). Development of new tuberculosis vaccines: a global perspective on regulatory issues. *Plos medicine*, 4, p. 1299.

Brennan, P. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83, pp. 91-92.

Cavalcante, S., Chakaya, J., Egwaga, S., Gie, R., Gondrie, P., Harries, A., Hopewell, P., Blessina, K., Weezenbeck, K., Mase, S., Menzies, R., Mukwaya, A., Nasehi, M., Nunn, A., Pai, M., Shunemann, H., Udawadia, Z., Vernon, A., Vianzon, R. e Williams, V. (2010). *Treatment of Tuberculosis guidelines*. 4ª edição. Suíça, World Health Organization, p. 30.

Center for Disease Control and Prevention. (2011). [Em linha]. Disponível em <www.cdc.gov/tb>. [Consultado em 24/09/2013].

Chang, K. e Yew, W. (2013). Management of difficult multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Update 2012. *Respirology*, 18, pp. 8-13.

Chen, P., Shi, M., Feng, G., Liu, J., Wang, B., Shi, X., Ma, L., Liu, X., Yang, Y., Dai, W., Liu, T., He, Y., Li, J., Hao, X. e Zhao, G. (2012). A highly efficient ziehl-neelsen stain: identifying *de novo* intracellular *Mycobacterium tuberculosis* and improving detection of extracellular *m. tuberculosis* in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, pp. 1166-1167.

Colditz, G., Berkey, C., Mosteller, F., Brewer, T., Wilson, M., Burdick, E. e Fineberg, H. (1995). The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics*, 96, pp. 29-35.

Coll, P. (2003). Drugs with activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21, pp. 299-308.

Council, M. (1948). Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis. *British Medical Journal*, 2, pp. 769-782.

Crick, D., Mahapatra, S. e Brennan, P. (2001). Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology*, 11, p. 108.

Dessein, R., Corbière, V., Nortier, J., Dratwa, M., Gastaldello, K., Pozdik, A., Lecher, S., Grandbastien, B., Loch, C. e Mascart, F. (2013). Heparin-binding haemagglutinin, a new tool for the detection of latent mycobacterium tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Plos one*, 8, pp. 1-2.

Doetsch, R. (1978). Benjamin Marten and his “new theory of consumptions”. *Microbiological Reviews*, 42, pp. 521-528.

Druszczynska, M., Kulbat, M., Fol, M., Wlodarczyk, M. e Rudnicka, W. (2012). Latent *M. tuberculosis* infection – pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies. *Polish Journal of Microbiology*, 61, p. 5.

Duarte, R. e Diniz, A. (2013). Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose Ponto da Situação Epidemiológica e de Desempenho (dados provisórios). *Ministério da Saúde*, pp. 1-16.

Ducati, R., Netto, A., Basso, L. e Santos, D. (2006) The resumption of consumption – a review on tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, p. 709.

Fischer, N., Mak, T., Shinohara, D., Sfanos, K., Meyer, T. e Brüggemann, H. (2013). Deciphering the intracellular fate of propionibacterium acnes in macrophages. *BioMed Research International*, 2013, p. 2.

Forreland, M., Klepp, L., Gioffré, A., García, J., Morbidoni, H., Santangelo, M., Cataldi, A. e Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4, pp. 2-49.

Gandhi, N., Shah, N., Andrews, J., Vella, V., Moll, A., Weissman, D., Marra, C., Lallo, U. e Friedland, G. (2010). HIV coinfection in multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis results in high early mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181, pp. 80-86.

Gengenbacher, M. e Kaufmann, S. (2012). *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, pp. 1-6.

Goldsby, R., Kindt, T. e Osborn, B. (2001). *Immunology*. 4ª edição, New York. W. H. Freeman and Company, pp. 436-437.

Gordon, S., Bottai, D., Simeone, R., Stinear, T. e Brosch, R. (2009). Pathogenicity in the tubercle bacillus: molecular and evolutionary determinants. *Wiley Periodicals*, 31, pp. 378-379.

Greenwood, D. (1998). Resistance to antimicrobial agents: a personal view. *Journal of Medical Microbiology*, 47, p. 751.

Grode, L., Kursar, M., Fensterle, J., Kaufmann, S. e Hess, J. (2002). Cell-mediated immunity induced by recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy. *Journal of Immunology*, 168, pp. 1869-1876.

Grode, L., Seiler, P., Baumann, S., Hess, J., Brinkmann, V., Nasser, E., Mann, P., Goosmann, C., Bandermann, S., Smith, D., Bancroft, G., Reyrat, J., Soolingen, D., Raupach, B. e Kaufmann, S. (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of

recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *Journal of Clinical Investigation*, 115, pp. 2472-2479.

Groisman, E., Ochman, H. (1997). How to become a pathogen. *Trends in Microbiology* 1997, 2, pp. 289-93.

Hardman, J., Limbird, L. (2003). *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 10ª edição. Rio de Janeiro, McGraw Hill, p. 960.

Harries, A., Lawn, S., Getahun, H., Zachariah, R. e Havlir, D. (2012). HIV and tuberculosis - science and implementation to turn the tide and reduce deaths. *Journal of the International AIDS Society*, 15, p. 1.

Hess, J., Miko, D., Catic, A., Lehmsiek, V., Russel, D. e Kaufmann, S. (1998). *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, pp. 5299-5304.

Hinchey, J., Lee, S., Jeon, B., Basaraba, R., Venkataswamy, M., Chen, B., Chan, J., Braunstein, M., Orme, I., Derrick, S., Morris, S., Jacobs, W. e Porcelli, S. (2007). Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Investigation*, 117, pp. 2279-2288.

Hoft, D., Blazevic, A., Abate, G., Hanekom, W., Kaplan, G., Soler, J., Weichold, F., Geiter, L., Sadoff, J. e Horwitz, M. (2008). A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *Journal of Infectious Diseases*, 198, pp. 1491-1501.

Horsburgh, C. (2004). Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 350, pp. 2060-2067.

Horwitz, M. e Harth, G. (2003). A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity*, 71, pp. 1671-1679.

Huynh, K., Joshi, S. e Brown, E. (2011). A delicate dance: host response to mycobacteria. *Current Opinion in Immunology*, 23, pp. 464-472.

Janeway, C., Travers, P., Walport, M. e Shlomchik, M. (2002). *Imunobiologia*. 5ª edição. São Paulo, Artmed editora, p. 46.

Kaufmann, S. (2002). Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61, pp. 54-57.

Kaufmann, S. (2010). Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. *Immunity*, 33, pp. 567-577.

Kaufmann, S. e Gengenbacher, M. (2012). Recombinant live vaccine candidates against tuberculosis. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, pp. 900-907.

Kim, H., Hwang, S., Lee, S., Yoo, C., Kin, Y., Han, S., Shim, Y. e Yim, J. (2007). Impact of extensive drug resistance on treatment outcomes in non-HIV-infected patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 45, pp. 1290-1295.

Kindace, G., Saxton, G., Morse, P. e Mathisen, A. (1948). Streptomycin in the treatment of tuberculosis. *Canad. M. A. J.*, 59, pp. 105-112.

Klein, J. (1982). *Imunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*. Tübingen, John Wiley & Sons, p. 434.

Koch, R. (1882). Die aetiologie der tuberculose. *Wochenschr*, 19, pp. 221-230.

Lawn, S. e Zumla, A. (2011). Tuberculosis. *Lancet*, 378, pp. 57-71.

Lim, J., Thompson, J., May, R., Hotchin, N. e Caron, E. (2013). Regulator of G-protein signalling-14 (rgs14) regulates the activation of $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ integrin during phagocytosis. *Plos one*, 8, p. 1.

Lima, V., Bonato, V., Lima, K., Santos, S., Santos, R., Gonçalves, E., Brandão, L. Rodrigues, J. E Silva, C. (2001). Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and no in tuberculosis. *Infection and Immunity*, 69, p. 5305.

List, T. e Neri, D. (2013). Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 5, pp. 29-30.

Loddenkemper, R. e Hauer, B. (2010). Drug-resistant tuberculosis. *Deutsches Ärzteblatt International*, 107, p. 17.

Martin, C., Williams, A., Pando, R., Cardona, P., Gormley, E., Bordat, Y., Soto, C., Clark, S., Hatch, G., Aguilar, D., Ausina, V. e Gicquel, B. (2006). The live *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine*, 24, pp. 3408-3419.

McMurray, D. (1996). *Medical Microbiology*. 4ª edição. Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston.

Migliori, G., Besozzi, G., Girardi, E., Kliiman, K., Lange, C., Toungousova, O., Ferrare, G., Cirillo, D., Gori, A., Matteelli, A., Spanevello, A., Codecasa, L. e Raviglione, M. (2007). Clinical and operational value of the extensively drug-resistant tuberculosis definition. *European Respiratory Journal*, 30, pp. 623-626.

Migliori, G., Dheda, K., Centis, R., Mwaba, P., Bates, M., O'Grady, J., Hoelscher, M. E Zumbra, A. (2010). Review of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB: global perspectives with a focus on sub-Saharan Africa. *Tropical Medicine and International Health*, 15, pp. 1052-1062.

Mims, C., Drockrell, H., Goering, R., Roitt, I., Wakelin, D. e Zuckerman, M. (2004). *Microbiologia Médica*. 3ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, p. 251.

Ministério da Saúde. (2012). [Em linha]. Disponível em <<http://www.portaldasauade.pt/>>. [Consultado em 24/09/2013].

Morandi, M., Sali, M. e Delogu, G. (2013). Exploiting the mycobacterial cell wall to design improved vaccines against tuberculosis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 7, pp. 169-170.

Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M. e Phaller, M. (2008). *Manual of clinical microbiology*. 9ª edição. Washington, D.C., American Society of Microbiology, pp. 543-546.

Orenstein, E., Basu, S., Shah, N., Andrews, J., Friedland, G., Moll, A., Gandhi, N. e Galvani, A. (2009). Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 9, pp. 153-161.

Ottenhoff, T. e Kaufmann, S. (2012). Vaccines against tuberculosis: “where are we and where do we need to go?”. *Plos pathogens*, 8, pp. 1-12.

Pinto, L. (2010). Síntese, atividade antibacteriana e farmacocinética pré-clínica de pró-fármaco do etambutol com potencial terapêutico para meningite tuberculosa. *Universidade estadual paulista*, pp. 25-36.

Ramesh, G., MacLean, A. e Philipp, M. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators of Inflammation*, 2013, p. 1.

Rose, N., Hamilton, R. e Detrick, B. (2002). *Manuel of Clinical Laboratory Immunology*. 6ª edição. Washington, DC., American society of Microbiology, p. 54.

Sambandamurthy, V., Jacobs, W. (2005). Live attenuated mutants of *Mycobacterium tuberculosis* as candidate vaccines against tuberculosis. *Microbes and infection*, 7, pp. 955-961.

Sali, M., Clarizio, S., Pusceddu, C., Zumbo, A., Pecorini, G., Rocca, S., Zanetti, S., Delogu, G. e Fadda, G. (2008). Evaluation of the anti-tuberculosis activity generated by different multigene DNA vaccine constructs. *Microbes and infection*, 10, pp. 605-612.

Samper, S. e Martin, C. (2007). Spread of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases*, 13, pp. 647-648.

Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Ruan, H., Barry, C., Wang, H., Zhang, W., Zhang, Y. 2011. Pyrazinamide inhibits *trans*-translation in *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for shortening the duration of tuberculosis chemotherapy. *Science*, 333, pp. 1-4.

Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology*, 16, pp. 463-496.

Sun, R., Skeiky, Y., Izzo, A., Dheenadhayalan, V., Imam, Z., Pemm, E., Stagliano, K., Haddock, S., Mueller, S., Fulkerson, J., Scanga, G., Grover, A., Derrick, S., Morris, S., Hone, D., Horwitz, M., Kaufmann, S. e Sadoff, J. (2009). Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*, 27, pp. 4412-4423.

Weinridh, A., Pinxteren, L., Meng, O., Birk, R. e Andersen, P. (2001). Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infection and immunity*, 69, pp. 2773-2778.

World Health Organization. (2011). *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*. 3ª edição. Switzerland, World Health Organization, pp. 29-30.

World Health Organization. (2012). *Global tuberculosis Report 2012*. Switzerland, World Health Organization, p. 8.

World Health Organization. (2013). Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). *World Health Organization*, pp. 1-2.

World Health Organization. (2013). [Em linha]. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>>. [Consultado em 02/09/2013].

World Health Organization. (2013). *Definitions and reporting framework for tuberculosis - 2013 revision*. Switzerland, World Health Organization, pp. 3-6.

Yamashita, Y., Hoshino, Y., Oka, M., Matsumoto, S., Ariga, H., Nagai, H., Makino, M., Ariyoshi, K. e Tsunetsugu-Yokota, Y. (2013). Multicolor flow cytometric analyses of cd4+ t cell responses to *mycobacterium tuberculosis*-related latent antigens. *Japanese journal of infectious diseases*, 66, p. 207.

Young, D., Perkins, M., Duncan, K. e Barry, C. (2009). Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*, 118, p. 1255-1265.

Zhang, Y. e Yew, W. (2009). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13, pp. 1320-1330.

Ziganshina, E. e Squire, S. (2009). Fluoroquinolones for treating tuberculosis. *The Cochrane Collaboration*, 10, pp 3-10.