

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgA AOS ANTÍGENOS PPE59 E
MT10.3:MPT64 DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM
POPULAÇÃO INDÍGENA DE DOURADOS, MATO GROSSO DO
SUL**

ANA CAROLINE AZEVEDO MACAIBA

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ANA CAROLINE AZEVEDO MACAIBA

Reatividade de anticorpos IgA aos Antígenos PPE59 E MT10.3:MPT64 de *Mycobacterium tuberculosis* em população indígena de Dourados, Mato Grosso do Sul

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientadora: Prof. Dr. Maria Helena Féres Saad

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2020

Macaiba, Ana Caroline Azevedo.

Reatividade de anticorpos IgA aos antígenos PPE59 e MT10.3:MPT64 de *Mycobacterium tuberculosis* em população indígena de Dourados, Mato Grosso do Sul / Ana Caroline Azevedo Macaiba. - Rio de Janeiro, 2020. XVII, 75f f.; il.

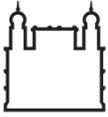
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2020.

Orientadora: Maria Helena Féres Saad.

Bibliografia: f. 64-75

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Imunodiagnóstico. 3. PPE59. 4. MPT64. 5. MT10.3. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: ANA CAROLINE AZEVEDO MACAIBA

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgA AOS ANTÍGENOS PPE59 E
MT10.3:MPT64 DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM POPULAÇÃO
INDÍGENA DE DOURADOS, MATO GROSSO DO SUL**

ORIENTADORA: Prof. Dr. Maria Helena Féres Saad

Aprovada em: 11/ 02/ 2020

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Alda Maria da Cruz (IOC/ FIOCRUZ) -**Revisor e Suplente.**

Profa. Dra. Anna Cristina Calçada Carvalho (IOC/FIOCRUZ) -**Presidente**

Profa. Dra. Claudete Aparecida Araújo Cardoso (Universidade Federal Fluminense)

Dra. Isabela Gama Sardella (IOC/FIOCRUZ)

Dr. Júlio Henrique Croda (UFGD/MS) - **Suplente**

Rio de Janeiro, 11 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho ao meu pai **João Francisco Macaiba Filho** (*in memoriam*) que nos deixou esse ano e não terá oportunidade de acompanhar mais essa etapa na minha vida. Mas graças a ele, que sempre me incentivou a estudar e buscar meus objetivos, eu pude me dedicar exclusivamente para realizar a pós-graduação.

Dedico este trabalho a todos os alunos de pós-graduação que mesmo com as dificuldades e a falta de reconhecimento de se trabalhar com pesquisa no Brasil se mantêm firmes em busca do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família e ao meu noivo por todo o incentivo, paciência, amor, em especial aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando para nunca desistir e sempre com muito orgulho da minha trajetória.

À Dr^a Maria Helena Féres Saad, do Laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ, minha orientadora, pela confiança, dedicação, compreensão e o apoio nas horas difíceis e pela orientação fundamental para a realização deste trabalho.

Aos amigos pesquisadores e funcionários do Pavilhão Hanseníase especialmente do laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ e aqueles que passaram por lá, Mônica Antônia Saad, Marisa Signorelli, Nidai Moreira Lins, Leonardo Araújo, Pedro Henrique, Renan Jeremias, Adolfo Barreto, Silvia Maria, Isabela Gama Sardella e Ana Carla de Paulo Mulinari, que me ensinaram com seus conhecimentos teóricos e práticos e incentivaram a minha caminhada acadêmica.

Aos amigos que me acompanham desde o curso de graduação em Biologia e compartilharam as incertezas do futuro com muita esperança e alegria.

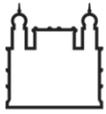
À Fundação Oswaldo Cruz, que concedeu a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pelo auxílio financeiro, que nesses dois anos contribuiu, com dificuldades, para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Agradeço a todos que direta e indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Obrigada!



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

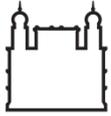
Reatividade de anticorpos IgA aos antígenos PPE59 e MT10.3:MPT64 de *Mycobacterium tuberculosis*, em população indígena de Dourados, Mato Grosso do Sul.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Ana Caroline Azevedo Macaiba

Testes diagnósticos práticos, rápidos, de fácil operacionalidade e com potencial para formato *point of care* (POC) são necessários para a melhor eficácia do controle da TB, principalmente em populações negligenciadas ou de difícil manejo diagnóstico como a indígena. A organização mundial da saúde (OMS) divulgou perfis de produtos-alvo de alta prioridade (TPPs) para auxiliar no diagnóstico de TB: TPP1- teste não baseado em escarro, capaz de detectar TB através da identificação de biomarcadores com alta especificidade ($Sp \geq 98\%$) e sensibilidade ($S > 65\%$); TPP2- teste de triagem para identificar pacientes de risco, que apresentem sintomas de TB, ou descartar a doença ou indicar para testes confirmatórios ($Sp \geq 70\%$ e $S \geq 90$). Os testes sorológicos são atrativos pelo potencial em preencher estas características, mas devido a heterogeneidade da resposta imune entre os pacientes é necessário explorar novos biomarcadores para adequar sua sensibilidade e/ou especificidade aos perfis TPP. Assim, este estudo propõe avaliar biomarcadores micobacterianos como produtos alvos auxiliares no diagnóstico da TB. As proteínas recombinantes PPE59 e a quimera F1 (MT10.3:MPT64) foram purificadas, padronizadas e ensaiadas para a detecção de IgA em soro por meio da técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA). Soros de 113 indivíduos de origem indígena, dos quais 37 (33%) tinham TB pulmonar confirmada e 76 (67%) eram indivíduos saudáveis, foram testados. Os resultados das sorologias foram analisados isoladamente e em combinação entre si e com os resultados da microscopia em escarro (SM). A maioria dos indivíduos (62%) são do sexo masculino e 22 (59,5%) dos pacientes TB resultaram SM⁺. A sensibilidade no ELISA IgA F1 (81%) foi superior ao do PPE59 (37,8%, $p = 0.0003$) e da SM (59%, $p=0,04$), ambos ELISAs obtiveram especificidades moderadas (76,3% x 89,5%, respectivamente). A combinação dos resultados dos ELISA IgA F1 e PPE 59 não adicionou acurácia ao teste ($S = 81\%$, $Sp = 72,3\%$), mas com a adição dos resultados da SM houve um pequeno aumento na sensibilidade do ELISA IgA F1 (83,8 %) e moderado para PPE59 (70,2%). O ELISA IgA F1 identificou todos, exceto um (21/22, 95,4 %) dos casos SM⁺, e 60% (9/15) dos casos SM⁻, enquanto PPE59 45% (10/22) e 20% (4/15), respectivamente. Portanto, o ELISA IgA F1, embora não perfeitamente, tem potencial para ser validada como um WHO-TPP adicional na identificação de pacientes suspeitos de TB em população indígena.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IgA antibody reactivity to *Mycobacterium tuberculosis* antigens PPE59 and MT10.3:MPT64 in the Dourados indigenous population, Mato Grosso do Sul.

ABSTRACT

MASTER'S DEGREE DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Ana Caroline Azevedo Macaiba

Practical, fast and easy-to-operate diagnostic tests with potential for point-of-care (POC) format are required for optimal TB control effectiveness, especially in neglected or difficult-to-diagnose populations such as the indigenous. World Health Organization (WHO) has released high priority target product profiles (TPPs) to assist in the diagnosis of TB: TPP1 - non-sputum-based test capable of detecting TB by identifying biomarkers with high specificity ($Sp \geq 98\%$) and sensitivity ($S > 65\%$); TPP2 - screening test to identify at-risk patients who have symptoms of TB, or rule out the disease or indicate for confirmatory testing ($Sp \geq 70\%$ and $S \geq 90\%$). Serological tests are attractive because of the potential to fulfill these characteristics, but due to the heterogeneity of the immune response among patients, it is necessary to explore new biomarkers to adapt their sensitivity and/or specificity to TPP profiles. Thus, this study proposes to evaluate mycobacterial biomarkers as auxiliary target products in the diagnosis of TB. The recombinant proteins PPE59 and chimera F1 (MT10.3: MPT64) were purified, standardized and analyzed for ELISA IgA detection. Serums from 113 individuals of indigenous origin, of which 37 (33%) had confirmed pulmonary TB and 76 (67%) are healthy individuals, were included. Serology results were analyzed separately, in combination and with sputum microscopy (SM) results. Most individuals (62%) are male and 22/37 (59.5%) of TB patients resulted in SM⁺. The sensitivity for ELISA IgA F1 (81%) was higher than PPE59 (37.8%, $p = 0.0003$) and SM ($p = 0.04$), both ELISAs obtained moderate specificities (76.3% x 89.5%, respectively). The combined ELISA IgA F1 and PPE 59 results did not add accuracy to the test ($S=81\%$, $Sp= 72.3\%$, respectively), but combined with the SM result there was a slight increase in ELISA IgA F1 sensitivity (83.8%) and moderate for PPE59 (70.2%). The ELISA IgA F1 identified all SM⁺ cases (21/22, 95.4%) except one, and 60% (9/15) SM⁻ cases, while PPE 59 45% (10/22) e 20% (4/15), respectively. Therefore, the ELISA IgA F1, although imperfectly, has potential to be validated as an additional WHO-TPP in identification of suspected TB patients in an indigenous population.

ÍNDICE

RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO	1
1.1. Revisão bibliográfica.....	3
1.1.1. Características Gerais do Gênero <i>Mycobacterium</i> e Aspectos Históricos da Tuberculose	3
1.1.2. Epidemiologia	8
1.1.2.1. Mundo.....	8
1.1.2.2. Américas	9
1.1.2.3. Indígenas	10
1.1.3. Patogenia da infecção pelo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	12
1.1.4. Aspectos imunológicos da população indígena das Américas	16
1.1.5. Medidas de controle da tuberculose nas populações indígenas.....	17
1.1.6. Diagnóstico da tuberculose.....	19
1.1.7. Proteínas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizadas neste estudo.....	23
1.2. Justificativa.....	25
2. HIPÓTESE DO ESTUDO	26
3. OBJETIVO.....	27
3.1.OBJETIVO GERAL	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. METODOLOGIA.....	28
4.1. Tipo de Estudo.....	28
4.1.1. Critérios de inclusão.....	28
4.1.2. Critérios de exclusão	28
4.2. Considerações éticas.....	28
4.3.Local do Estudo.....	28
4.4. Amostragem.....	29

4.5.Purificação das proteínas PPE59 e F1	30
4.5.1. Cultivo do clone de <i>Escherichia coli</i> (Dh5 α) contendo a proteína recombinante PPE59 e sua purificação	31
4.5.2. Lise bacteriana em condições desnaturantes	31
4.5.3. Purificação da PPE 59 através da cromatografia de afinidade com resina de níquel	31
4.5.3.1. SDS-PAGE (gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio).....	32
4.5.4. Diálise da PPE 59 purificada	33
4.5.5. Cultivo do clone de <i>Escherichia coli</i> BL21-DE3 contendo a proteína recombinante F1 para a purificação (Araújo <i>et al</i> 2010)	33
4.5.6. Lise bacteriana de <i>Escherichia coli</i> BL21-DE3.....	33
4.5.7. Purificação da F1	34
4.5.8. Diálise da F1 purificada.....	34
4.5.9. Quantificação das proteínas PPE59 e F1	34\
4.6. Padronização do ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) <i>in house</i>	37
4.7.Análises Estatísticas	38
5. RESULTADOS	39
5.1. Purificação das proteínas PPE 59 e F1	39
5.2. Características da população do estudo.....	40
5.3. Padronização do ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) <i>in house</i>	42
5.4. Resultados quantitativos do ELISA IgA anti as proteínas PPE59 e F1 com os soros individualizados	44
5.5.Resultados qualitativos dos ELISA IgA anti PPE59 e anti F1	49
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES.....	62
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63
9. REFERÊNCIAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Diagrama da atual classificação de micobactérias distribuídas em cinco principais clados..... 5.
- Figura 2:** Mapa da incidência da tuberculose no mundo (casos/100 mil habitantes) em 2018 9.
- Figura 3:** Etapas em que as células B e os anticorpos participam da proteção contra a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*..... 15.
- Figura 4:** Organização da rede de serviços de saúde nos Distritos Sanitários Especiais Indígenas 18.
- Figura 5:** Imagem de satélite com o perímetro parcial da Reserva onde se localiza a aldeia indígena de Bororo e Jaguapiru, Dourados, MS, Brasil.....29.
- Figura 6:** Fluxograma dos soros de indígenas enviados ao Laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL)/IOC/FIOCRUZ agrupados em tuberculose ativa (TB) e contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC) testados..... 30.
- Figura 7:** Fluxograma dos processos de expressão e purificação das proteínas PPE59 e F1..... 36.
- Figura 8:** Identificação da proteína PPE59 purificada através do gel SDS-PAGE (gel de poli-acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) 39.
- Figura 9:** Identificação da proteína F1 (MT10.3:MPT64) purificada através do gel SDS-PAGE (gel de poli-acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) 40.
- Figura 10:** Parametrização do ELISA IgA PPE 59 (0.5 µg/ml) em pools de soros de pacientes indígenas com tuberculose (TB) e HCC (contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB)..... 42.

Figura 11: Parametrização do ELISA IgA F1 (0.5 µg/ml) em pools de soros de pacientes indígenas com tuberculose (TB) e HCC (contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB)..... 43.

Figura 12: Distribuição individual dos soros em teste imunoenzimático (ELISA), da reatividade da imunoglobulina IgA às proteínas F1 ou PPE59 em participantes com tuberculose pulmonar (TB) e contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC) 45.

Figura 13: Distribuição individual da reatividade dos soros para a imunoglobulina IgA às proteínas F1 ou PPE59, em teste imunoenzimático (ELISA) no soro de pacientes com tuberculose pulmonar com microscopia de escarro positiva (SM⁺) ou negativa (SM⁻)....47.

Figura 14: Curva Característica de Operação do Receptor (ROC) do teste sorológico para tuberculose em pacientes indígenas. ELISA-IgA F1 (A) e PPE59 (B)..... 49.

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1:** Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos 113 indivíduos incluídos no estudo, cujos soros de conveniência foram testados 41.
- Tabela 2:** Condições definidas na padronização do teste de ELISA para imunoglobulina A para os antígenos (Ag) PPE59 e F1 43.
- Tabela 3:** Resultados quantitativos do reconhecimento da imunoglobulina IgA reativa às proteínas PPE59 e F1 em pacientes com tuberculose (TB) e contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC)..... 44.
- Tabela 4:** Análise quantitativa de imunoglobulina IgA reativa às proteínas PPE59 e F1, expresso em média e desvio padrão, de acordo com algumas características demográficas e laboratoriais dos 113 indivíduos do estudo, no período de 2011 a 2013..... 48.
- Tabela 5:** Sensibilidade e especificidade do teste ELISA para a detecção da imunoglobulina IgA que reconhecem as proteínas PPE59 e F1 em pacientes com tuberculose pulmonar e contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC), no período de 2011 a 2013..... 51.
- Tabela 6:** Sensibilidade da microscopia de escarro (SM) e a sua combinação com os testes sorológicos baseados nos resultados do ELISA-IgA para a PPE 59 ou F1 em pacientes com tuberculose pulmonar, no período de 2011 a 2013..... 52.
- Tabela 7:** Positividade para a imunoglobulina IgA reativa às proteínas PPE59 e F1 em relação às características demográficas, étnicas e laboratoriais dos 113 indivíduos com tuberculose pulmonar e contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC), no período de 2011 a 2013..... 54.
- Tabela 8:** Razão de chances (OR) em relação às variáveis clínicas, laboratoriais e os hábitos dos indígenas do estudo para a positividade do teste de ELISA-IgA para as proteínas PPE59 e F1..... 55.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABF	Azul de bromofenol
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AIDS	“Acquired immunodeficiency syndrome” (Síndrome da imunodeficiência adquirida)
APC	Célula apresentadora de antígeno
APS	Persulfato de Amônio
BAAR	Bacilos álcool ácidos resistentes
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCR	Receptor de células B
BSA	Albumina sérica bovina
CASAI	Casa de Saúde Indígena
CI	Coefficiente de incidência
CM	Coefficiente de mortalidade
dC	Depois de Cristo
DO	Densidade óptica
DSEI	Distritos Sanitários Especiais Indígenas
DTT	Ditiotreitol
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay" (Ensaio imunoenzimático)
EMSI	Equipes Multidisciplinares de Saúde Indígena
<i>END-TB</i>	Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose
EUA	“United States of America” (Estados Unidos da América)
EVS	Equipes Volantes de Saúde
FcR	Receptor Fc

FUNAI	Fundação Nacional do Índio
Hab.	Habitantes
HCC	Contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HIV	“Human immunodeficiency vírus” ou (Vírus da imunodeficiência humana)
HLA	“Human Leukocyte Antigen” (Antígeno leucocitário humano)
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IGRA	“Interferon gamma release assays” ou ensaios de liberação de IFN- γ
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
LAM	Lipoarabinomanana
LB	Luria Bertani
LTBI	“Latent TB infection” (infecção TB latente)
M	Molar
mg	Miligrama
MHC	“Major Histocompatibility Complex” (Complexo principal de histocompatibilidade)

ml	Mililitros
mM	Mili Molar
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MR	Multirresistentes
MS	Mato Grosso do Sul
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetros
ODM	Objetivo de Desenvolvimento do Milênio
OMS	Organização mundial da saúde
OR	“Odds Ratios” (razão de chance)
PAHO	Organização Pan-Americana da Saúde
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PBMCs	“Peripheral Blood Mononuclear Cells” (Células mononucleares do sangue periférico)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação em cadeia da polimerase)
PE	Prolina-glutamato
PE-PGRS	“polymorphic GC-rich-repetitive sequence” (sequência polimórfica repetitiva rica em GC)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PNCT	Programa Nacional de Controle a Tuberculose
POC	"point of care" (no local de atendimento)

PPD	Derivado proteico purificado
PPE	Prolina-prolina-glutamato
PPE-MTR	“Major polymorphic tandem repeat” (Repetição tandem polimórfica maior)
PPL	Pessoas privadas de liberdade
PRRs	Receptor de reconhecimento padrão
RD	Região de diferença
RIF	Rifampicina
rpm	Rotações por minuto
S	Sensibilidade
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SESAI	Secretaria Especial de Saúde Indígena
SM	“Sputum microscopy” (Microscopia de escarro)
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Sp	Especificidade
SR	Sintomático respiratório
TB	Tuberculose
TCRs	Receptores de células T
TDO	Tratamento diretamente observado
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Th	T auxiliar
	Receptores Toll-like
TMB	3,3',5,5'- tetrametilbenzidina
TNF-b	Fator de necrose tumoral beta

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPP	"target product profile" (perfis de produtos-alvo de alta prioridade)
TRIS-HCL	(hidroximetil) aminometano hidrocloreto
TCT	Teste de cutâneo a tuberculina
Tween 20	Polissorbato 20
V	Volts
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
VS	Versus
WHO	"World Health Organization" (Organização Mundial da Saúde)
$\gamma\delta$	Gama-delta
μg	Microgramas
μl	Microlitro
μm	Micrometro

1. INTRODUÇÃO

Globalmente, o Brasil está entre os 30 países de alta incidência para tuberculose (TB), e coinfectados (TB-HIV) pelo vírus da imunodeficiência humana, prioritários para o controle da doença (WHO²⁵, 2019). No ano de 2011, o Brasil atingiu uma das metas do Objetivo de Desenvolvimento do Milênio (ODM), por ter reduzido pela metade os óbitos por TB, comparado com o ano de 1990. Porém, sem melhorias nas estratégias para o controle da TB o Brasil não irá atingir as metas estabelecidas no Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose (*END-TB*) em 2035, que preconiza a redução da taxa de incidência em 90% e a taxa de mortalidade em 95% (Brasil², 2019; Maciel³ *et al.*, 2018).

A epidemia de TB no Brasil é concentrada em algumas populações, como as pessoas infectadas com o HIV, as que vivem em situação de rua, aquelas privadas de liberdade (PPL), a população indígena e pessoas que vivem em aglomerados em centros urbanos, como as comunidades de deficientes condições sociais, econômicas e sanitárias (Brasil², 2019). Para o diagnóstico voltado para essas populações, testes como o sorológico, baseado em imunoenaios, possuem melhor aplicabilidade pois conseguem ser facilmente adaptados para utilização em campo.

Em 2015, o percentual de detecção dos casos novos da TB no país, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), foi de 87%, o que reforça a necessidade de implementar ações que contribuam para aumento da detecção de novos casos, levando em consideração as especificidades das populações-chave para o controle da TB (WHO²⁵, 2019; Brasil², 2019). Uma dessas ações é a busca ativa do indivíduo sintomático respiratório e seus contatos, que é uma das prioridades relacionadas no Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), bem como oferecer o tratamento adequado e favorecer a aderência a este. Esta medida, se devidamente aplicada, favoreceria o diagnóstico, reduzindo as taxas de incidência da TB (Nogueira⁴ *et al.*, 2005), levando conseqüentemente à interrupção da cadeia de transmissão, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando a cura do paciente (Ferreira⁵ *et al.*, 2005; Brasil², 2019).

O teste sorológico baseado na resposta de anticorpos (Ac) possui potencial para o desenvolvimento de métodos que possam contribuir para aumentar a detecção de novos

casos auxiliando no diagnóstico e controle da TB, devido a sua fácil operacionalidade, baixo custo e fácil adaptação a testes no local de atendimento (POC) e com potencial para teste de triagem ou diagnóstico. Explorar novos biomarcadores, como as proteínas das famílias prolina-glutamato (PE)/prolina-prolina-glutamato (PPE) e a fusão de antígenos específicos de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), poderiam compor ferramentas diagnósticas úteis ao controle da TB (Mulinari⁶, 2016).

Estudos de sequenciamento gênico revelaram que, surpreendentemente, os genes da família PE/PPE ocupam uma fração significativa do genoma micobacteriano (10%). Entretanto, o seu alto conteúdo de GC causa problemas técnicos para sequenciamento, alinhamento e clonagem desses genes, retardando o progresso em seu melhor entendimento. Em 2009, a PPE59 foi clonada com sucesso e identificado um moderado potencial de induzir interferon gama (IFN- γ) em linfócitos de pacientes com TB/infecção (Chen⁷ *et al.*, 2009). Por outro lado, nosso laboratório também logrou clonar este gene mostrando imunodominância da imunoglobulina A (IgA) em soros de TB pulmonar comparado à IgG (Mulinari⁶, 2016). Em nosso laboratório foi construída uma quimera protéica (MT10.3:MPT64 - F1), que é reconhecida pela IgA do líquido pleural de pacientes com TB pleural, com alta sensibilidade e especificidade (Araújo⁸ *et al.*, 2010; da Silva⁹ *et al.*, 2019). No entanto, de acordo com o nosso conhecimento, não há estudos sobre a reatividade da F1 para Ac do soro de pacientes com TB pulmonar.

Na população indígena, as doenças infecciosas e parasitárias permanecem entre as causas de óbitos mais importantes e a TB destaca-se como uma das principais endemias que acometem essa população (Baruzzi¹⁰ *et al.*, 2001; Ferreira¹¹, 2011). Para o diagnóstico eficaz são necessários testes para a detecção de casos em ambientes descentralizados, com menor acesso à assistência médica. Para suprir essa necessidade, a OMS divulgou uma série de perfis de produtos-alvo de alta prioridade (TPPs) para auxiliar no diagnóstico de TB: TPP1- teste não baseado em escarro, capaz de detectar TB através da identificação de biomarcadores; TPP2- teste de triagem que pode ser usado para identificar aqueles que precisam de exames confirmatórios, aplicado a pacientes de risco, que apresentem sintomas mínimos; TPP 3- teste baseado em escarro para substituir a baciloscopia na detecção de TB pulmonar. Entretanto, o teste precisa ser simples, de baixo custo, prescindir de equipamentos sofisticados ou utilizar equipamento mínimo e ser altamente sensível. Os objetivos dos testes de triagem são: detectar TB ativa

precocemente para reduzir o risco de recidiva e transmissão da TB e identificar indivíduos para terapia preventiva reduzindo a incidência da TB (Yoon¹² *et al.*, 2017; García-Basteiro¹³ *et al.*, 2018).

1.1- Revisão Bibliográfica

1.1.1- Características gerais do gênero *Mycobacterium* e os aspectos históricos da tuberculose

Estudos filogenéticos indicam que o gênero *Mycobacterium* emergiu há cerca de 70.000 anos, originário de micobactérias ambientais. Esse complexo de espécies acompanhou as migrações do homem moderno para fora da África. A introdução da agricultura, a civilização e o aumento da densidade populacional em áreas urbanas fizeram com que o gênero *Mycobacterium* se expandisse, dando origem às várias linhagens e à distribuição atual (Comas¹⁴ *et al.*, 2013; Delogu¹⁵ *et al.*, 2013).

O gênero *Mycobacterium* compreende um grande grupo de 188 espécies que inclui alguns dos mais impactantes patógenos para o homem (*Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*). Estudos de Gupta^{16,17} *et al.* (2016; 2018) mostram que as sequências genômicas fornecem um recurso valioso para estudos comparativos na identificação de marcadores moleculares que são compartilhados especificamente por um grupo de organismos e são úteis na demarcação de diferentes táxons. Há dois tipos de marcadores moleculares que são úteis para estudos evolutivos/taxonômicos:

1) os índices de assinatura conservada (CSIs), onde inserções ou deleções de dois ou mais nucleotídeos estão presentes em uma posição específica, dentro de uma região conservada em um grupo, possui relações filogenéticas;

2) e as proteínas de assinatura conservada (CSPs), cujos homólogos são encontrados exclusivamente em um grupo de organismos que possuem relações filogenéticas. Essas análises identificaram 172 marcadores moleculares (CSPs e CSIs) que são encontrados exclusivamente em todas as micobactérias ou pelos membros dos diferentes clados ou ramos (grupos de organismos originários de um único ancestral) (Gupta¹⁶, 2016; Gupta¹⁷ *et al.*, 2018).

Com o sequenciamento completo do genoma da maioria das espécies do gênero, juntamente com a análise desses marcadores moleculares, houve uma reclassificação onde foi possível dividir as espécies do gênero *Mycobacterium* de crescimento rápido ou lento, em cinco principais clados monofiléticos com quatro novos gêneros, que abrangem os membros do clado “*Tuberculosis-Simiae*” e os novos gêneros *Mycolicibacter* gen. nov. (Clado "Terraе"), *Mycolicibacillus* gen. nov. (Clado "Triviale"), *Mycolicibacterium* gen. nov. (Clado “Fortuitum-Vaccae”) e *Mycobacteroides* gen. nov. (Clado "Abscessus-Chelonae") (Tortoli¹⁸ et al., 2017; Gupta¹⁷ et al., 2018) (Fig.1).

As espécies do complexo *M. chelonae-abscessus* são micobactérias de crescimento rápido, pertencentes ao grupo mais ancestral. O clado “*Fortuitum-Vaccae*” abrange todas as outras espécies de micobactérias de crescimento rápido. As espécies de micobactérias de crescimento lento formam três clados principais:

- 1) o clado “*Tuberculosis-Simiae*” composto por micobactérias de crescimento lento, incluindo várias espécies patogênicas de *Mycobacterium* (complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. simiae*)
- 2) e o “Complexo *Terraе*”, formados pelos clados *Terraе* + *Triviale*, onde as espécies *M. triviale* e *M. koreense* também formam consistentemente um clado mais ramificado dentro desse complexo (Tortoli¹⁸ et al., 2017; Gupta¹⁷ et al., 2018) (Fig.1).

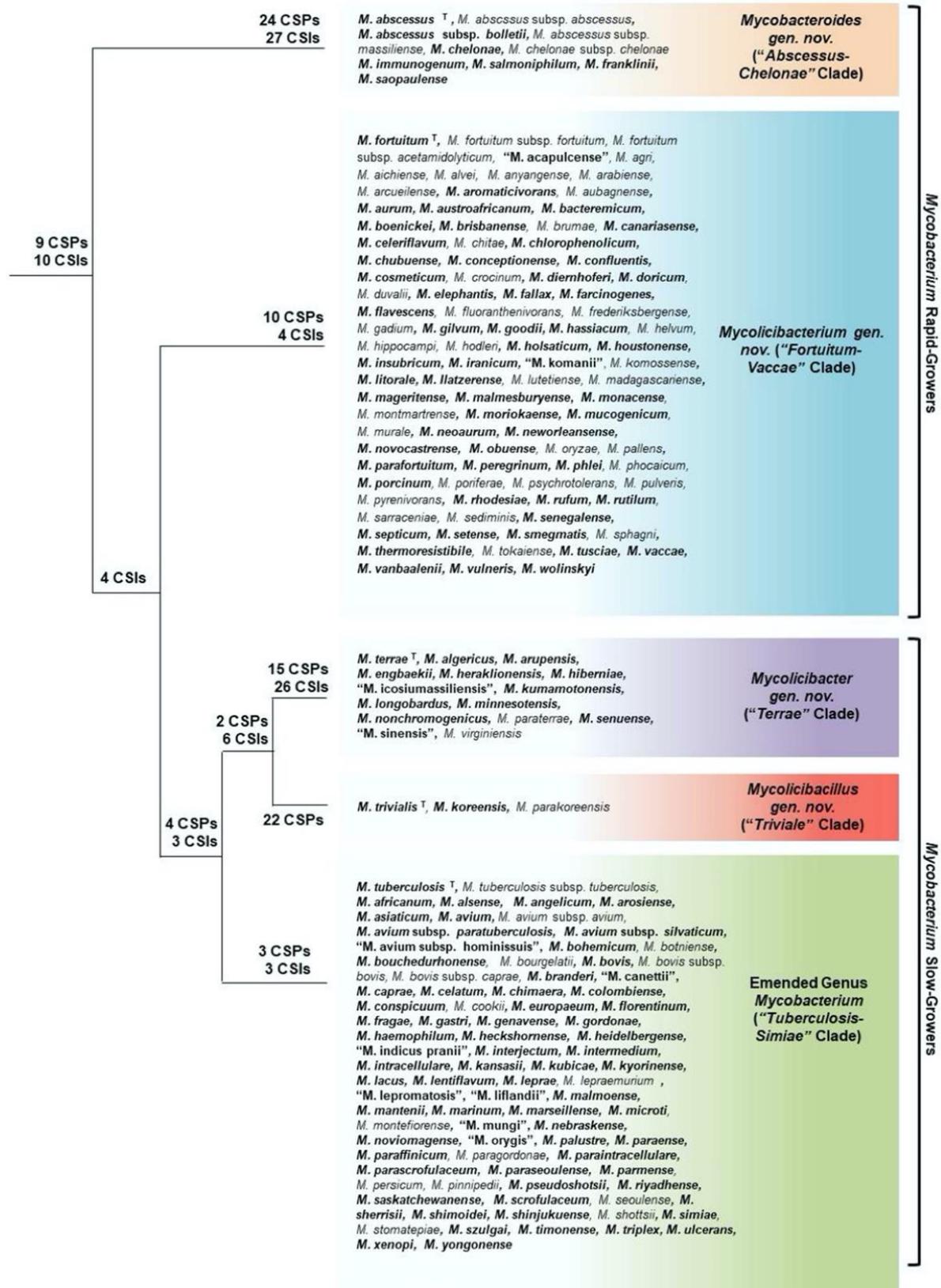


Figura 1: Diagrama da atual classificação de micobactérias distribuídas em cinco principais clados. CSI: índices de assinatura conservada; CSP: proteínas de assinatura conservada. Disponível em: Gupta *et al.*, 2018.

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) é o principal agente etiológico da TB em humanos e de acordo com a nova classificação pertence ao clado *Tuberculosis-Simiae*. Morfologicamente, é um bastonete sem flagelos, não forma esporo, é de crescimento lento (15 a 20 horas), variando de 0,2 a 0,6 µm de diâmetro e 1,0 a 4,0 µm de comprimento, não produz toxinas e acomete preferencialmente os pulmões (Ducati²⁴ *et al.*, 2006).

A sua parede celular é composta de até 60% de lipídios que consistem basicamente em ácidos graxos de cadeia incomum com 60 a 90 carbonos, denominados ácidos micólicos. O alto teor lipídico se constitui em um importante e impermeável barreira para numerosos antibióticos e agentes antimicrobianos, dificultando a descoloração dos bacilos, corados por corantes básicos, sendo por esta razão denominados bacilos álcool ácido resistentes (BAAR). Além disso, a parede celular de *Mtb* desempenha um papel fundamental na virulência e resistência bacteriana (Delogu¹⁵ *et al.*, 2013).

A TB, também nominada no passado como tísica pulmonar, ‘peste branca’ ou ‘doença do peito’, é uma doença infecciosa com evidências do seu surgimento há cerca de 15.000 anos. O fato de ter sido detectado em múmias egípcias indica que *Mtb* já acometia o homem há 3.400 anos antes de Cristo (Bertolli Filho¹⁹, 2001).

Autores sugerem que no período colonial português, a partir do século XVI, os jesuítas e colonos infectados pela “peste branca” que vieram para o Brasil tiveram contato permanente com os indígenas causando o seu adoecimento, tornando-se a TB a principal causa de óbito. A comunidade indígena, cuja história biológica não incluía a TB, tornou-se vítima indefesa da peste branca, e a partir deste período a TB surgiu como uma epidemia nesta população (Bertolli Filho¹⁹, 2001; Maciel²⁰ *et al.*, 2012). Entretanto, esta hipótese é controversa e simplista, pois são incapazes de explicar as abundantes evidências arqueológicas da presença de tuberculose nas Américas antes do contato com europeus. Análises paleopatológicas e/ou moleculares relataram centenas de indivíduos, de mais de 200 locais em todo o mundo, com evidências de infecção tuberculosa; esses casos são sintetizados em várias revisões recentes. No Novo Mundo, a densidade de casos descritos aumenta na América do Norte e do Sul ao longo do primeiro milênio dC e até o contato com o europeu (Bos²¹ *et al.*, 2014).

Já no final do século XVIII, a TB era qualificada como “mal romântico”, uma característica de poetas e intelectuais devido aos hábitos boêmios e à vida noturna agitada.

Na época a ‘tísica’ representava a expressão física dos sentimentos e era reconhecida no campo artístico e literário como a doença da paixão (Pôrto²², 2007). Já no final do século XIX construiu-se a imagem da TB como uma concepção social e não mais romântica devido à sua maior persistência e propagação nas classes trabalhadoras. Similarmente ao que ocorreu na Europa durante a Revolução Industrial, a epidemia de TB no Brasil tornou-se realidade na maior parte das cidades, sendo denominada “a praga dos pobres”, dada sua íntima relação com moradias insalubres, com a falta de higiene e a nutrição deficiente, tornando-se uma grande preocupação para a saúde pública (Gonçalves²³, 2002; Pôrto²², 2007; Maciel²⁰ *et al.*, 2012).

Em agosto de 1881, o médico e cientista Robert Koch queria evidenciar o agente etiológico da tísica através de testes com animais e análise microscópica e iniciou suas pesquisas infectando cobaias com *Mtb* e observou que estas adoeciam. A descoberta do bacilo de Koch em 1882, modificaram as concepções, as representações da doença e as formas de tratamento. Políticas higienistas começaram a surgir, como melhorias sanitárias e de moradia, além do isolamento dos casos em sanatórios, buscando assim reduzir a transmissão e, conseqüentemente, o número de casos. O marco do controle e do tratamento da TB ocorreu com o desenvolvimento da vacina BCG (Bacilli Calmette Guérin ou *M. bovis* BCG) e da introdução das drogas anti-TB, juntamente com melhorias das condições sociais, econômicas e sanitária (Gonçalves²³, 2002; Pôrto²², 2007; Maciel²⁰ *et al.*, 2012).

A BCG foi desenvolvida em 1921 por Albert León Charles Calmette e por Jean Marie Camille Guérin. Em 1927 iniciou-se, no Brasil, a vacinação com BCG em recém-nascidos sob supervisão da Liga Brasileira Contra a Tuberculose (Gonçalves²³, 2002; Pôrto²², 2007; Maciel²⁰ *et al.*, 2012). Com a descoberta da estreptomicina pelo americano Selman Waksman em 1943 abriram-se, nas décadas seguintes, perspectivas para a busca e a utilização de novos fármacos, incluindo a isoniazida (1952), a rifampicina (1965), o etambutol (1968) e a pirazinamida (1970), drogas ainda utilizadas no tratamento de primeira linha contra a TB. Com a evolução do esquema terapêutico houve redução do tempo do tratamento, favorecendo a maior adesão dos pacientes ao uso das drogas, o que conseqüentemente contribuiu para o controle da doença, levando a acreditar que na virada do século XX a TB seria erradicada. O tratamento também favoreceu o bem-estar dos doentes já que antes eram estigmatizados, e assim poderiam voltar ao convívio familiar e

da sociedade, extinguindo o isolamento nos sanatórios (Pôrto²², 2007; Maciel²⁰ *et al.*, 2012).

Em 1981, com a descrição dos primeiros casos da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e o desmantelamento dos serviços de vigilância da TB, a doença recrudescceu nos países desenvolvidos. Já nos países em desenvolvimento, a TB nunca foi devidamente controlada por problemas nas políticas públicas de saúde e deficitárias condições socioeconômicas e sanitárias de parcela da população. O aumento de resistência micobacteriana as drogas utilizadas no tratamento da TB devido a protocolos erráticos de administração e, muitas vezes a adesão negligenciada ao tratamento por parte dos pacientes, associada a falta de políticas públicas para minimizar as condições sociais, econômicas e sanitárias deficitárias em áreas negligenciadas, houve aumento no número de casos de TB. Sendo assim, a TB ressurgiu como uma das principais doenças infecciosas no mundo contemporâneo, sendo declarada em 1993, pela OMS, como um grave problema de saúde global (Maciel²⁰ *et al.*, 2012).

1.1.2- Epidemiologia

1.1.2.1. Mundo

A TB segue como um grave problema mundial de saúde pública. Segundo a OMS, é a doença infecciosa, causada por um único agente, responsável pelo maior número de óbitos, superando o HIV (WHO²⁵, 2019). Globalmente, um número estimado de 10 milhões (entre 9,0 e 11,1 milhões) de pessoas adoeceram de tuberculose no mundo em 2018, número esse que tem sido estável nos últimos anos. Desses 10 milhões de novos casos, aproximadamente 3,6 milhões não são notificados e provavelmente não diagnosticados, resultando na transmissão contínua da TB entre famílias e comunidades (Nathavitharana²⁶ *et al.*, 2019). Estimou-se, nesse mesmo ano, que 1,2 milhões (variação de 1,1 a 1,3 milhões) de pessoas morreram em decorrência da doença (uma redução de 27% em relação a 1,7 milhões em 2000) (WHO²⁵, 2019).

Quase 90% dos casos de TB estão em 30 países com alta carga da doença (Figura 2). Globalmente, cerca de 1,7 bilhão de pessoas estão infectadas com *Mtb* de forma latente (ILTB) e, portanto, cerca de 10% dos ILTB correm o risco de desenvolver a doença ao longo da vida. A TB afeta pessoas de ambos os sexos e em todas as faixas etárias, mas a

maior predominância de TB é em homens (WHO²⁵, 2019). A incidência global da doença diminuiu cerca de 1,4% ao ano desde 2000. No entanto, para atingir a meta da Estratégia pelo Fim da Tuberculose da OMS, isto é, redução da incidência da TB para menos de 10 casos por 100 mil hab. até 2035, seria necessária uma redução global de 4 a 5% ao ano (Brasil², 2019).

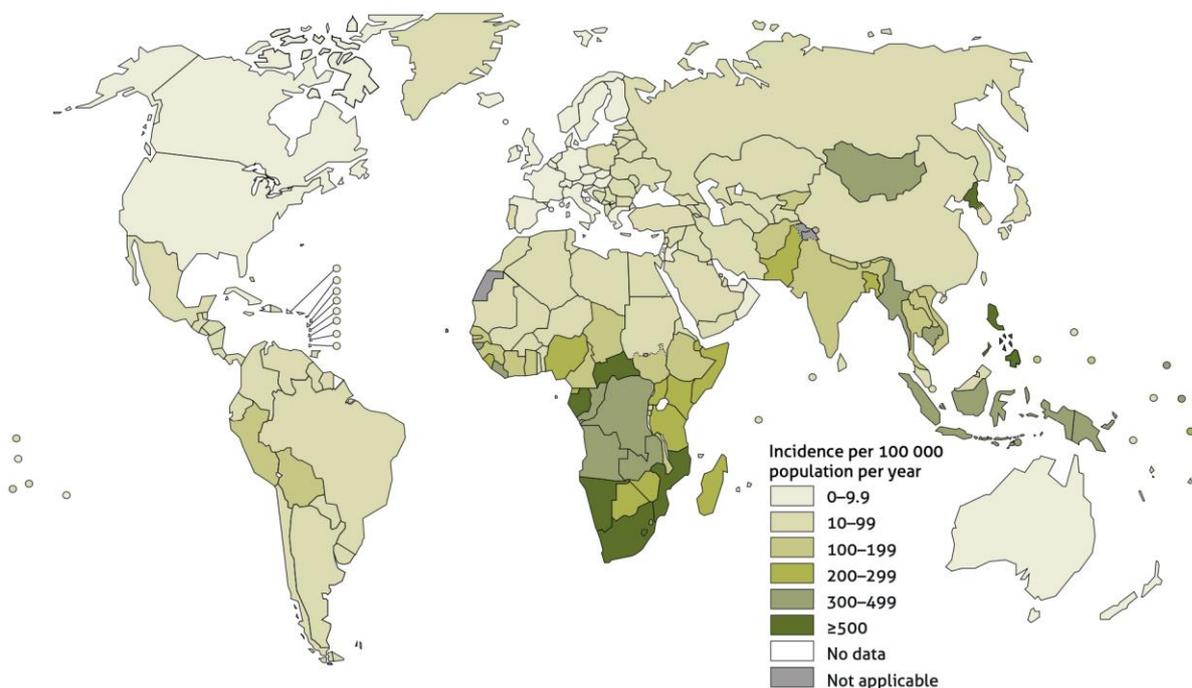


Figura 2: Mapa da incidência da tuberculose no mundo (casos/100 mil habitantes) em 2018. Disponível em: WHO,2019.

1.1.2.2. Américas

A OMS estimou 282.000 casos novos, e de recidiva, de TB para a região das Américas em 2017, contribuindo com 3% da carga global de TB (10 milhões de casos), e taxa de incidência de 28/100.000 hab. A maior taxa de incidência foi observada no Caribe (61,2/100.000 hab.), seguido pela América do Sul (46,2/100.000 hab.), América Central e México (25,9/100.000 hab.) e América do Norte (3,3/100.000). Note-se que 87% dos casos de TB estão concentrados em 10 países. Entretanto 55% dos casos ocorrem no Brasil (32%), Peru (13%) e México (10 %) (PAHO²⁷, 2018).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle da tuberculose (PNCT) define que as populações mais vulneráveis à TB são: população indígena, população privada de

liberdade, população em situação de rua e pessoas vivendo com HIV/AIDS (Brasil²⁸, 2014), além de crianças, pessoas vivendo em aglomerados subnormais quanto a condições sociais, econômicas e sanitárias, com diabetes, dependentes químicos e etilista, relacionados a toda a América (PAHO²⁷, 2018). Em 2018, foram diagnosticados 72.788 casos novos de TB no Brasil, o que corresponde a um coeficiente de incidência de 34,8 casos/100 mil hab. (Figura 2). Em 2017, foram registrados 4.534 óbitos pela doença, o que equivale ao coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/100 mil hab., o mesmo obtido no ano anterior (Brasil², 2019).

1.1.2.3. Indígenas

Supõe-se que os povos ameríndios eram provenientes da Ásia, entre 12 a 14 mil anos atrás, e com a sua migração para as Américas houve um grave gargalo populacional afetando os padrões de saúde dessa população. Estudos genéticos mostram que alelos raros são particularmente vulneráveis durante o efeito fundador, onde a deriva genética, as doenças e um ambiente hostil, atuam fortemente em grupos populacionais pequenos selecionando genes que podem ser benéficos ou maléficos para a nova população (Mulligan²⁹, 2004; Coimbra Jr³⁰ *et al.*, 2005; IBGE³¹, 2019).

No Brasil, foi estimada em cerca de 5 milhões a população de indígenas no início do século XVI. Atualmente, a população indígena brasileira é estimada em, aproximadamente, 817.963 mil pessoas, representando 305 diferentes etnias com 274 línguas registradas no país e cada um destes povos tem sua própria maneira de entender e se organizar diante do mundo (Funasa³², 2002; IBGE³¹, 2010; Buchillet³⁴, 2007). Segundo o Censo Demográfico Brasileiro de 2010, este número de indivíduos equivale a 0,4% da população brasileira, distribuídos em todo o país, estando a maioria na região Norte (48,6%), seguido do Nordeste (20,4%), Centro-Oeste (19,1%), região Sudeste (8,1%) e Sul (3,7%).

As populações indígenas brasileiras são particularmente suscetíveis à TB, por diversas razões, incluindo baixa condição socioeconômica, dificuldade de acesso aos serviços de saúde, ausência de memória imunológica e diversidade genética (Brasil²⁸, 2014; Lachi & Nakayama³⁵, 2015; Ferreira³⁶ *et al.*, 2019).

O coeficiente de incidência (CI) da tuberculose nos indígenas, em 2010, foi de 94,9/100 mil hab., valor 2,5 vezes maior quando comparado ao CI de TB da população geral que, naquele ano, foi de 37,6/100 mil hab. (Brasil²⁸, 2014). Nesse mesmo ano, o coeficiente de mortalidade (CM) por TB foi de 5,4/100 mil hab., mais de duas vezes superior ao verificado na população geral, que nesse ano foi de 2,4/100 mil hab. (Brasil²⁸, 2014; SINAN³⁷, 2019). Em 2017, o CI de TB na população indígena foi de 62,8/100.000 hab., permanecendo com o mesmo risco relativo, 2 vezes maior do que o da população geral, em abrir um quadro ativo da TB, evidenciando a fragilidade do controle da TB nesta população susceptível (Brasil², 2019).

Nos últimos 10 anos (2009-2019) foram notificados 9.276 casos de TB na população indígena do Brasil. Apenas no Mato Grosso do Sul (MS), estado em que está localizada a reserva indígena de Dourados, foram notificados 1.402 desses casos, sendo o segundo estado com o maior número, depois do estado do Amazonas. Dourados (MS), município que possui a maior concentração da população indígena, foi que contribuiu com o maior percentual de eventos da doença (83,9%) (SINAN³⁷, 2019). O número de óbitos por TB, como principal causa, nos últimos 10 anos, foi de 274 casos, dos quais 36 ocorreram no MS (Brasil²⁸, 2014; SINAN³⁷, 2019). Segundo o estudo de Ferraz & Valente³⁸, a população indígena tem risco mais elevado de TB, com uma incidência de 243,8 casos/100 mil hab. e um risco relativo de 7,32 (6,1 - 8,8), do que a população geral do MS. No MS também se evidenciou desigualdades quanto às diferentes raças, onde incidências nos indígenas foram maiores, em até seis vezes mais, que as registradas em qualquer outro grupo étnico, sendo responsável por 15,6% das notificações entre 2001 e 2009 (Basta³⁹ *et al.* 2013).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO, 2018)²⁷, 6 são os países das Américas que, ultimamente, tiveram aumento de TB nas populações indígenas, mostrando uma incidência em até 9 vezes maior que a população em geral, dos quais o Paraguai e o Brasil contribuem com a maior incidência (37/100.000 hab.), seguidos por Venezuela, Panamá e Colômbia (26/100.000 hab.), e México (17,4/100.000 hab.).

Nos últimos anos, o CI da TB na população geral apresenta uma queda anual de 1% aproximadamente, porém na população indígena há uma estabilidade desse coeficiente na maioria das regiões. Essa estabilidade permite sugerir a existência de

fatores de risco específicos que precisam ser investigados e/ou que as ações gerais para o controle da TB não conseguem chegar de forma efetiva para esta população (Ferreira³⁶, 2019).

Avanços significativos dos indicadores epidemiológicos de TB entre a população indígena foram observados, mas se faz necessário que estratégias diferenciadas sejam aprimoradas e aperfeiçoadas para aumentar o número dos casos detectados e reduzir as perdas após os estágios iniciais da dinâmica do atendimento primário, favorecendo o êxito das ações de vigilância e o controle da doença em áreas indígenas e de difícil acesso. Testes rápidos, de fácil operacionalidade, baixa complexidade e que possam ser aplicados em campo são demandas definidas pela OMS e que contribuiriam para o controle da TB na população indígena (Brasil⁴⁰, 2013).

1.1.3- Patogenia da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

A transmissão de *Mtb* ocorre, de pessoa a pessoa, por partículas infecciosas de 1,0 a 5,0 µm de diâmetro, formando os núcleos de Wells, quando expelidas pelos portadores de TB pulmonar ao tossir, espirrar, falar ou até mesmo cantar. Após a infecção, os bacilos inalados são englobados por macrófagos e células dendríticas podendo, imediatamente, ser eliminados ou se multiplicar no ambiente intracelular formando granulomas, que são massas de tecido cronicamente inflamados formados de bacilos vivos e mortos circundados por macrófagos ativados, além de camadas de células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B, que irá iniciar uma cascata de eventos envolvendo a produção de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias e formar uma barreira protetora que leva à eliminação da maior parte dos bacilos ao término da infecção primária, geralmente sem apresentação de sintomas (Flynn & Chan⁴¹, 2001; Ferraz⁴² *et al.*, 2006; Sasindran & Torrelles⁴³, 2011; Guirado & Schlesinger⁴⁴, 2013).

O equilíbrio das respostas imunes pró- e anti- inflamatórias é essencial para controlar a proliferação bacteriana nos granulomas. *Mtb* pode persistir por décadas dentro das estruturas do granuloma e, a menos que a imunidade do hospedeiro diminua devido a alguns fatores clínicos e/ou somáticos (HIV, diabetes, câncer, desnutrição, envelhecimento) e/ou fatores genéticos, ou os sinais que mantêm o granuloma enfraqueçam podendo levar a reativação da infecção. Em geral, a produção de quimiocinas é essencial para o recrutamento de células inflamatórias para o local da

infecção. Durante os estágios iniciais da formação de granuloma, o TNF produzido por macrófagos infectados e células T desempenha um papel crucial na manutenção da estrutura do granuloma, mantendo os níveis das quimiocinas e o recrutamento celular (Guirado & Schlesinger⁴⁴, 2013; Flynn⁴⁵ *et al.*, 2015).

ou os sinais que mantêm o granuloma diminuem, o que pode levar a uma reativação da infecção por TB

O mecanismo imunitário na TB necessita de uma grande complexidade de interações celulares. Os macrófagos, as células dendríticas e os neutrófilos irão reconhecer o bacilo, através dos receptores Toll-like (TLRs) de reconhecimento padrão (PRR), pelos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) ativando macrófagos e células dendríticas. Após a ativação, as células epiteliais ativadas aumentam ainda mais o efeito bactericida intracelular dos macrófagos e promovem o recrutamento de neutrófilos e linfócitos para o local de infecção. Essa ativação da imunidade inata é um passo crucial no desenvolvimento da imunidade adaptativa e a interação de ambas as respostas é essencial para o controle e a eliminação do bacilo (Flynn & Chan⁴¹, 2001; Ferraz⁴² *et al.*, 2006; Chai⁴⁶ *et al.*, 2019). Após o reconhecimento, o patógeno será fagocitado e digerido por macrófagos, as células dendríticas irão apresentá-lo às células T, funcionando como células apresentadoras de antígenos (APCs). A ativação de subconjuntos de células T é geralmente induzida pela expressão de antígeno peptídico associados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, ativando as TCD8⁺, e MHC de classe II, ativando as TCD4⁺, aos receptores de células T (TCRs). As APCs infectadas, nos linfonodos, levam ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa contra *Mtb*, onde é gerada uma resposta imune auxiliar de células T do tipo 1 (Th1) (Jasenosky⁴⁷ *et al.*, 2015; Chai⁴⁶ *et al.*, 2019).

Ao reconhecer os antígenos (Ag), os linfócitos T sofrem diferenciação, no qual a população de células T se diferencia, de acordo com sua função, em citotóxicas (CD8), auxiliares (CD4) ou reguladoras (Treg). Os linfócitos T CD4⁺ podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17, cada um deles secretor de um conjunto particular de citocinas. As células Th1 secretam IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α , TNF- β e o IFN- γ , essenciais para o controle de patógenos intracelulares. As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, relacionadas principalmente a doenças alérgicas e infecções por helmintos, e por induzir a diferenciação de linfócitos B, além de regular negativamente a resposta Th1. As células

Th17 produzem IL-17 e IL-23 e estão envolvidas na regulação da resposta imune por induzirem o recrutamento de neutrófilos (Flynn & Chan⁴¹, 2001; Mesquita⁴⁸ *et al.*, 2010; Flynn⁴⁵ *et al.*, 2015; Jasenosky⁴⁷ *et al.*, 2015; Chai⁴⁶ *et al.*, 2019).

As células B são subtipos de linfócitos, que podem ser divididas em três grupos: células linfocitárias B-1 (que são divididas em células B-1a e B-1b), células B foliculares e células B de zona marginal (MZ) (Allman & Pillai⁴⁸, 2008). As células B-1 produzem Ac de baixa afinidade e são parte funcional da resposta imune inata. A subpopulação de células B-1a são responsáveis pela produção de Ac, enquanto as células B-1b produzem respostas imunes adaptáveis a antígenos independentes de células T. As células B foliculares são células B maduras que circulam no sangue e, com a ajuda das células T, podem se transformar em células B que produzem anticorpos. Elas se associam a células dendríticas foliculares nos folículos das células B dos linfonodos e baço. As células B MZ produzem anticorpos responsáveis pela proteção contra patógenos transmitidos pelo sangue, são encontradas na zona marginal do baço e fornecem proteção precoce durante infecções por patógenos (Allman & Pillai⁴⁸, 2008; Mesquita⁴⁹ *et al.*, 2010). As células B também são células apresentadoras de antígenos eficazes que respondem a moléculas antigênicas ou patógenos inteiros. A ativação dos linfócitos B se dá através da ligação do receptor de superfície (BCR) a um epítipo antigênico, resultando na geração de plasmócitos com produção de imunoglobulinas com alta afinidade para o epítipo antigênico que originou a resposta. Os linfócitos B funcionam também como APCs, após interiorizarem e processarem o Ag ligado ao BCR. Os peptídeos gerados pelo processamento são expressos na membrana dos linfócitos, ligados às moléculas do MHC classe II, para apresentação aos linfócitos TCD4+. A interação do complexo peptídeo/MHC classe II com o receptor TCR inicia uma cadeia de eventos que levam os linfócitos T à expansão clonal e à produção de citocinas que, por sua vez, irão regular as respostas das células B, levando à sua proliferação e maturação, à troca de classe por afinidade e ao desenvolvimento de células B de memória e às células do plasma produtoras de Ac (Mesquita⁴⁹ *et al.*, 2010).

Por muito tempo, a imunidade contra a TB foi atribuída apenas à resposta imune celular, mas nos últimos anos estudos mostraram que as células B e as imunoglobulinas contribuem significativamente para moldar a resposta imune contra patógenos intracelulares (Maglione & Chan⁵⁰, 2009; Chan⁵¹ *et al.*, 2014; Achkar⁵² *et al.*, 2015;

Casadevall⁵³, 2017) (Figura 3). Quando as células B são ativadas por antígenos de *Mtb*, elas se desenvolvem em células plasmáticas ativadas que têm a capacidade de, no centro germinativo dos órgãos linfoides, as células B são APCs às células T, com uma produção ampla de citocinas e a geração de imunoglobulinas específicas para TB, onde cada um desses atributos pode afetar a diferenciação e as funções das células imunes, como células T, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. As células B também podem regular as respostas Th1 pela produção de Ac que, ao reagir com Ag, geram complexos imunes que iniciam a sinalização no receptor Fc (FcR), desempenhando um papel adjuvante à imunidade celular. No espaço alveolar o Ac pode afetar o resultado da infecção através da opsonização, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e neutralização de antígenos segregados, ativação do complemento e aumentar fagocitose e morte de *Mtb*, mediadas pela ativação do FcR. Dentro da cavidade do granuloma a influência das células B e Ac na resposta inflamatória se dá através da fagocitose mediada pelo FcR e morte de *Mtb* extracelular. O Ac pode afetar a formação de granuloma através de seus efeitos pró e anti-inflamatórios, além do que, potencialmente, pode levar à redução de disseminação e ao controle local da infecção (Maglione & Chan⁵⁰, 2009; Chan⁵¹ *et al.*, 2014; Achkar⁵² *et al.*, 2015; Casadevall⁵³, 2017).

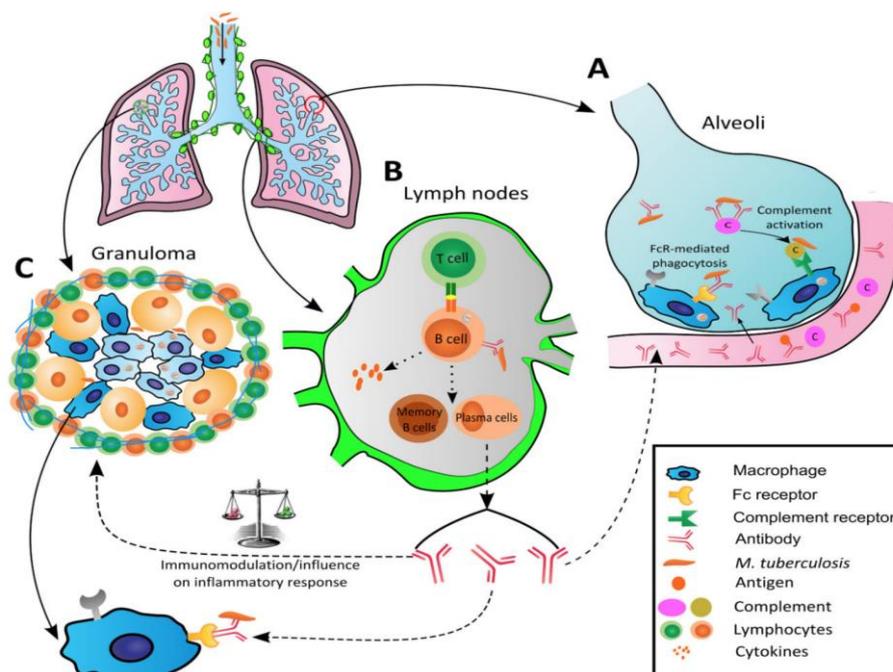


Figura 3: Etapas em que as células B e os anticorpos participam da proteção contra a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Disponível em ACHKAR *et al.*, 2015.

A IgA é uma classe de Ac presente em mucosas, onde desempenha um papel fundamental na defesa, atuando contra bactérias e vírus que invadem os tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital. Sua forma monomérica, presente no soro, elimina patógenos que ultrapassaram a barreira de mucosa, interagindo com os receptores Fc de células citotóxicas-anticorpo dependente (Achkar & Casadevall⁵⁴, 2013; Zhu⁵⁵ *et al.*, 2018). A resposta de IgA, contra os Ags TBF6 / DPEP, foi encontrada no soro de pacientes com TB pulmonar, independentemente do tempo de início dos sintomas (Bezerra⁵⁶ *et al.*, 2009). Zimmermann⁵⁷ *et al.* (2010) demonstraram que a atividade inibitória do Ac anti-*Mtb* depende de seu isotipo. Os Ac IgA para diferentes Ag de superfície de *Mtb* (LAM e HBHA) podem bloquear a captação de *Mtb* pelas células epiteliais do pulmão, independentemente da expressão dos receptores Fc, função esta não realizada pela IgG. Chin⁵⁸ *et al.* (2015), estudando modelos murinos infectados com *Mtb*, evidenciaram que IgA promove diminuição da carga bacilar. Esses estudos indicam um efeito protetor da IgA na infecção por *Mtb*, e como a principal porta de entrada de *Mtb* é a mucosa, a IgA é uma importante imunoglobulina a ser estudada.

1.1.4- Aspectos imunológicos da população indígena das Américas

Sabe-se que os indígenas são acometidos de forma mais grave com as doenças causadas por patógenos intracelulares, como a TB, porém os motivos dessa suscetibilidade são ainda obscuros. Vários estudos listam hipóteses que possam explicar a suscetibilidade dos indígenas a desenvolver a TB (Erb, 1999⁵⁹; Mulligan²⁹, 2004; Salzano & Hutz⁶⁰, 2005; Alves⁶¹ *et al.*, 2005; Zembruski⁶² *et al.*, 2010; Augusto⁶³ *et al.*, 2015). A memória imunológica, isto é, a falta de exposição aos patógenos na infância levaria a um aumento na suscetibilidade às doenças infecciosas (Lindenau⁶⁴, 2016). A heterozigossidade baixa do sistema antígeno leucocitário humano (HLA/ MHC) entre indígenas levaria a uma menor diversidade de fenótipos resistentes a doenças, diminuindo a capacidade de reconhecer e responder de maneira eficaz ao patógeno (Augusto⁶³ *et al.*, 2015; Lindenau⁶⁴, 2016). Foi observado que as tribos sul-americanas apresentaram uma diversidade alélica reduzida (formas alternativas, geradas por mutações, de um determinado gene em posição específica em um mesmo locus) e/ou haplotípica

(combinação de alelos em locus adjacentes, que estão no mesmo cromossomo) no sistema MHC classe II em relação às demais populações, sugerindo que esse fator pode influenciar na suscetibilidade e/ou proteção contra doenças, como a TB (Alves⁶¹ *et al.* 2005).

Uma terceira hipótese fala do balanço das respostas do sistema imune Th1/Th2. Vários são os genes relacionados com a diferenciação das células Th0 em Th1 ou Th2 e essas células desencadeiam padrões de resposta imune bastante diferentes que são responsáveis pelo combate aos diferentes patógenos. Considerando que a exposição ambiental a ferimentos, ectoparasitas e helmintos se mantém durante a história dos indígenas, espera-se que seja encontrada uma alta variabilidade em genes de resposta Th2 em detrimento de Th1, em relação àquela observada em outras populações e, conseqüentemente, podem ter dificuldade para combater adequadamente infecções que exijam esse tipo de resposta, como a TB (Erb⁵⁹, 1999; Rook⁶⁵ *et al.*, 2004). Giampietro⁶⁶ *et al.* (2010) avaliaram a capacidade de proliferação, induzida por Ag (PPD), por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e a produção de citocinas (IL-12, IL-4, IL-5, TNF e IFN- γ) em 86 indígenas (Warao) e 34 não-indígenas (crioulos). O grupo indígena produziu níveis mais baixos de IL12, TNF e IFN- γ e um nível mais alto de IL-5, indicando que a resposta do tipo Th2 predominou nesse grupo. Araujo⁶⁷ *et al.* (2004) investigaram os resultados dos testes de sensibilidade cutânea à tuberculina (TCT) e à *Candida* sp. (TCC) em crianças Warao com idade ≤ 15 anos para avaliar o desempenho diagnóstico e observaram que 80% das crianças não responderam ao TCT ou ao TCC. Em outro estudo (Zembruski⁶² *et al.* 2010) foi analisado os resultados do TCT em população indígena Xavante, MS, demonstrando um importante papel de marcadores dos sistemas imune adaptativo e inato na reação. Padrão forte reator ao TCT estaria relacionado com uma resposta predominantemente Th1, enquanto a anergia estaria relacionada com predominância de um padrão Th2 da resposta imune. Todas essas teorias podem coexistir dentro da população indígena e com isso estão mais suscetíveis à tuberculose e a outras doenças infecciosas.

1.1.5- Medidas de controle da tuberculose nas populações indígenas

Até 1991, a política de atenção à saúde dos povos indígenas no Brasil era essencialmente assumida pela Fundação Nacional do Índio (FUNAI), através das Equipes

Volantes de Saúde (EVS). Porém, por várias dificuldades, o controle da tuberculose nos indígenas foi negligenciado (Confalonieri⁶⁸ *et al.*, 1989; Coimbra Jr³⁰ *et al.*, 2005). Com a introdução do PNCT, iniciaram-se os movimentos para o controle da doença na população indígena. Atualmente, a responsabilidade pelo atendimento aos indígenas é da Secretaria Especial de Saúde Indígena (SESAI) que foi implantado oficialmente em 1999, e para a organização dos serviços básicos de saúde foram criados os Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEI), presentes praticamente em todos os estados do país, com a responsabilidade de prestar atendimento a toda população aldeada em terras indígenas (Garnelo⁶⁹ *et al.*, 2012). Os 34 DSEI, fazem o atendimento através das Equipes Multidisciplinares de Saúde Indígena (EMSI), que são constituídas de profissionais tais como médico, enfermeiro, odontólogo, técnico em enfermagem, técnico em saúde bucal, agente indígena de saúde e agente indígena de saneamento (Brasil², 2019).

O primeiro nível de Atenção Primária à Saúde (APS) é na aldeia, podendo ser referenciado para a sede do Polo Base, ou para um serviço complementar na rede municipal, regional ou estadual. Nesse caso, o referenciado é acolhido em uma Casa de Saúde Indígena (Casai), desde a sua chegada na sede do município até seu retorno à aldeia (Figura 4). Na maioria dos DSEI, as ações de diagnóstico da tuberculose encontram-se instaladas no nível do Polo Base, enquanto o tratamento é descentralizado para o Posto Indígena de Saúde, sendo supervisionado diretamente (TDO). Em 6 dos 34 DSEI o coeficiente de incidência da TB é >100/100.000 hab. e o percentual de cura, em 2016, foi de 80,0% para os casos novos de TB, mostrando a importância dessa organização para a saúde indígena (Brasil², 2019).



Figura 4: Organização da rede de serviços de saúde nos Distritos Sanitários Especiais Indígenas. Disponível em: Brasil, 2019. Dados SESAI.

O PNCT tem atuado no fortalecimento das ações de controle específicas para a população indígena, tais como: visitas de monitoramento e avaliação nos estados e municípios prioritários, incremento das ações de controle nos Distritos Sanitários Indígenas, oferta do Teste Rápido Molecular para TB e maior adesão ao Tratamento Diretamente Observado (TDO), que é recomendado para todo indígena diagnosticado com a doença (Brasil²⁸, 2014). A implementação, no ano de 1999, do TDO nas populações indígenas de Dourados levou à redução significativa no abandono do tratamento, entretanto, a alta taxa de incidência de TB em crianças e adultos jovens indica transmissão e manutenção contínuas da epidemia nessa população (Croda⁷⁰ *et al.*, 2012). Portanto, há urgência de novas ferramentas diagnósticas e, segundo a OMS (WHO¹, 2017), o desenvolvimento de TPP (produtos-alvo de alta prioridade) e uma estrutura de avaliação de um teste para prever a progressão da infecção por TB para a doença ativa é fundamental para quebrar a cadeia de transmissão.

1.1.6- Diagnóstico da tuberculose

Indivíduos com sintomatologia sugestiva de TB, como tosse persistente produtiva (muco e eventualmente sangue) há mais de 2 à 3 semanas, febre, sudorese noturna, emagrecimento, são avaliados clinicamente e os suspeitos de TB são submetidos ao

diagnóstico laboratorial que se dá através de vários exames, tais como o radiológico, os microbiológicos, os imunológicos e os exames moleculares (Brasil², 2019).

Um resultado positivo do exame do escarro por microscopia (SM, do inglês “sputum microscopy”), ou pesquisa de BAAR, confirma a TB ativa em pacientes com quadro clínico sugestivo de TB pulmonar e em sintomáticos respiratórios identificados através da busca ativa. A SM é baseada na pesquisa direta de BAAR em esfregaços de amostras clínicas em lâminas coradas pelo método Ziehl-Nielsen, que é um método simples, rápido e de baixo custo, e que necessita de equipamento mínimo. A SM permite detectar de 60% a 70% dos casos de TB pulmonar. Isto se reveste de grande importância já que os casos com SM positivo são os maiores responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão. Este método tem como desvantagens a baixa sensibilidade em paucibacilares, não ser possível diferenciar as espécies de micobactérias e outros microorganismos, como o gênero *Nocardia*, além da limitação operacional de 20 leituras de lâminas por operador por dia (Brasil², 2019).

A cultura para *Mtb*, considerada “padrão-ouro” no diagnóstico da TB pulmonar, tem elevada especificidade e é mais sensível (80%) que o SM. Esta permite a multiplicação e o isolamento da micobactéria, a partir da sementeira da amostra clínica, em meios de cultura específicos e, conseqüentemente, a identificação da espécie isolada, além de permitir a realização do teste de sensibilidade às drogas. Entretanto, a cultura é morosa (4 a 8 semanas para liberação do resultado) e laboriosa (Brasil⁷¹, 2011; Brasil², 2019). No Brasil, houve aumento no percentual de realização de cultura de escarro para micobactéria com identificação de espécie, entre a população indígena, passando de 9,7%, em 2003, para 26,3%, em 2012. Recomenda-se a realização de cultura para todo indígena maior de 10 anos, o que requer o desenvolvimento de ações que ampliem a realização destes exames nessa população (Brasil⁴⁰, 2013).

Atualmente, a OMS recomenda o uso do GeneXpert MTB / RIF[®] como o teste inicial a ser usado para todas as pessoas com suspeita de TB. Este teste rápido molecular (TRM TB[®]) é uma plataforma diagnóstica, aplicada diretamente aos espécimes clínicos suspeitos, baseada na amplificação de ácidos nucleicos de *Mtb* e triagem de cepas resistentes à rifampicina pela técnica RT PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo

real), com resultado disponibilizado em duas horas (WHO¹, 2017). A sensibilidade do TRM-TB é de cerca de 90% em adultos, e em crianças menores de 10 anos é de 66%. Este detecta a resistência à rifampicina, com uma sensibilidade de 95% (Brasil², 2019), atualmente há a disponibilidade do MTB / RIF[®] Ultra, que possui maior sensibilidade na detecção da TB, em amostras paucibacilares, sendo sua sensibilidade comparável à da cultura líquida. Entretanto, como também pode detectar bacilos mortos ou inviáveis, o TRM-TB não deve ser utilizado para diagnóstico nos casos de retratamento (reingresso e recidivas). Nesses casos, o diagnóstico da TB deve ser feito com baciloscopia e cultura, o TRM-TB poderá ser utilizado apenas para triagem da resistência à rifampicina, assim como em pacientes com suspeita de falência ao esquema básico (Brasil², 2019). O GeneXpert, juntamente com outros ensaios moleculares, embora sensível e aprovado pela OMS, segue com implementação lenta e isto se deve, parcialmente, aos custos operacionais consideravelmente altos, especialmente em serviços onde seu uso não recebe fontes externas de financiamento. Além de ser um teste de realização centralizada na unidade de saúde diagnóstica, necessita de estrutura e pessoal qualificado, por não ser de fácil operacionalidade para utilização em campo e no local de triagem dos pacientes (Pinto⁷² *et al.*, 2017). Um relatório de 2017 que avaliou políticas de combate à TB em 29 países com alta incidência de TB destacou que apenas 52% dos países o recomenda como teste inicial para toda a população, dos quais apenas 47% tornaram o Xpert MTB/RIF amplamente acessível (MSF⁷³, 2017).

A detecção da infecção da TB através da resposta imunológica do hospedeiro tem sido historicamente realizada pelo TCT, que avalia a hipersensibilidade tardia contra Ag micobacterianos (PPD ou derivado proteico purificado) e tem uma sensibilidade aproximada de 70%. Embora tenha sido utilizado rotineiramente por mais de um século, desde 1910, há limitações tais como a necessidade de pessoal treinado para administrá-lo, a subjetividade da interpretação e leitura dos resultados. Entretanto, uma das maiores limitações do TCT é a baixa especificidade, especialmente em indivíduos que foram vacinados pelo BCG (59%), ou naqueles infectados por outras micobactérias ambientais e em indivíduos imunocomprometidos (Ducati²⁶ *et al.*, 2006; Siqueira & Oréfica⁷⁴, 2019). Estudos descrevem TCT não reator nas diferentes populações indígenas, apesar da alta cobertura de vacinação com BCG (Escobar⁷⁵ *et al.*, 2004; Basta⁷⁶ *et al.*, 2006a; Zembrzuski⁶² *et al.*, 2010), sendo, portanto, mais uma limitação deste teste na aplicação entre os indígenas.

Na última década, o teste de liberação de interferon gama (IGRAs), que detecta a resposta das células T contra Ag específicos de *Mtb* (CFP-10, TB7.7 e ESAT-6) através da liberação de interferon, foi apresentado como uma ferramenta nova e valiosa para o diagnóstico de infecção por *Mtb*. Entretanto, o IGRA é ferramenta auxiliar no diagnóstico da na infecção por *Mtb*, pois não é conclusivo já que não diferencia TB ativa da latente, nem informa entre os infectados quais estariam em maior risco de desenvolver a doença ativa. O principal objetivo dos IGRAs é identificar aqueles que se beneficiarão da terapia preventiva entre os indivíduos com infecção latente (LTBI). Mas, tanto os IGRA como o TCT são limitados a esse respeito, por razões que incluem a incapacidade de distinguir reativação de reinfeção, redução da sensibilidade em pacientes imunocomprometidos e incapacidade de discriminar os vários estágios do espectro da TB (Drain⁷⁷ *et al.*, 2018), o que, em conjunto, enfraqueceu seu protagonismo no controle da TB (Delogu¹⁵ *et al.*, 2013; Pai⁷⁸ *et al.*, 2014; Lalvani⁷⁹ *et al.*, 2019).

Portanto, existe ainda um grande vazio nas metodologias diagnósticas para se alcançar as metas do “END-TB 2035” (WHO¹, 2017). Para tal, é necessário aumentar o diagnóstico dos casos novos e reduzir a perda de pacientes durante o tratamento no atendimento primário. Soluções diagnósticas simples são recomendadas de modo a obter produtos que possam, prioritariamente, ser aplicados no atendimento primário ou do tipo POC, isto é, possa ser aplicado no local onde se achou o caso suspeito, pois parte dos indivíduos TB são de comunidades negligenciadas, como os sem teto, usuário de drogas, encarcerados, indígenas e etc.

Os testes para TB baseados em sorologia podem ter as características necessárias para superar esses problemas. Estes têm potencial para serem rápidos, de baixo custo, serem formatados para uso no local de atendimento, ou em serviços clínicos com poucos recursos, podendo contribuir para auxiliar na confirmação diagnóstica das suspeitas clínicas de infecções. Os testes sorológicos estão diretamente relacionados à resposta imune do paciente, sendo capazes de detectar Ac específicos contra Ag micobacterianos no soro, plasma, líquido pleural e outros fluidos corporais de fácil obtenção ou detectar Ags, tais como LAM (lipoarabinomanana), que é aprovado pela OMS para diagnóstico imunoenzimático da TB em urina de pacientes vivendo com HIV (Lyashchenko⁸⁰ *et al.*, 1998; Araujo⁶⁷ *et al.*, 2004; Araujo⁸¹ *et al.*, 2008; Teva⁸² *et al.*, 2009; Burbelo⁸³ *et al.*, 2015; Vidyarthi⁸⁴ *et al.*, 2017).

Os testes sorológicos para diagnóstico da TB, embora largamente estudados, não estão disponíveis na rotina laboratorial devido à heterogeneidade da resposta imunológica ao reconhecimento de Ag de *Mtb*, o que gera sensibilidades e especificidades inadequadas e baixa reprodutibilidade. Mas os Ag utilizados nos vários estudos invariavelmente se repetem, havendo portanto um déficit exploratório das diferentes moléculas codificadas pelo genoma de *Mtb*, quer seja como Ag único ou como produtos da fusão de diferentes Ag, bem como dos isotipos de Ac (Lyashchenko⁸⁰ *et al.*, 1998; Araujo⁶⁷ *et al.*, 2004; Araujo⁸¹ *et al.*, 2008; Teva⁸² *et al.*, 2009; Burbelo⁸³ *et al.*, 2015; Vidyarthi⁸⁴ *et al.*, 2017).

Idealmente os testes diagnósticos rápidos devem ter as seguintes características (Drain⁷⁷ *et al.*, 2018; Nathavitharana²⁶ *et al.*, 2019):

- a) TPP 1 para teste de detecção de TB ativa: utilizando biomarcadores, sem usar escarro, informar início de tratamento. Alvo mínimo ou máximo produz sensibilidade (S) > 65% ou $\geq 68\%$ e especificidade (Sp) de 98%.
- b) TPP 2 para teste de triagem: utilizado para identificar pacientes com sintomas ou risco para desenvolver TB ativa, excluir TB ou selecionar para teste confirmatório. Alvo mínimo ou máximo produz S > 90% ou > 95% e Sp > 70% ou > 80 %, respectivamente.

O requisito de alta sensibilidade garante que indivíduos com resultado negativo na triagem tenham uma baixa probabilidade de TB ativa, já o requisito de especificidade moderadamente alta limita a necessidade de teste diagnóstico confirmatório a um grupo menor de indivíduos de alto risco (Yoon¹² *et al.*, 2017).

1.1.7- Proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizadas neste estudo

Com o sequenciamento total do genoma de *Mtb* identificou-se duas grandes famílias de proteínas PE e PPE, com 99 e 69 membros, respectivamente, que representam quase 10% da sua capacidade de codificação. Muito pouco se sabe sobre o papel e a função destas proteínas embora algumas subfamílias, como o PE-PGRS e PPE-MPTR, mas o fato de serem encontradas apenas em membros do antigo complexo *Mtb* ou em outras micobactérias patogênicas, há evidências de que alguns desses antígenos estão presentes na superfície celular levantando a hipótese de que estas proteínas estão

diretamente envolvidas na patogênese das infecções por micobactérias e na evasão da resposta imune do hospedeiro. (Brennan⁸⁵, 2017).

O gene *rv3429* que codifica a proteína PPE59 está localizado na região de diferença 11 (RD11), que está ausente de todas as cepas BCG, onde também é encontrado o gene que codifica para o Ag TB 7.7, utilizado no IGRA comercial (Parkash⁸⁶ *et al.*, 2009). Em estudo prévio de bioinformática foi evidenciado que o gene *rv3429* apresenta predição de 7 epitopos lineares antigênicos com limites (*threshold*) maior ou igual a um, sugerindo ser uma molécula com potencial imunodominante (Mulinari⁶, 2016). Chen⁷ *et al.* (2009) demonstraram que as proteínas de *Mtb* (Rv1978, NrdF1, MPT64, CFP-21, PPE57 e PPE59) induzem a liberação de IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em pacientes com TB ativa e em indivíduos com infecção latente. Estudos de avaliação da imunorreatividade da PPE59 ELISA IgA mostraram alta especificidade e moderada sensibilidade tanto em soro de adultos TB pulmonar e extrapulmonar, quanto em fluido pleural de indivíduos com TB pleural, sugerindo que a PPE59 possa ser candidata para compor um teste sorológico juntamente com outras proteínas, para o imunodiagnóstico da TB (Mulinari⁶, 2016; da Silva⁹ *et al.*, 2019).

O MPT-64 é uma proteína de 24kDa, que está entre as principais proteínas secretadas por *Mtb*, codificada pelo gene *rv1980c*. É descrita como altamente imunogênica, está localizada na região de diferença RD2, que é a segunda região ausente no genoma da cepa original de *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur e também está ausente de micobactérias não tuberculosas (MNT). Representando cerca de 8% das proteínas totais encontradas no filtrado de cultura, é uma das proteínas predominantes dentre as mais de 33 secretadas ativamente durante o crescimento de *Mtb* e é expressa precocemente, quando a bactéria está se dividindo ativamente. As proteínas secretadas pelas micobactérias são importantes Ag que são reconhecidos precocemente na resposta do hospedeiro à infecção; elas estimulam a proliferação de células T e a liberação de IFN- γ pelas PBMCs (Chen⁷ *et al.*, 2009; Bekmurzayeva⁸⁷ *et al.*, 2013). Estudos anteriores demonstraram que o MPT64 é reconhecido por pacientes com TB em ensaios imunológicos (Sable⁸⁸ *et al.*, 2005; Mustafa⁸⁹ *et al.*, 1998; Mustafa⁹⁰ *et al.*, 2008) e com alta imunogenicidade em áreas endêmicas como o Brasil (Kaisermann⁹¹ *et al.*, 2005; Sardella⁹², 2008; Sardella⁹³, 2014). Tavares⁹⁴ *et al.* (2007), estimulando PBMC com a combinação MPT-64/ESAT-6, observaram que 89% dos pacientes com TB pulmonar

apresentavam resposta para INF- γ para este Ag. Em líquido cefalorraquiano de paciente com meningite tuberculosa, um ELISA *in house* mostrou boa sensibilidade e especificidade na detecção de IgA-MPT-64 e a sua combinação com o Ag 16 kDa (Sardella⁹² *et al.*, 2008). O MPT64 fusionado ao ESAT6 foi também sugerido como componente vacinal (Bai⁹⁵ *et al.*, 2008). O MPT64 é ainda o componente de um teste comercial rápido e de fácil operacionalidade (Tuberculose Ag MPT64 Test Bioeasy) que identifica qualitativamente o complexo *Mtb* utilizando Ac monoclonal anti-MPT64 em colônias de cultura sólida ou em crescimento de cultura líquida. Esses estudos mostram a capacidade do hospedeiro de produzir resposta celular e humoral para o MPT-64. Porém, os métodos de identificação baseados no MPT64 diferem entre si em termos de especificidade, sensibilidade, tempo de detecção, disponibilidade e custo (Bekmurzayeva⁸⁷ *et al.*, 2013).

O MT-10.3 ou TB-10.3 é uma proteína com cerca de 10.3 kDa, codificada pelo gene *rv3019c*, e membro de uma grande família de proteínas micobacterianas, juntamente com CFP-10 e ESAT-6 (que compõe, junto com o TB7.7, o teste IGRA comercial), é descrita específica de *Mtb* (Kaisermann⁹¹ *et al.*, 2005; Araújo⁸ *et al.*, 2010). MT-10.3 foi identificada como Ag de células T específica, embora não muito sensível (Alderson⁹⁶ *et al.*, 2000; Tavares⁹⁷ *et al.*, 2006; Mon⁹⁸ *et al.*, 2014). Em estudos realizados no Brasil, o MT10.3 também mostrou baixa sensibilidade e boa especificidade em líquido de pacientes com meningite TB (Sardella⁹², 2008). Silva⁹⁹ *et al.* (2008) demonstraram que o MT10.3 foi capaz de distinguir os indivíduos TB pulmonar dos controles, em um teste de ELISA-IgG, porém com baixa sensibilidade (23.6%). Malaghini¹⁰⁰ *et al.* (2011) descrevem reações de hipersensibilidade cutânea tardia ao MT10.3, juntamente com outras seis proteínas recombinantes (ESAT6, CFP10, TB10.4, MTSP11, MPT70 e MPT83) que foram avaliadas e comparadas à resposta do TCT. Todas produziram reação positiva em teste intradérmico em indivíduos previamente sensibilizados com *Mtb* e essas proteínas são candidatas à formulação de reagentes para auxiliar no diagnóstico da tuberculose através da reação intradérmica, sendo uma possível alternativa ao TCT convencional.

Em estudos anteriores de avaliação da imunoreatividade de IgA -MT10.3 e -MPT64, individualmente, em líquido pleural de pacientes com TB pleural, foi evidenciado uma sensibilidade moderada (72%). Ao combinar os resultados de ambos os Ags, houve um pequeno aumento na sensibilidade (76%), confirmando que os coquetéis

antigênicos são úteis para o imunodiagnóstico (Kaisermann⁹¹ *et al.*, 2010). Estes achados levaram à construção de uma quimera protéica contendo a fusão de ambas proteínas, MT-10.3:MPT64 (F1). O teste de ELISA IgA-F1 mostrou aumento da sensibilidade (81,4%) e alta especificidade (95,5%) em relação às proteínas isoladas, na detecção de casos paucibacilares de TB pleural (Araújo⁸ *et al.* 2010). Recentemente, estes resultados foram confirmados e validados, assegurando que ensaios com esta quimera têm potencial diagnóstico na TB pleural (da Silva⁹ *et al.* 2019). Assim, no presente estudo propõe-se investigar em soro de indígenas com TB pulmonar se as proteínas PPE59 e F1 seriam TPP sensíveis e/ou específicos na detecção de IgA para auxiliar no diagnóstico da TB desta população negligenciada.

1.2. Justificativa

Ainda não há perspectiva de obter, em futuro próximo, a eliminação da TB como problema de saúde pública, a não ser que novas vacinas e/ou medicamentos e/ou políticas públicas efetivas, de melhorias das condições sociais, econômicas e sanitárias das populações vulneráveis, sejam desenvolvidas a médio prazo. Assim, o principal desafio para o controle da TB é a identificação precoce do indivíduo doente e o seu imediato e completo tratamento, quebrando a cadeia de transmissão, já que a propagação da doença ocorre pessoa a pessoa (Brasil⁷¹, 2011).

A população indígena tem duas vezes mais chances de desenvolver TB quando comparado aos não-índios, isto reforça as buscas por marcadores para uso em testes diagnóstico prático, rápido, não baseados no espécime do escarro e de fácil operacionalidade, definido pela OMS como TPP e com potencial para formato POC, e os testes sorológicos se adequam a estas características.

Segundo alguns estudos, a população indígena apresenta suscetibilidade imunológica diferenciada em relação à população em geral (Sousa¹⁰¹ *et al.*, 1997; Hurtado- Guerrero¹⁰², 2003; Basta *et al.*, 2006a), podendo favorecer a instalação de doenças infecciosas. A elevada transmissão de TB entre os indígenas pode ser explicada ainda pelas barreiras linguísticas, geográficas e culturais que levam a um diagnóstico tardio da TB e que, por sua vez, resultam na identificação tardia de fontes de transmissão dentro da comunidade e em um aumento do risco de novos casos (Tollefson¹⁰³ *et al.*, 2013). Fatores de ordem sociocultural têm sido associados à baixa eficácia de programas

de controle da TB (Rubel & Garro¹⁰⁴, 1992). Em Mato Grosso, foi evidenciado que, embora a cultura do povo Xavante não seja impeditiva para a execução das ações de controle da TB, como exames diagnósticos, vacinação e tratamento quimioterápico, a precariedade da oferta de serviços de saúde nas comunidades indígenas tem comprometido a detecção precoce e tratamento adequado de novos casos da doença (Welch & Coimbra¹⁰⁵, 2011).

A pesquisa de Ac para o diagnóstico da TB recuperou seu espaço nos últimos anos e estudos têm evidenciado o importante papel da resposta imune humoral na infecção por *Mtb*. Até o momento, apesar dos vários kits comerciais elaborados, nenhum deles contém marcadores cuja acurácia seja adequada para auxiliar no diagnóstico da TB. Portanto, explorar novos marcadores do patógeno que sejam reconhecidos por biomarcadores do hospedeiro, primários a infecção por *Mtb*, continua uma estratégia viável. Entretanto, em se tratando de TB, não se espera um marcador absolutamente específico, mas que componha um teste que possa excluir doença ou ter um perfil de triagem, é um avanço necessário no diagnóstico.

No presente estudo será avaliada a imunoreatividade do biomarcador IgA de soro humano à PPE59, e a uma construção genética, composta da fusão dos genes *rv3019c:rv1980c*, que codificam a quimera proteína F1 (MT10.3:MPT64), específicas de *Mtb*, em pacientes TB de etnias indígenas.

2. HIPÓTESE DO ESTUDO

Devido às diferenças imunológicas no reconhecimento de *Mtb*, os antígenos PPE59 e a fusão protéica F1 (MT10.3:MPT64) podem ser reconhecidos pelo biomarcador IgA e contribuir no diagnóstico da TB pulmonar nesta população.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar o biomarcador IgA de soros de pacientes indígenas com tuberculose no reconhecimento dos marcadores micobacterianos proteicos únicos ou modificados, como a PPE59 e F1.

3.2. Objetivos específicos:

- a) Expressar as proteínas PPE59 e F1 a partir de clones existentes e parametrizar as condições no reconhecimento de IgA por teste imunoenzimático
- b) Determinar a sensibilidade e a especificidade de teste imunoenzimático
- c) Estabelecer a razão de verossimilhança e os valores preditivos para os testes de IgA-PPE59 e -F1
- d) Correlacionar a reatividade de IgA-PPE59 e -F1 com as características demográficas e laboratoriais da população estudada

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudo

Estudo transversal, observacional, de avaliação da imunoreatividade da IgA frente à proteína única PPE59 e a quimera protéica específicas de *Mtb* (F1), em amostras de soro de pacientes com TB e de indivíduos sadios de etnias distintas, utilizando a técnica do ELISA.

4.2. Considerações éticas

O sangue dos indivíduos foi coletado após consentimento formal, livre e esclarecido antes do início de qualquer procedimento, tendo a aprovação do comitê de ética em pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – CEP/ENSP (N.192/11)

4.3. Local do estudo

A captação das amostras de soros envolvidas no estudo foi realizada na reserva indígena de Bororo e Jaguapiru, Município de Dourados, MS, região centro-oeste do Brasil (Figura 6), pela equipe do Dr. Julio Henrique Croda, Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD – Unidade 2), Dourados, MS, no período entre 2011 a 2013, dentro do projeto “Resposta imunológica à tuberculose em populações etnicamente distintas no município de Dourados – MS”. Amostras de conveniência de soros de pacientes diagnosticados com TB neste estudo foram encaminhadas para a soroteca do Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz, onde foram mantidas alíquotadas e estocadas. A Reserva de Bororo e Jaguapiru fica em uma área de Mata Atlântica, onde vivem aproximadamente 15025 indígenas, composta por três povos e duas etnias: Guarani Ñandeva e Guarani Kaiowá, segunda maior etnia da população indígena do Brasil, e Terena. A aldeia, com uma área de aproximadamente 3,5 mil hectares é próxima à cidade e é cortada por uma rodovia (MS 156), que liga Dourados ao município de Itaporã, o que aproxima os índios dos não-índios (terrasindigenas.org¹⁰⁶) (Figura 5).



Figura 5: Imagem de satélite com o perímetro parcial da Reserva onde se localiza a aldeia indígena de Bororo e Jaguapiru, Dourados, MS, Brasil. Disponível: Google.

4.4. Amostragem

Foram enviados ao nosso laboratório 120 soros arrolados no período do estudo (Fig.7), onde para cada paciente diagnosticado com TB foi incluído dois controles constituídos de indivíduos sadios com contato domiciliar ou social recente e próximo de pacientes TB (HCC), pareados em sexo e idade (Figura 6). Todos os soros foram codificados independentemente da apresentação clínica dos pacientes. As principais características demográficas, clínica e laboratoriais nos foram enviadas em planilha pela equipe do Dr. Julio Henrique Croda do LPCS/UFGD, MS.

4.4.1 Critérios de inclusão

Pacientes com tuberculose confirmada por cultura⁺ e/ou SM^{+/-}, formando o grupo tuberculose ativa e indivíduos com cultura⁻ e SM⁻, formando o grupo HCC.

4.4.2 Critérios de exclusão

Amostras duplicadas de pacientes com tuberculose.

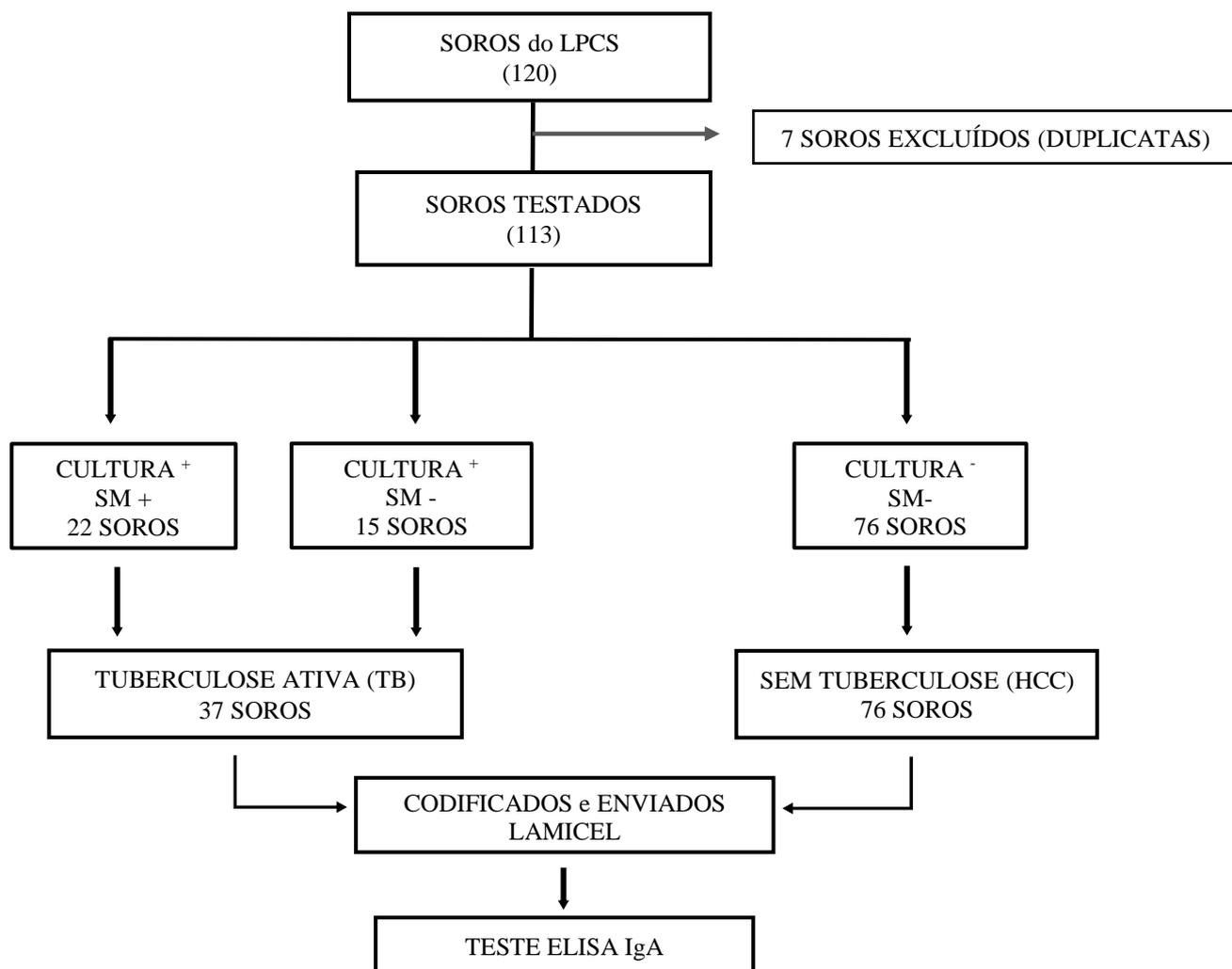


Figura 6: Fluxograma dos soros de indígenas enviados ao Laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL)/IOC/FIOCRUZ agrupados em tuberculose ativa (TB) e contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC) testados. LPCS: Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde/Univ. da Grande Dourados, MS. SM: microscopia direta de escarro corados pelo método de Ziehl-Neelsen para detecção de bacilos álcool ácido resistentes. ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*.

4.5. Purificação das proteínas PPE59 e F1

Os clones de *Escherichia coli* contendo os genes fusionados codificantes da quimera protéica F1 (MT10.34:MPT64), assim como da PPE59, estocados em nosso laboratório, foram utilizados para os procedimentos de expressão protéica que seguiu o protocolo estabelecido por Araújo⁸ *et al.* para F1 e por Mulinari⁶ para a PPE59.

4.5.1- Cultivo do clone de *Escherichia coli* (Dh5 α) contendo a proteína recombinante PPE59 e sua purificação

Para a purificação da proteína, células de *E. coli* (Dh5 α) contendo o plasmídeo-inserto recombinante, isto é, a sequência alvo (pQE80L:PPE59), foi cultivada em 10ml de meio Luria Bertani (LB) contendo 100ug/ml de ampicilina, a 37°C por 22 horas sob agitação a 200 rpm (CT 712-R, Cientec, Belo Horizonte – MG, Brasil). No dia seguinte, a cultura foi transferida para um frasco Erlenmeyer com 500 ml de meio LB e incubada a 37°C, sob agitação de 200 rpm, até se obter crescimento correspondendo a turvação em densidade ótica (DO₆₀₀) de 0,6 (Amersham Pharmacia Ultrospec 3100 Pro, GE Healthcare, EUA). Uma alíquota de 1ml foi então retirada da suspensão antes da indução com isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (controle sem indução) e centrifugado. Seguindo-se a indução com IPTG por 3 horas, como estabelecido previamente, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos (Centrifuga Sorvall ST16R [TX-400], ThermoScientific, EUA). O *pellet* celular foi armazenado a -20C até a etapa de lise bacteriana.

4.5.2- Lise bacteriana em condições desnaturantes

A massa celular obtida após a centrifugação da cultura bacteriana foi descongelada por 15 minutos, no gelo, e ressuspendidas em tampão B de lise (100mM NaH₂PO₄; 10mM de Tris base; 8M de Uréia, pH= 8,0) para um volume de 5 ml por grama do peso celular. Em seguida, foram adicionados 0,1M PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) e 20mM de betamercapto-etanol, com incubação de 1 hora sob leve agitação e em temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e guardado a 4°C para o processo de purificação por cromatografia de afinidade com resina de níquel.

4.5.3- Purificação da PPE59 através da cromatografia de afinidade com resina de níquel

O volume de 1 ml de resina His Link Protein Purification (www.promega.com) foi adicionado a 10 ml de água milli Q estéril em tubo Falcon de 15ml. Após homogeneização, o tubo foi deixado em temperatura ambiente até a sua completa

decantação. Após a retirada da água foram adicionados 10ml de tampão B, e homogeneizado. O tampão B de lise foi removido e o sobrenadante foi adicionado à resina e incubado por uma hora sob agitação a 4°C. No gelo, a solução foi então depositada na coluna de eluição e, após a passagem do sobrenadante na coluna, a resina foi lavada com tampão de lavagem (100mM NaH₂PO₄; 10mM de Tris base; 8M de Ureia, 5 mM de imidazol, pH= 6,0) até completar 15 ml. Em seguida, as proteínas foram eluídas com tampões de eluição com 4 diferentes concentrações de ureia-imidazol. Em cada etapa de eluição foram utilizados 3ml dos tampões, i) 100mM NaH₂PO₄; 10mM de Tris base; 8M de Ureia, 5 mM de imidazol, pH= 8, ii) 100mM NaH₂PO₄; 10mM de Tris base; 8M de Ureia, 20 mM de imidazol, pH= 8, iii) 100mM NaH₂PO₄; 10mM de Tris base; 6M de Ureia, 100 mM de imidazol, pH= 8, iv) 100mM NaH₂PO₄; 10mM de Tris base; 4M de Ureia, 250mM de imidazol, pH= 8. Cada um dos eluatos foram armazenados a -20°C até serem resolvidos em gel de SDS-PAGE para determinar em qual eluato a proteína recombinante seria purificada.

1.2.3.1- SDS-PAGE (gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio)

O gel de poliacrilamida foi preparado (acrilamida 12%, TRIS 1,5M, SDS 0,1%, persulfato de amônio [APS] 0,05% e TEMED). Após a aplicação da solução de acrilamida entre as placas de vidro, com isolamento do ar atmosférico utilizando isopropanol para uma melhor polimerização, o material foi deixado em repouso à temperatura ambiente até a sua solidificação. Após a retirada do isopropanol, cujos resíduos foram absorvidos usando papel filtro, ocorreu a aplicação do gel de empilhamento (acrilamida a 3%, TRIS 1,5M, SDS 0,1%, APS 0,076%, TEMED).

As amostras foram preparadas para aplicação no gel de poliacrilamida, através da adição de tampão de amostra (0,5M TRIS-Cl; 20mM DTT; 4% SDS, 0,2% ABF, 20% glicerol); antes da aplicação, as amostras (30µl) foram fervidas por 3 minutos. Após aplicação das diferentes alíquotas nos poços do gel, a eletroforese foi realizada em tampão de corrida (0,1% SDS; 250mM glicina; 25 mM TRIS, pH= 8,3), utilizando cuba vertical de proteína (BIORAD, Califórnia, EUA) na voltagem de 120V. O tempo de corrida foi estimado de acordo com a saída do tampão de amostra do gel. Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de azul de Coomassie (Coomassie brilliant Blue R-250 – ThermoScientific, EUA, 50% de Metanol, 10% de ácido acético) por no mínimo 30

minutos, sendo em seguida descorado com uma solução descorante (metanol 40%, ácido acético 10%). Os géis foram guardados em água destilada até serem digitalizados.

4.5.4- Diálise da PPE59 purificada

Após a confirmação da proteína purificada, os eluatos foram submetidos ao processo de diálise, em membranas de 16 mm (SnakeSkin, ThermoScientific, EUA), para separar as proteínas de pequenas partículas e solutos que possam degradar a proteína. Primeiramente, as membranas foram cortadas de acordo com o volume de cada eluato purificado. As membranas foram mergulhadas em 4.400 ml de tampão de diálise PBS 0,25x (137mM NaCl; 2,07mM KCl; 10mM Na₂P0₄; 1,8mM KH₂P0₄), após serem vedadas em uma de suas extremidades com clips e os eluatos aplicados pela outra extremidade e vedado com clip. Foram então deixadas sob leve agitação por 22 horas a 4°C, ao término os eluatos foram transferidos para um tubo para a quantificação protéica.

4.5.5- Cultivo do clone de *Escherichia coli* BL21-DE3 contendo a proteína recombinante F1 para a purificação

Para a purificação da proteína, células de *E. coli* BL21-DE3 contendo o plasmídeo-inserto recombinante, isto é, a sequência MT10.3:MPT64-pQE80L, seguiu-se a mesma metodologia descrita no item 4.2.1, com pequena modificação, a indução com IPTG foi feita por 4 horas. A cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos e as células foram armazenadas a -20C até a etapa de lise bacteriana.

4.5.6- Lise bacteriana de *Escherichia coli* BL21-DE3

As células foram descongeladas em gelo e ressuspensas com 20 ml de tampão KTE (50 mM Tris pH 8, KCl 100 mM, EDTA 1 mM) e homogeneizadas por 38 minutos em agitador tipo gangorra (Tube Rocker – TTR200, Único, EUA). Em seguida, foram adicionados 1 mM PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) e 20mM de betamercapto-etanol, e submetidas a sonicação durante 8 min (pulso ligado, 1 min; pulso desligado, 1 min; amplitude, 40%) em gelo, para o rompimento das células. O lisado foi centrifugado a 17.000 rpm durante 15 min a 4°C, o sobrenadante foi guardado a 4°C e o sedimento

contendo a proteína de fusão recombinante insolúvel (com corpos de inclusão) foram ressuspensas com 20 ml do tampão KTE. Após incubação de 30 min sob agitação, a suspensão foi lavada por quatro vezes com tampão KTE a 17.000 rpm, cada vez, durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi armazenado a 4°C e o *pellet* celular congelado *overnight*.

4.5.7- Purificação da F1

O *pellet* foi descongelado, em gelo, ressuspensão com 20 ml de tampão KTE e centrifugado a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C, por 2 vezes. O sobrenadante foi estocado a 4 °C e o *pellet* foi ressuspensão com 20 ml em tampão de ressuspensão (Tris 20 mM pH 8,0, EDTA 2,5 mM, imidazol 5 mM, Triton X-100 a 1%) e centrifugado a 17.000 rpm durante 10 min a 4°C por 2 vezes. O sobrenadante foi estocado a 4 °C e o *pellet* foi incubado por 30 min em temperatura ambiente com 20ml do tampão de solubilização (N-laurilsarcosina a 0,3%, 50mM ácido N-ciclo-hexil-3-aminopropanosulfônico [CAPS] pH 11, 1 mM ditioneitol [DTT]), e em seguida de centrifugado a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. Este processo foi repetido aumentando o tempo de incubação para 1 hora, mantendo os mesmos tempos de centrifugação. Os sobrenadantes foram estocados a 4°C e o *pellet* a 20 °C.

4.5.8- Diálise da F1 purificada

Os sobrenadantes estocados anteriormente foram dialisados como no item 4.2.4, com pequena modificação: o tempo de diálise foi de 3 horas, com troca de tampão por 2 vezes, e em seguida mantida a diálise *overnight* a 4°C, sob agitação. No dia seguinte, os eluatos foram transferidos para um tubo para a quantificação protéica.

4.5.9- Quantificação das proteínas PPE59 e F1

Foi utilizado o kit colorimétrico “Coomassie plus” (Coomassie Plus: The Better Bradford; Pierce, Rockford, IL), que é baseado no método que foi descrito pela primeira vez pelo Dr. Marion Bradford em 1976. Modificações foram introduzidas para reduzir a tendência dos reagentes do Coomassie de gerar curvas de resposta não linear por formulação, melhorando a linearidade dos intervalos definidos da concentração da

proteína. A reação foi realizada em microplacas de poliestireno (Nunc, flat bottom immunoplate C96 Maxisorp, Thomas Sci, EUA). Cinco microlitros de cada amostra e de cada padrão foram depositados nos respectivos poços da microplaca e 250µl do reagente Coomassie plus foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada sob agitação a 30 rpm (shaker orbital, Optronic instrumentos científicos, Brasil) por 30 segundos e depois deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 595nm (Labsystems Multiskan MS Plate Reader, EUA). Os valores dos padrões foram usados para construção da curva padrão e para a obtenção da concentração protéica das preparações obtidas.

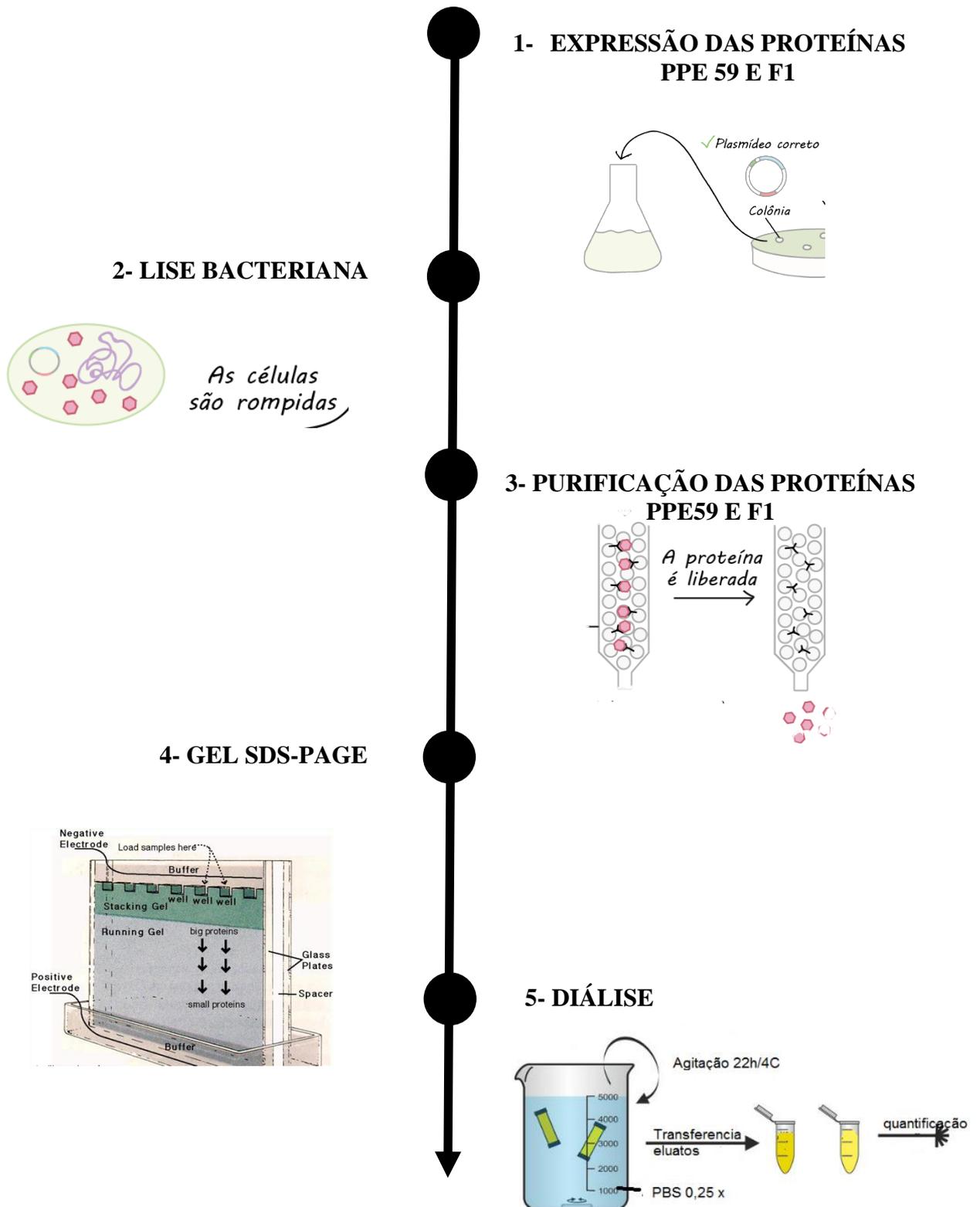


Figura 7: Fluxograma dos processos de expressão e purificação das proteínas PPE59 e F1. Adaptado de: khanacademy.org e chemistry.gatech.edu.

4.6. Padronização do ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) in house

Foram utilizadas microplacas para ELISA (Nunc, flat bottom immunoplate C96 Maxisorp, Thomas Sci, EUA). Nos respectivos poços da placa, foram adicionados 50µL dos antígenos proteicos (PPE59 ou F1) em tampão carbonato-bicarbonato pH = 9,6 (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 15mM), nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0 e 1,5µg/ml. Após a incubação a 37°C por duas horas, a microplaca foi lavada 3 vezes com 200µl PBSt 0,01% pH= 7,4 (Na₂HPO₄ 90mM, NaH₂PO₄ 18,98mM, NaCl 9,92mM, 0,01% Tween 20). Em seguida, foram adicionados a cada poço 100µL da solução de bloqueio PBSt-BSA 5% (bovine sérum albumin, Fraction V, Sigma Aldrich, EUA) e a microplaca foi incubada a 37°C por 2 horas. Após lavagem, como descrito acima, foram adicionados, nos respectivos poços, 50µL de pool de soros de pacientes com TB (positivo), contendo 10 soros de diferentes pacientes ou de pool de soros (negativo) de indivíduos não TB, contendo 09 soros de diferentes indivíduos contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC), diluídos seriadamente de 1:50 a 1:1600 em PBSt-BSA 1% e incubados a 37°C por 1 hora. Posteriormente à lavagem, foram aplicados 50µL dos conjugado de cabra anti-IgA humana-HRP (horseradish peroxidase, Kappel, EUA), diluídas a 1:4.000 a 1:16.000 em PBSt-BSA 1%, e incubado por 1 hora a 37°C. Após a lavagem e adição de 50µL da solução de substrato TMB (3,3',5,5' – tetrametilbenzidina, Thermo Scientific, EUA), a placa foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação colorimétrica foi interrompida com 50µl de H₂SO₄ a 2,5N. A placa foi lida na absorbância de 450nm em leitor de ELISA (Elx800 Absorbance Microplate Reader, Biotek, Vermont, EUA).

Os resultados dos testes foram expressos em densidade ótica (DO). Em cada placa, existiu um poço controle branco, cuja DO não ultrapassou a 100. Em caso contrário, foi indicativo de erro operacional, sendo o teste repetido. Para minimizar as variações na DO dos *pools* por sucessivos congelamentos e descongelamentos, foram feitas alíquotas em pequenos volumes, de modo que cada alíquota não foi utilizada mais de três vezes. Todos os testes foram realizados em duplicata, com valores que não deveriam exceder a 15% do valor médio das duplicatas; em caso contrário, o teste foi repetido. A melhor concentração do antígeno, das diluições de conjugados e de espécime clínico foram determinadas. Após padronização das variáveis do teste, os soros, componentes dos respectivos *pools*, bem como o restante da amostragem foram testados individualmente. Em todas as placas foram adicionados *pools* positivos e negativos para servir como controle das placas nos testes realizados no mesmo dia ou em dias diferentes.

4.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram efetuadas usando os programas SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 20.0 e Graphpad Prism versão 6.0 para Windows. Para os ensaios de padronização, os resultados foram avaliados em média \pm desvio padrão e a fim de comparar as distribuições entre os *pools* de TB e HCC para escolha de melhor resultado a ser utilizado no estudo foi realizado o teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$ foi considerado significativo. A imunorreatividade da proteína PPE59 e F1 foi identificada através de densidade óptica e foram descritas em medianas + interquartil. Para as análises com as variáveis demográficas e clínicas, a imunorreatividade através de densidade óptica foi descrita em médias \pm desvio padrão.

A positividade dos antígenos PPE59 e F1 para IgA foi calculada através da Curva ROC (*receiving operating characteristic*) para obtenção dos melhores pontos de corte (*cut off*) para os testes, que serão representados em um gráfico. A curva foi construída utilizando o grupo TB (sensibilidade) e o grupo dos controles (especificidade). Quanto mais sensível um teste, maior seu valor preditivo negativo, ou seja, possui uma segurança de que a pessoa com teste negativo não tem a doença e quanto mais específico um teste, maior seu valor preditivo positivo, ou seja, possui uma segurança de que a pessoa com teste positivo tem a doença). A razão de verossimilhança (RV) combina sensibilidade e especificidade para calcular o quão útil um novo teste diagnóstico é para aumentar ou diminuir a probabilidade de ter uma doença na população estudada. A RV^+ é a probabilidade de um resultado positivo em pacientes com a doença dividida pela probabilidade de um resultado positivo em pacientes sem a doença, e a RV^- é a probabilidade de um resultado negativo em pacientes com a doença dividida pela probabilidade de um resultado negativo em pacientes sem a doença.

A RV^+ varia de 1 a infinito, e uma $RV^+ = 1$ indica que a probabilidade de resultado positivo do teste é a mesma para pacientes com e sem a doença; portanto, o teste é inútil. $RV^+ > 1$ corrobora a presença da doença; assim quanto maior a RV^+ , maior será a probabilidade do resultado positivo do teste aumente a probabilidade de doença se o resultado do teste for positivo. A RV^- varia de 1 a 0, e quanto mais próxima de 0 a RV^- for, menor será a probabilidade de doença na presença de resultado negativo do teste.

Para comparar as diferenças das frequências de positividade obtidas nos diferentes grupos foram realizados testes não paramétricos, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para avaliar a significância dos resultados obtidos e $p \leq 0,05$ foi considerado significante.

5. RESULTADOS

5.1. Purificação das proteínas PPE59 e F1

Para a expressão da PPE59 a colônia contendo a sequência do gene alvo foi induzida em meio de cultura de acordo com o protocolo proposto (metodologia item 4.5.1). A liberação da proteína do *pellet* celular foi realizada em condições desnaturantes (ureia 8M). Para eluição da proteína PPE59 foram aplicados tampões de diferentes concentrações de uréia-imidazol, e a liberação da resina, sem corpos de inclusão, com o peso molecular esperado (21 kDa), ocorreu no eluato contendo 6M de ureia e 100mM de imidazol, visualizada pela técnica de SDS-PAGE (Figura 8).

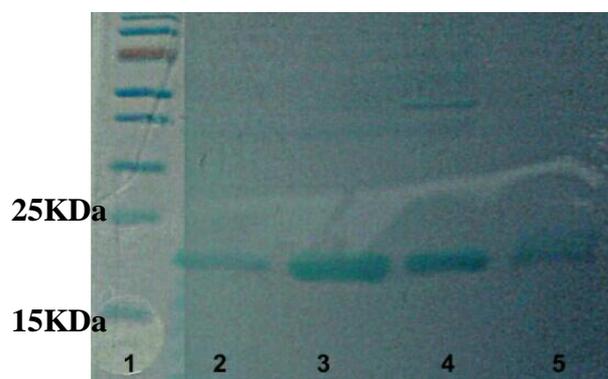


Figura 8: Identificação da proteína PPE59 purificada através do gel SDS-PAGE (gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio). Colunas: 1- Marcador de peso molecular (kDa) prestained proteína Ladder. 2, 3, 4 e 5- Eluatos da proteína PPE59 purificada (21kDa).

Para a expressão da F1, a colônia contendo a sequência do gene alvo foi induzida em meio de cultura de acordo com o protocolo proposto (metodologia item 4.5.5). A liberação da proteína do *pellet* celular foi realizada por sonicação. À F1, que contém corpos de inclusão, foi adicionado o tampão KTE, e para recuperar a forma bioativa da proteína foi necessário solubilizá-la utilizando o tampão de ressuspensão (Tris 20 mM, EDTA 2,5 mM, imidazol 5 mM, Triton X-100 a 1%) e solubilização (N-laurilsarcosina a 0,3%, 50mM CAPS, 1 mM DTT). A liberação da proteína, com o peso molecular esperado (36 kDa), ocorreu no tampão de ressuspensão II e solubilização II, visualizada pela técnica de SDS-PAGE (Figura 9).

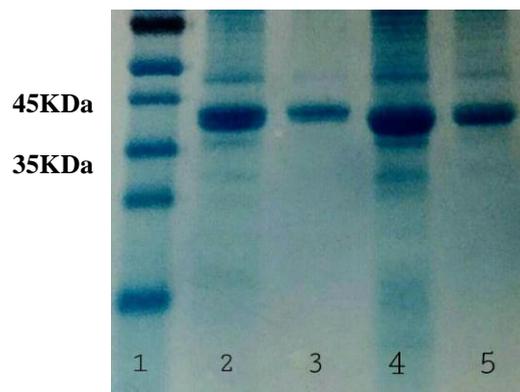


Figura 9: Identificação da proteína F1 (MT10.3:MPT64) purificada através do gel SDS-PAGE (gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio). Coluna 1: Marcador de peso molecular (kDa) prestained proteína Ladder, 2 - Eluato do processo de purificação em tampão de ressuspensão I, 3 – Eluato com F1 purificada em tampão de ressuspensão II, 4- Eluato do processo de purificação em tampão de solubilização I 5- Eluato com F1 purificada em tampão solubilização II.

5.2. Características da população do estudo

Entre os 113 indígenas, que foram avaliados quanto à presença da IgA do soro reativa às proteínas PPE59 e F1, 37 indivíduos apresentavam a forma clínica da TB pulmonar e eram HIV negativos. Poucas comorbidades foram notificadas: 5 indivíduos eram portadores de hipertensão e 1 de diabetes *mellitus*. O grupo controle consiste em indivíduos saudáveis, sem sintomas respiratórios, que moravam em residências próximas à dos pacientes com TB e que eram seus contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC).

A Tabela 1 resume as principais características clínicas, demográficas e laboratoriais dos participantes do estudo. A maioria dos pacientes com TB e os HCC é do sexo masculino (62,2% e 61,8 %, respectivamente, $p=0,99$), e apresentam idade média sem diferença significativa (34,7 e 34,9; $p=0,98$ respectivamente). Entre os indivíduos com idade variando entre 9 a 17 anos, 6 eram TB e 2 HCC. Já os indivíduos idosos, com idade entre 65 a 84 anos, dois eram TB e seis HCC. A maioria dos pacientes declararam não ser tabagista ou ter hábito de ingerir álcool (83,8 %). A cicatriz vacinal (BCG) foi observada em apenas 48,6 % dos pacientes TB e a maioria (12/18) encontrava-se abaixo da idade média da população testada. Todos os pacientes com sintomas de TB (97,3%) apresentaram cultura positiva para *Mtb*, exceto um por contaminação da cultura. Já a baciloscopia do escarro, para visualização de BAAR diretamente no escarro, foi positivo em apenas 59,5% dos pacientes. A etnia Guarani Kaiowá contribuiu com a maioria dos pacientes com TB (67,5%). Apenas seis pacientes não possuíam etnia notificada.

Tabela 1: Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos 113 indivíduos incluídos no estudo, cujos soros de conveniência foram testados.

Características	Número (%)		<i>p</i> valor
	TB	HCC	
Número	37 (33)	76 (67)	
Idade média ± desvio padrão	34,7 ± 17,2	34,9 ± 16,9	0,98
> 34 anos	14 (37,8)	30 (39,4)	0,68
< 34 anos	23 (62,2)	40 (52,6)	
Sem informações		6 (8)	
Sexo			
Feminino	14 (37,8)	29 (38,2)	0,99
Masculino	23 (62,2)	47 (61,8)	
Etilismo	7 (18,9)	NI	
Tabagismo	6 (16,2)	NI	
Marca BCG	18 (48,6)	NI	
Etnia			
Terena	5 (13,5)	NI	
Guarani Ñandeva	1 (2,7)	NI	
Guarani Kaiowá	25 (67,5)	NI	
Sem informação étnica	6 (12,3)	NI	
Microscopia de escarro			
Positivo	22 (59,5)	-	
Negativo	15 (40,5)	76/76 (100)	
Cultura			
Positivo	36 (97,3)	-	
Negativo	1 [#] (2,7)	76/76 (100)	

NI: não informado; N (%): número e porcentagem; TB: pacientes com tuberculose pulmonar confirmada; HCC: contatos sadios, recentes e próximos de pacientes com TB; #: cultura contaminada.

5.3. Padronização do ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) in house

Para avaliar o reconhecimento da proteína recombinante PPE59 pela IgA de soro humano, inicialmente foi realizada a padronização do teste de ELISA *in house* utilizando diluições seriadas de *pool* de soros positivos ou negativos de 1:100 a 1:800 (Figura 10). O antígeno foi diluído nas concentrações de 0,5 µg/ml e 1,0 µg/ml; e o conjugado anti-IgA humana-HRP foi testado nas diluições seriadas de 1:4.000 a 1:16.000.

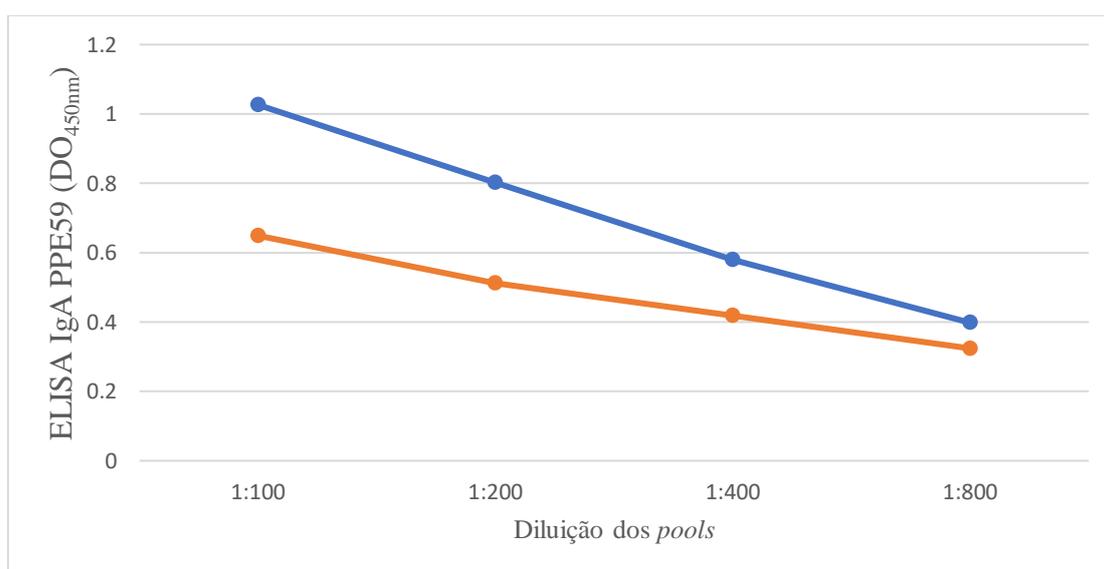


Figura 10: Parametrização do ELISA IgA PPE 59 (0,5 µg/ml) em pools de soros de pacientes indígenas com tuberculose (TB) e HCC (contatos sadios, recentes e próximos de pacientes com TB). (●) TB; (●) HCC. Resultados expressos em densidades óticas (DO₄₅₀).

O mesmo processo de padronização do ELISA-IgA *in house* para a quimera fusionada F1 foi realizado utilizando diluições seriadas de *pool* de soro de pacientes com TB pulmonar (*pool* positivo) e com *pool* de soro de indivíduos sadios com contatos sociais recentes e próximos (*pool* negativo) de 1:50 a 1:1.600 (Figura 11). O antígeno foi testado nas concentrações de 0,25 µg/ml, 0,5µg/ml, 1,0 µg/ml e 1,5 µg/ml e o conjugado anti-IgA humana-HRP foi ensaiado nas diluições seriadas de 1:2.000 a 1:16.000.

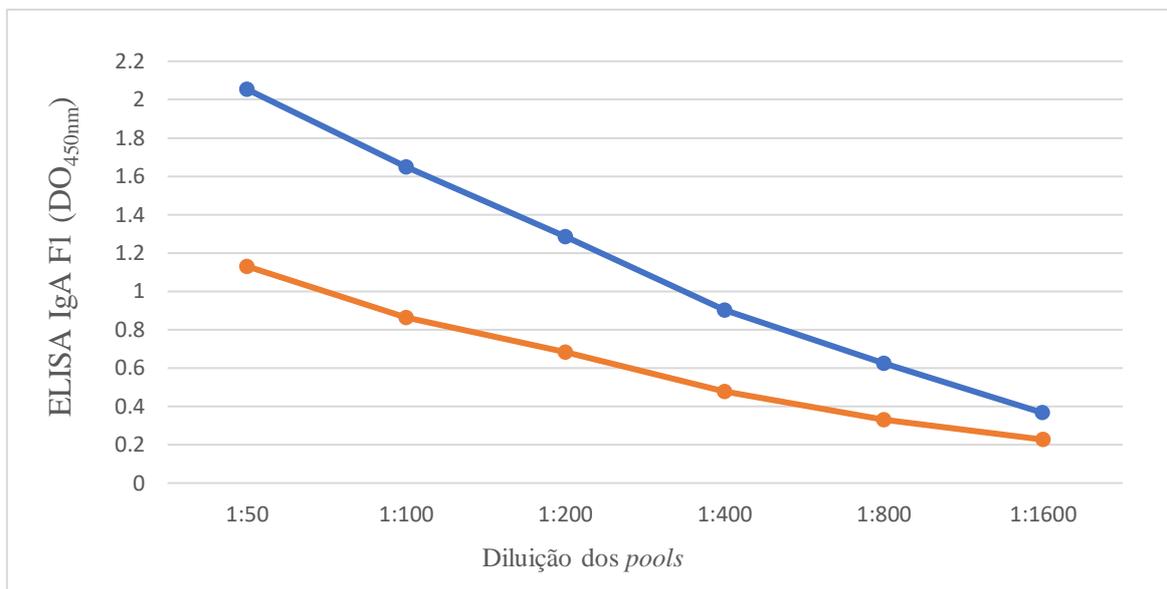


Figura 11: Parametrização do ELISA IgA F1 (0.5 µg/ml) em pools de soros de pacientes indígenas com tuberculose (TB) e HCC (contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB). (●) TB (●) HCC. Resultados expressos em densidades óticas (DO₄₅₀).

A melhor reatividade de IgA do pool de soros TB pulmonar para PPE59 foi obtida na diluição de 1:100 (DO: 1,026) onde diferenciou significativamente ($p < 0,05$) do pool de negativo (DO: 0,649), com o Ag na concentração de 0,5 µg/ml e conjugado diluído a 1:8000 (Figura 10 e Tabela 2). Já para F1 a melhor reatividade de IgA do pool positivo foi obtida na diluição de 1:100 (DO: 1,649) que mostrou uma diferença significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao pool negativo (DO: 0,863), com o Ag na concentração de 0,5 µg/ml e conjugado diluído a 1:4000 (Figura 11 e Tabela 2)

Tabela 2: Condições definidas na padronização do teste de ELISA para imunoglobulina A para os antígenos (Ag) PPE59 e F1.

	Ag	
	PPE59	F1
Diluição do Ag(µg/ml)	0,5	0,5
Diluição do soro	1:100	1:100
Diluição do conjugado	1:8000	1:4000

Ag: antígeno; µg/ml: micrograma por mililitro.

5.4. Resultados quantitativos do ELISA IgA anti as proteínas PPE59 e F1 com os soros individualizados

As medianas obtidas no ELISA IgA anti PPE59 e F1 foram significativamente maiores no grupo TB (0,88 e 0,98) quando comparadas ao grupo HCC (0,64 e 0,53; $p=0,05$ e $p=0,0001$; respectivamente) (Tabela 3 e Figura 12).

Tabela 3: Resultados quantitativos do reconhecimento da imunoglobulina IgA reativa às proteínas PPE59 e F1 em pacientes com tuberculose (TB) e contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC).

Grupos	N°	DENSIDADE ÓTICA	
		ELISA-IgA	
		PPE59	F1
		Mediana [interquartil]	
TB	37	0,88* [0,62-1,04]	0,98*** [0,71- 1,2]
HCC	76	0,64 [0,53-0,83]	0,53 [0,42-0,66]

TB: indivíduos com tuberculose confirmada; HCC: (contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB). * $p<0,05$: grupo TB vs HCC (PPE 59); *** $p<0,0001$: grupo TB vs HCC (F1). Resultado expressos em densidade ótica (DO_{450}).

No grupo TB, para ambos os testes, houve maior dispersão das reatividades. Foram identificados 5 soros, no grupo HCC, com reatividade elevada para ambas as proteínas (Figura 12), nenhuma característica em comum foi identificada entre esses indivíduos. Essas reatividades elevadas podem sugerir que há um risco aumentado de progressão pra doença, onde os indivíduos podem estar latentemente infectados ou em um outro espectro da TB.

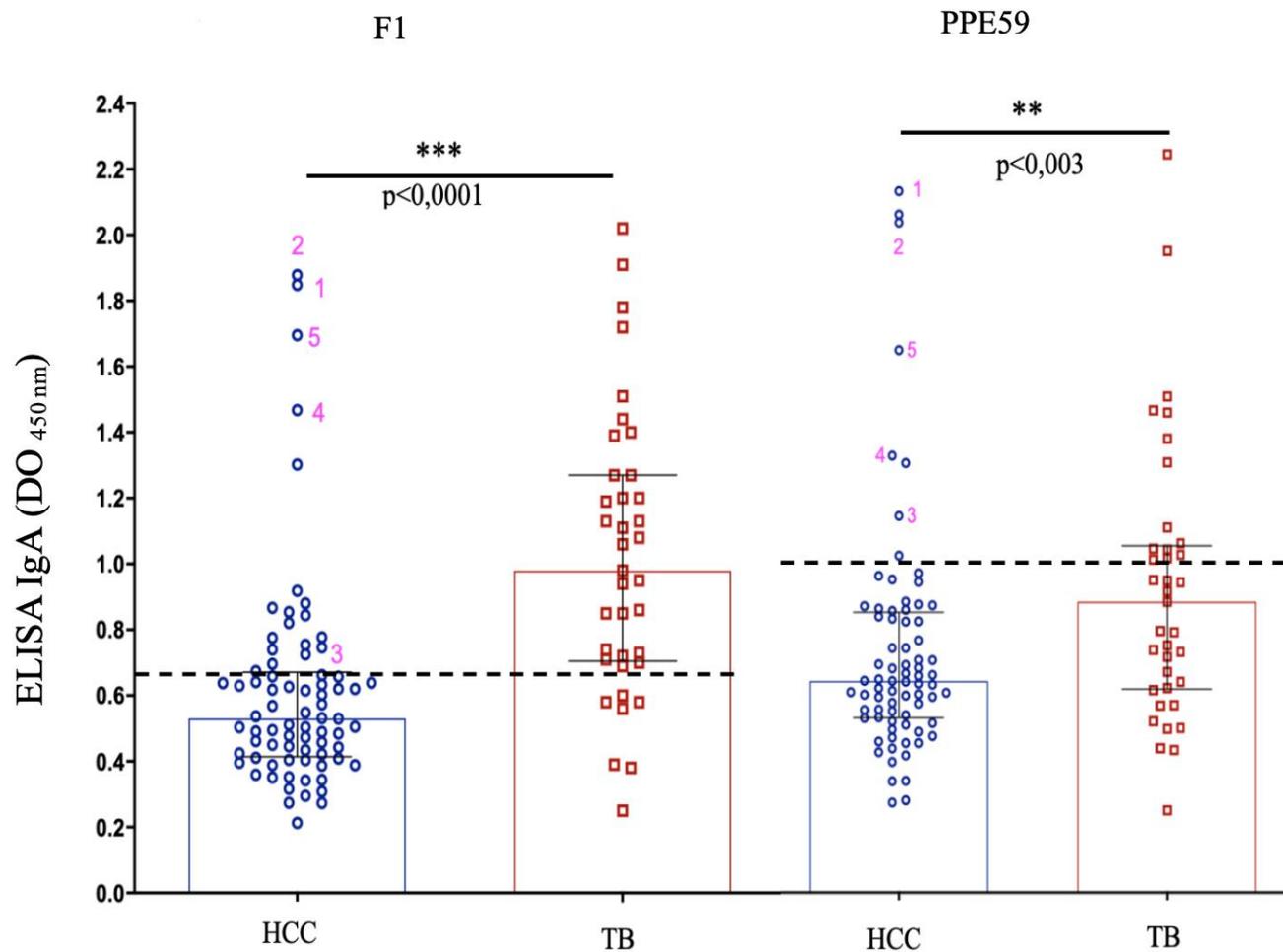


Figura 12: Distribuição individual dos soros em teste imunoenzimático (ELISA), da reatividade da imunoglobulina IgA às proteínas F1 ou PPE59 em participantes com tuberculose pulmonar (TB) e contatos saudios, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC). Números: soros com reatividade elevada para ambos os antígenos; Linha tracejada: ponto de corte (cut off)

Estudos têm mostrado que vários antígenos são melhor reconhecidos pela resposta imune entre os pacientes TB com maior carga bacilar. Assim, analisamos a reatividade média de IgA para os antígenos propostos, estratificando os pacientes TB em bacilíferos e não bacilíferos. Observou-se reatividade média de IgA mais elevada entre os SM⁺, porém com diferença significativa para o antígeno quimérico F1 ($p=0,0002$), mas não para o PPE59 ($p=0,075$) (Figura 13, Tabela 4).

Reatividade média, significativa, de anticorpos IgA foi observada entre os pacientes TB >34 anos relativo à idade dos HCC para ambos os antígenos ($p<0,001$). Para PPE59 a reatividade média dos pacientes TB <34 anos foi significativamente menor ($p=0,05$) entre os TB enquanto que para F1 não houve diferença de reatividade quanto a idade dentro de ambos os grupo, TB ou HCC ($p= 0,13$ vs $p= 0,43$), porém os pacientes TB <34 anos *versus* o HCC foi significativamente maior ($p<0,003$). Estratificando a população de estudo por sexo, a reatividade média de IgA PPE59 foi significativamente maior em TB do sexo feminino em relação ao grupo HCC de ambos os sexos ($p <0,001$). Porém, para IgA F1 TB ambos os sexos mostraram uma maior reatividade comparado com os HCC ($p<0,0002$). Os pacientes TB da etnia Guarani kaiowá apresentaram reatividade média maior do que as outras etnias juntas ($p<0,05$), para ambos os antígenos. As variáveis álcool, tabaco e cicatriz vacinal (BCG) estavam disponíveis apenas para os pacientes TB e não se observou diferença de reatividade média de Ac para ambos os Ag, no grupo (Tabela 4).

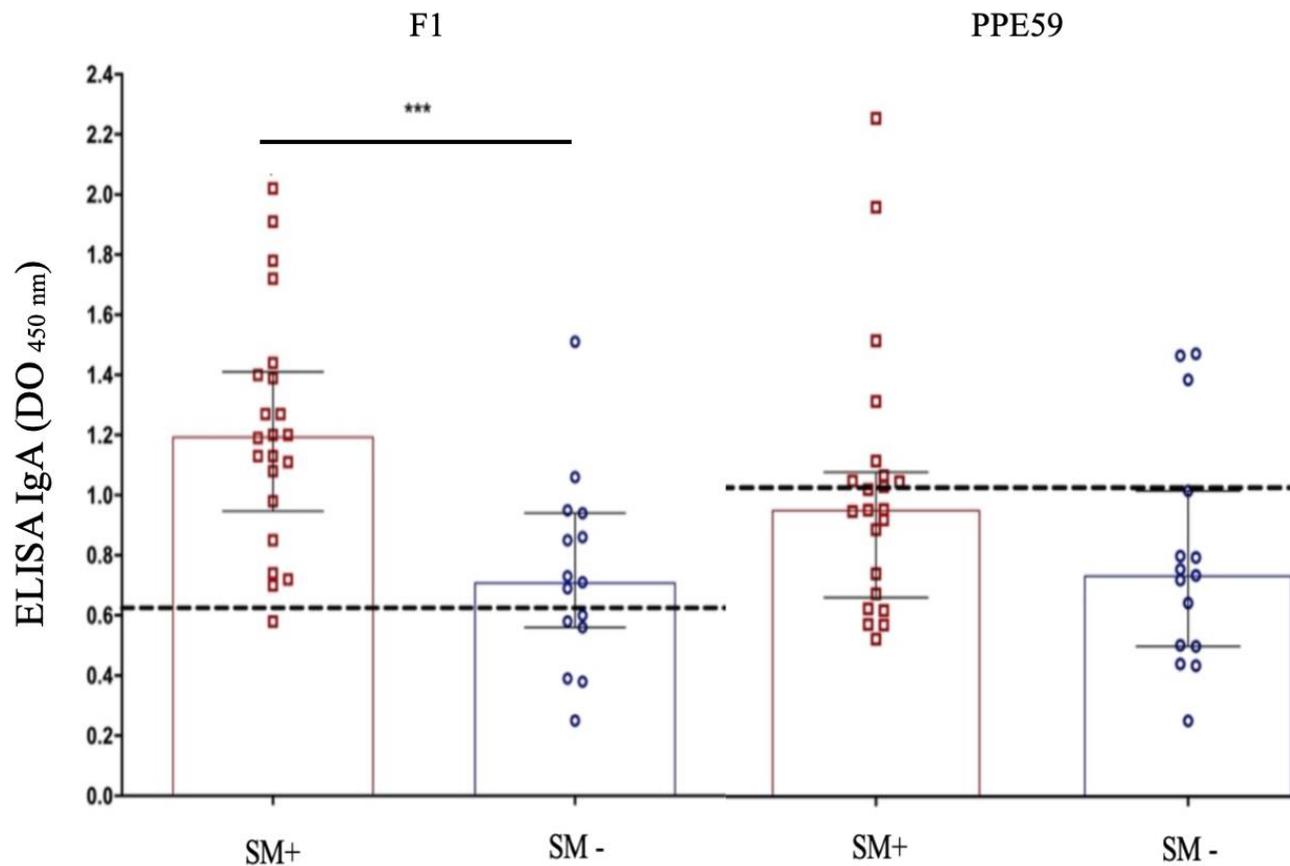


Figura 13: Distribuição individual da reatividade dos soros para a imunoglobulina IgA às proteínas F1 ou PPE59, em teste imunoenzimático (ELISA) no soro de pacientes com tuberculose pulmonar com microscopia de escarro positiva (SM⁺) ou negativa (SM⁻). *** Teste MannWhitney p= 0,0002; Linha tracejada: ponto de corte (cut off).

Tabela 4: Análise quantitativa de imunoglobulina IgA reativa às proteínas PPE59 e F1, expresso em média e desvio padrão, de acordo com algumas características demográficas e laboratoriais dos 113 indivíduos do estudo, no período de 2011 a 2013.

Características	ELISA- IgA							
	Média ± Desvio Padrão							
	PPE59				F1			
	TB	P valor	HCC	P valor	TB	P valor	HCC	P valor
Idade < 34 anos	0,77 ± 0,30	0,05	0,71 ± 0,36 ^b	0,2	0,93 ± 0,40^c	0,1	0,60 ± 0,33 ^{c/d}	NS
Idade > 34 anos	1,17 ± 0,45^{a/b}		0,79 ± 0,36 ^a		1,17 ± 0,41^d		0,63 ± 0,31 ^{d/c}	
Feminino	0,958 ± 0,27^g	0,2	0,71 ± 0,40 ^g	0,1	1,01 ± 0,32^e	0,9	0,58 ± 0,37 ^{e/f}	NS
Masculino	0,89 ± 0,48		0,74 ± 0,32 ^g		1,03 ± 0,47^f		0,6 ± 0,28 ^{e/f}	
SM positivo	1,0 ± 0,42	0,07	-		1,22 ± 0,38	0,0002	-	
SM negativo	0,78 ± 0,36		-		0,74 ± 0,30		-	
Cultura Positiva	0,92 ± 0,41		0		1,02 ± 0,42		0	
Cultura Negativa	0		0,73 ± 0,35		0		0,61 ± 0,32	
Tabagista	0,96 ± 0,39	0,8	NI		1,29 ± 0,38	0,1	NI	
Não tabagista	0,91 ± 0,40		1,0 ± 0,38		NI			
Etilista	0,77 ± 0,35	0,1	NI		0,99 ± 0,49	0,5	NI	
Não Etilista	0,96 ± 0,40		1,0 ± 0,37		NI			
Marca BCG presente	0,87 ± 0,30	0,8	NI		0,97 ± 0,32	0,3	NI	
Marca BCG ausente	1,03 ± 0,52		1,16 ± 0,43		NI			
Outras etnias ⁺	0,73 ± 0,37				0,82 ± 0,43			
Etnia Guarani	1,0 ± 0,40	0,05	NI		1,12 ± 0,38	0,05	NI	
Kaiowá			NI					

+: etnia Guarani Nandeva (n=1), etnia Terena (n=5) e sem informação (n=6); TB- tuberculose confirmada; HCC: contatos sadios, recentes e próximos de pacientes com TB. a= PPE 59- TB >34 x HCC >34 (p <0,0001); b= PPE 59- TB >34 x HCC <34, (p<0,001); c = F1- TB >34 x HCC >34 e <34 (p<0,0001); d= F1- TB <34 x HCC >34 e <34 (p< 0,003); e= F1- TB feminino x HCC feminino e masculino (p <0,0001); f= F1- TB masculino x HCC feminino e masculino(p< 0,0002); g = PPE 59- TB feminino x HCC feminino e masculino (p<0,001). NS: não significativo; NI = não informado; SM: microscopia do escarro para bacilos álcool ácido resistente; BCG: Bacilo Calmette-Guérin.

5.5. Resultados qualitativos dos ELISA IgA anti PPE59 e anti F1

Baseada nas diferenças obtidas nas análises quantitativas dos testes sorológicos propostos foram realizadas análises de curva ROC para avaliar o potencial dos antígenos PPE59 e F1 para o diagnóstico da TB na população indígena. Um resultado de análise significativa da área sobre a curva (AUC) foi evidenciado para ambos os antígenos, entretanto o ELISA-IgA F1 ($0,805 \pm 0,046$ [0,7139 a 0,8978 - 95%IC], $p < 0,0001$) mostrou habilidade mais significativa de discriminação na TB que o ELISA-IgA PPE59 ($0,668 \pm 0,056$ [0,5572- 0,7788], $p = 0,003$) (Figura 14).

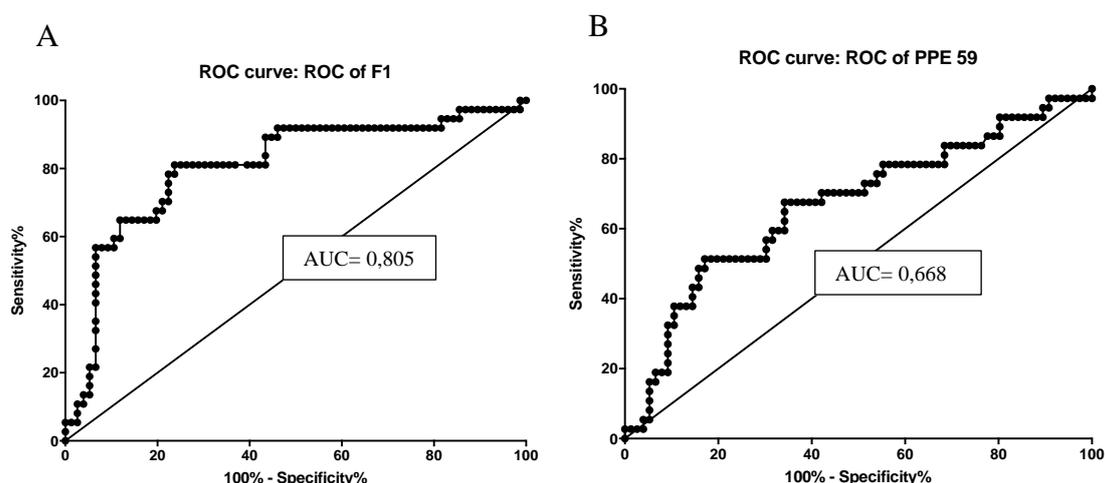


Figura 14: Curva Característica de Operação do Receptor (ROC) do teste sorológico para tuberculose em pacientes indígenas. ELISA-IgA F1 (A) e PPE59 (B). Curva ROC foi calculada em pacientes com TB e em contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC), AUC: área sob a curva.

Tendo por base a curva ROC, o valor diagnóstico dos testes sorológicos foi analisado, e encontramos um *cut off* (ponto de corte) de 0,682 para IgA-F1 com razão de verossimilhança positiva (RV^+) de 3,42; e para IgA-PPE59 de 1,012 e RV^+ de 3,59 e valores de RV^- menor para F1 (0,24 vs 0,69), levando a uma predição de TB ativa com a sensibilidade e especificidade descrita na tabela 5.

A sensibilidade do ELISA IgA usando a quimera protéica F1 foi mais elevada (81%, IC: 64,8% - 92,0%) que a obtida com o PPE59 (37,8 %, IC: 22,5% - 55,2%). A especificidade foi moderada para F1 (76,3 %, IC: 65,2% - 85,3%), enquanto para PPE59 obteve-se 89,5 % (IC: 80,3% - 95,3%). Para ambas as proteínas foi calculado o valor

preditivo positivo (VPP) moderado (63% e 62 %, respectivamente) e alto valor preditivo negativo (VPN) 73% e 89%, respectivamente.

A combinação dos resultados do ELISA-IgA para ambas as proteínas mostra que a PPE59 não aumenta a sensibilidade, mas há um pequeno decréscimo da especificidade (72,3%), portanto, a associação dos resultados não melhora a acurácia do teste na população estudada (Tabela 5).

Tabela 5: Sensibilidade e especificidade do teste ELISA para a detecção da imunoglobulina IgA que reconhecem as proteínas PPE59 e F1 em pacientes com tuberculose pulmonar e contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC), no período de 2011 a 2013.

ELISA- IgA								
	AUC	Cut off	Sensibilidade	Especificidade	VPP (%)	VPN (%)	RV +	RV -
			Número de positivo/total (% [IC])	Número de negativo/total (% [IC])				
PPE 59	0,668	1.012	14/37 (37,8 [22,5 - 55,2])	68/76 (89,5[80,3 - 95,3])	60	73	3,59	0,69
F1	0,805	0.682	30/37 (81 [64,8 - 92,0])	58/76 (76,3 [65,2 - 85,3])	62	89	3,42	0,24
PPE 59 + F1	NA	NA	30/37 (81[65,8 - 90,5])	55/76 (72,3 [61,4 - 81,2])	58	88	2,93	0,26

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; AUC: área sob a curva; IC: intervalo de confiança 95%; RV: razão de verossimilhança positiva (+) e negativa (-). NA: não se aplica

Em estudos sorológicos, um dos problemas descritos na literatura é o valor diagnóstico ineficiente nos casos de TB paucibacilar (SM⁻). Assim, a sensibilidade do ELISA, baseado nos dois antígenos propostos (PPE59 e F1), foi avaliada nos pacientes TB estratificados quanto aos resultados do SM. Mais uma vez, os antígenos mostram performance diferente, os resultados ressaltam que a F1 detecta os casos de TB SM⁺ quase na mesma proporção que o SM (95,4 %, IC%: 78,2 – 99,7; 21/22), com a vantagem adicional de detectar 60 % dos casos TB SM⁻ (60 %, IC%: 19,8 – 64,2; 9/15) (Figura 13 e tabela 7). O antígeno PPE59 é pouco reconhecido pela IgA dos soros dos TB SM⁺ (45%, IC%: 23,2 -61,2; 10/22) assim como produzem níveis de Ac acima do *cutoff* em apenas um quarto dos TB SM⁻ (20 %, IC%: 48,0 – 89,1; 4/15) (Figura 13 e tabela 7).

A combinação dos resultados de ELISA e SM são mostrados na tabela 6. Ambos os testes sorológicos agregam positividade ao SM, mas a sensibilidade foi significativamente mais elevada quando combinada aos resultados do ELISA IgA F1 (p=0,04), embora seja um ligeiro aumento comparado ao ELISA F1 *per si* (83,8% [68%-92%] vs 81% [64,8 - 92,0]).

Tabela 6: Sensibilidade da microscopia de escarro (SM) e a sua combinação com os testes sorológicos baseados nos resultados do ELISA-IgA para a PPE 59 ou F1 em pacientes com tuberculose pulmonar, no período de 2011 a 2013.

Combinação dos Resultados			p valor	
Número +/-total (%) [IC 95%]				
SM	SM ⁺ PPE59	SM ⁺ F1	SM ⁺ vs SM ⁺ /PPE59	SM ⁺ vs SM ⁺ /F1
22/37 (59)	26/37 (70,2)	31/37 (83,8)	0,47	0,04
[43%-74%]	[54%-82%]	[68%-92%]		

SM: microscopia de escarro; IC: intervalo de confiança; Valor de p: teste chi quadrado

Acompanhando as análises quantitativas, as análises qualitativas da positividade de IgA anti PPE59 e anti F1, relativas às características dos participantes do estudo, mostram não haver diferença significativa na frequência de positividade em função das variáveis descritas na tabela 7, exceto, para a PPE59 em pacientes TB >34 anos idade ($p < 0,0097$) e, como já descrito para F1 em pacientes SM^+ ($p = 0,0001$), já entre os pacientes TB/ SM^- , diferença significativa na positividade do teste comparando TB vs HCC foi evidenciada ($p = 0,01$), o que é contrário aos achados para PPE59. Dentro do grupo TB a F1 identificou a maioria dos indivíduos não vacinados com BCG (10/11; 90,9 %) e em 77,7% (14/18, $p = 0,36$) dos vacinados com BCG. Notemos, que a frequência de imunoreatividade de PPE59 ou F1 não é influenciada pelas variáveis consumo de álcool, tabagismo ou mesmo etnias, não sendo encontrada diferença significativa no percentual de positivos entre os grupos de indivíduos com presença ou ausência destas variáveis ($p = 0,12$).

Tabela 7: Positividade para a imunoglobulina IgA reativa às proteínas PPE59 e F1 em relação as características demográficas, étnicas e laboratoriais dos 113 indivíduos com tuberculose pulmonar e contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC), no período de 2011 a 2013.

Características	ELISA- IgA							
	PPE 59				F1			
	TB (N=37)	P valor	C (N=76)	P valor	TB (N=37)	p valor	C (N=76)	P valor
Idade < 34 anos	5/23 (21,7)	0,0097	4/40 (10)	0,7	17/23 (73,9)	0,15	10/40 (25)	0,6
Idade > 34 anos	9/14 (64,2)		4/30 (13,3)		13/14 (92,8)		6/30 (20)	
Feminino	6/14 (42,8)	0,6	2/29 (6,9)	0,65	12/14 (85,7)	0,6	5/29 (17,2)	0,2
Masculino	8/23 (34,7)		6/47 (12,8)		18/23 (78,2)		13/47 (27,6)	
SM positivo	10/22 (45)	0,2	-		21/22 (95,4)	0,0001	-	
SM negativo	4/15 (20)		8/76 (10,5)		9/15 (60)*		18/76 (23,7)	
Cultura positiva	14/36 (38,8)	0,4	-		30/36 (83,3)	0,03	-	
Cultura negativa	0/1# (0)		8/76 (10,5)		0/1 (0)		18/76 (23,7)	
Tabagista	2/6 (33,3)	0,9	NR		6/6 (100)	0,2	NR	
Não tabagista	9/25 (36)				20/25 (80)			
Etilista	2/7 (28,6)	0,7	NR		6/7 (85,7)	0,9	NR	
Não Etilista	9/24 (37,5)				20/24 (83,3)			
Marca BCG presente	7/18 (38,8)	0,5	NR		14/18 (77,7)	0,3	NR	
Marca BCG ausente	3/11 (27,3)				10/11 (90,9)			
Outras etnias +	3/12 (25)	0,4	NR		8/12 (66,6)	0,1	NR	
Etnia Guarani Kaiowá	10/25 (40)				22/25 (88)			

+: etnia Guarani Nandeva (n=1), etnia Terena (n=5) e sem informação (n=6); TB: indivíduos com TB pulmonar confirmada; HCC: contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB. Valor de p: teste chi quadrado; SM: microscopia de escarro; NR: não realizado; BCG: *Bacille Calmette-Guérin*; #: cultura contaminada. * χ^2 Fisher exact (p=0,01) para positividade de F1 entre TB x HCC (SM-)

Ao analisar fatores que podem estar associados com a positividade do teste ELISA-IgA no grupo TB (tabela 8) para as proteínas PPE 59 e F1, evidenciou-se que o único fator associado a positividade do teste, significativamente, foi para os indivíduos com SM positivo para a proteína F1, que tem 14 vezes mais chances ter sorologia positiva do que os indivíduos com SM negativo (OR=14,0 ;p=0,01). Ser fumante (OR= 0,8; p= 0,55) foi considerado fator de proteção para a positividade do teste para a proteína F1, o que pode estar associado ao baixo número amostral. Apenas a cultura foi considerada fator associado para a positividade do teste para ambas as proteínas, porém sem diferença significativa (OR= 1,5; OR= 6,0, respectivamente).

Tabela 8: Razão de chances (OR) em relação às variáveis clínicas, laboratoriais e os hábitos dos indígenas do estudo para a positividade do teste de ELISA-IgA para às proteínas PPE59 e F1.

Características	ELISA IgA			
	PPE59 OR (IC)	Fisher's Exact Test	F1 OR (IC)	Fisher's Exact Test
Sexo	2,1 (0,51-8,7)	0,47	1,7 (0,28-10)	0,68
Marca BCG	1,3 (0,26-6,9)	0,53	0,35 (0,03-3,6)	0,62
SM	2,8 (0,6-12,7)	0,29	14,0 (1,5- 133,6)	0,01
Cultura	1,5 (1,19- 1,89)	0,67	6,0 (2,9-12,5)	0,18
Idade	3,6 (0,9- 15,2)	0,14	4,6 (0,49 -42,9)	0,21
Fumantes	1,3 (0,2-8,7)	0,55	0,8 (0,65 - 0,97)	0,55
Etílicos	0,3 (0,03 - 3,3)	0,63	1,2 (0,11 - 12,8)	0,68
Etnia	1,7 (0,36- 7,9)	0,71	3,7 (0,67- 20,1)	0,18

BCG: Bacilo Calmette-Guérin; SM: microscopia em escaro para detecção de bacilo álcool ácido resistente. IC: intervalo de confiança 95%

6. DISCUSSÃO

Existem três razões principais para a falha no controle da TB. A primeira é a falta de uma ferramenta de diagnóstico simples, rápida, de baixo custo e precisa. Todos os anos, cerca de 3 milhões de casos de TB são perdidos pelo sistema de saúde devido a uma combinação de subnotificação de casos detectados e/ou por não ser diagnosticado, devido à baixa sensibilidade da microscopia de escarro, que é a ferramenta de diagnóstico mais utilizada no mundo. O segundo é o surgimento e expansão de *Mtb* multirresistentes (MR), com um número estimado de 558.000 apenas em 2017. O terceiro é a falta de vacinas eficazes, já que a única vacina licenciada e em uso é a BCG, que não impede a transmissão de *Mtb* (WHO²⁵, 2019). Além desses fatores é importante considerar os determinantes sociais, como as condições de iniquidade no acesso à segurança alimentar, às condições de moradia, além de barreiras financeiras, geográficas e culturais para o acesso ao serviço de saúde. A falta dessas condições influencia diretamente sobre o curso da TB, principalmente no acesso ao diagnóstico e no acompanhamento do tratamento (Maciel²⁰ *et al.*, 2012).

Há uma necessidade urgente de diagnósticos acurados para detecção rápida, permitindo o início precoce do tratamento, com consequente redução das taxas de tuberculose ativa. Os testes de detecção de Ac específicos são utilizados para o diagnóstico de muitas doenças infecciosas e poderiam potencialmente auxiliar no diagnóstico da TB. Os testes sorológicos possuem simplicidade tecnológica e podem ser formatados para testes do tipo POC, além de permitir a rápida liberação dos resultados se adaptados a plataformas imunocromatográficas, *lateral flow* ou de *microchips*. Inovações de diagnóstico para TB, incluindo soluções em locais de atendimento, são críticas para alcançar os objetivos do *END-TB 2035*, proposto pela OMS. A prioridade é um teste rápido, baseado em biomarcadores, para detectar TB ativa com o objetivo de iniciar rapidamente o tratamento. A segunda maior prioridade é um teste de triagem, que pode ser baseado em biomarcadores, e com alta sensibilidade, que possa descartar a doença, ser usado para encaminhar pacientes aos testes confirmatórios, ou identificar pacientes com sintomas ou com fatores de risco para TB (Yoon¹² *et al.*, 2017; Yerlikaya¹⁰⁷ *et al.*, 2017; Ahmad¹⁰⁸ *et al.*, 2019). Para contribuir para a resposta à estas prioridades avaliamos o potencial de duas proteínas específicas para *Mtb*, F1 e PPE 59, a fim de acessar a acurácia dos testes sorológicos e avaliar a utilidade da ferramenta no diagnóstico rápido

na detecção do biomarcador IgA de soro reativos a proteínas específicas de *Mtb*, em população indígena.

Segundo a OMS o uso de testes sorológicos comerciais não é recomendado, pois evidências científicas descrevem inconsistências na sensibilidade e especificidade para diferentes formas clínicas da TB (Steingart *et al.*, 2007a, 2007b). Entretanto, a mesma reconhece a importância de desenvolver estudos com biomarcadores que possam ser formatados para um rápido e acurado diagnóstico da TB (WHO¹, 2017).

Não se conhece a real função da PPE59 no metabolismo de *Mtb*, mas sabe-se que induz resposta imune mediada por células, assim como a imunidade humoral (Chen⁷ *et al.*, 2009; Mulinari⁶, 2016; da Silva⁹ *et al.*, 2019). Foi descrito que a PPE59 possui imunodominância para IgA, com sensibilidade de 53% em grupo TB pulmonar de não indígenas do Brasil. Já em grupos de imigrantes da Europa, Ásia e África a sensibilidade para TB pulmonar decresceu para 38,1%, e nos casos extrapulmonares foi ainda mais baixa (28%), todos com especificidade fixada em 97% (Mulinari⁶, 2016). Em estudo recente da Silva⁹ *et al.* (2019) demonstraram, pela primeira vez, diferenças significativas de reatividades médias na detecção de IgA anti-PPE59 em líquido pleural de pacientes com TB pleural (TBpl), obtendo sensibilidade maior (62,1%) que a descrita na TB pulmonar e TB extrapulmonar de diferentes áreas geográficas (Mulinari⁶, 2016). Entretanto a alta especificidade (95%) foi mantida. Porém, no soro dos pacientes TBpl a sensibilidade da IgA anti-PPE59 foi a mais baixa quando comparado ao líquido pleural (13,8%). O presente estudo descreve indivíduos com TB de etnias indígenas com frequência de reatividade igual à obtida para imigrantes da Europa, Ásia e África, corroborando os resultados de Mulinari⁶, e mantendo especificidade próxima de 90%. Portanto, embora a PPE seja reconhecida por IgA com baixa sensibilidade, esta tem boa especificidade, sendo este resultado consistente em indivíduos de diferentes *backgrounds* genéticos.

Os Ag que compõem a nossa quimera F1, constituída pelos antígenos MPT64 e MT10.3, foram avaliados isoladamente na TBpl (Kaisermann⁹¹ *et al.* 2005), resultando em sensibilidade moderada (72%) e os seus resultados combinados aumentaram ligeiramente a sensibilidade para 76% em ELISA IgA de líquido pleural, com 96% de especificidade. Da Silva⁹ *et al.* (2019) também avaliaram ambas as proteínas isoladamente, porém observaram sensibilidade mais baixa para MT10.3 (20.7%) e MPT64 (24.1%), mantendo alta a especificidade (95%). Já Araújo⁸ *et al.* (2010)

simplificaram o teste fusionando essas duas proteínas íntegras (MT10.3: MPT64 ou F1), o que aumentou a acurácia para a detecção de IgA de casos paucibacilares de TB pleural, com sensibilidade de 81,4%, sem alterar a especificidade (95,5%) em relação às proteínas isoladas. Da Silva⁹ *et al.* (2019) validaram a proteína F1 em casos suspeitos de TBpl, confirmando ser o ELISA IgA F1 em fluido pleural altamente promissor na detecção de tuberculose pleural (86,2%). No presente estudo, o teste de detecção de IgA F1 em soro de indígenas com TB pulmonar foi ensaiado pela primeira vez, mostrando sensibilidade similar (81%) à obtida no fluido pleural de TBpl, embora com moderada especificidade 76,3%. Estes resultados sugerem que não há heterogeneidade de resposta imune para a quimera F1 relativa ao *background* genético dos pacientes. Mas notemos que a especificidade diminuiu e isto pode estar associado ao grupo de contatos saudáveis, recentes e próximos de pacientes com TB (HCC) utilizado, pois embora os indivíduos fossem indígenas saudáveis, estes eram contatos recentes dos pacientes com TB ativa. Assim, sendo esta proteína altamente imunogênica na TB, os HCC com ELISA IgA positiva podem estar em um dos estágios da infecção por *Mtb* (Drain⁷⁷ *et al.*, 2018). Atualmente, o estado da arte da infecção por *Mtb* teve o conceito dualista da TB revisado, introduzindo-se mais dois estágios da clínica entre a LTBI e a TB ativa, isto é, a infecção incipiente e a subclínica (Achkar & Jenny-Avital¹¹¹, 2011). Entretanto, o estudo base não foi desenhado para acompanhar prospectivamente e nem coletar soro dos contatos recentes de pacientes com TB ativa da população indígena. Assim, não temos como afirmar que os contatos IgA F1 positivos estariam ou não evoluindo nos estágios da infecção por *Mtb*. Portanto, estudos sorológicos com a F1 merecem ser avaliados em contatos recentes de TB ativa para investigar prospectivamente o potencial preditivo dos casos IgA F1 positivos estarem em risco de desenvolver doença ativa.

Vários autores descrevem, em diferentes populações indígenas, uma relação inversa entre a cobertura vacinal e a reatividade ao teste cutâneo à tuberculina (TCT). Malacarne¹¹² *et al.* (2016) identificaram que 95% dos indígenas apresentavam cicatriz de BCG, havendo uma proporção substancial de indivíduos com TCT não reator (59,7%), mesmo entre aqueles imunizados recentemente. Zembrzusi⁶² *et al.* (2010) observaram uma taxa de 74,4 % de indivíduos TCT não reator entre os índios Xavante (MS) na região Centro-Oeste do Brasil, apesar da cobertura vacinal com BCG ser alta (> 90%). Ainda, Escobar⁷⁴ *et al.* (2004) observaram TCT não reator em 58,4% dos Wari (Pakaanóva), enquanto nos indígenas de etnia Suruí, 27,1% apresentaram reações < 5 mm, incluindo indivíduos com revacinação recente por BCG (Basta¹¹² *et al.*, 2006b). As razões da baixa

reatividade do TCT entre indivíduos indígenas com cicatriz de BCG permanecem incertas. Não há dados referente ao TCT na população indígena do nosso estudo, o que não permite a comparação. Porém, no grupo TB, o ELISA-IgA F1 identificou 77,7% dos pacientes vacinados e 90% dos pacientes sem cicatriz BCG, mostrando que a reatividade da proteína não é influenciada pela vacinação. No grupo HCC de indígenas, uma forte reatividade de IgA anti-F1 foi observada em pequeno grupo de indivíduos, sugerindo que, para a população indígena, a F1 poderia ser uma alternativa ao TCT na detecção daqueles que tem potencial risco de progredir para a doença. Entretanto, estudos prospectivos devem ser realizados para confirmar esta possibilidade. Notemos que o grupo HCC foi formado por contatos recentes dos casos de TB que possuíam relação de proximidade residencial e social. Mas, por não apresentarem, no momento do estudo base, nenhuma sintomatologia respiratória os testes convencionais, cultura e baciloscopia de escarro, foram realizados para o diagnóstico, mas não havia indicações para realizar o acompanhamento.

Em relação ao estudo de contatos de TB na população indígena, é importante mencionar que em Dourados, de 1996 a 1999, a prevalência de TB na população Guarani Kaiowá era em média de 740 casos por 100.000 hab., com alta taxa de abandono (20%) do tratamento (Marques & Cunha¹¹⁴, 2003). Estudos realizados na virada do século (2002 – 2008) mostram redução de 90% na taxa de abandono do tratamento de TB (20% vs 2%) e redução de 63% na taxa de notificação de TB na reserva indígena (740/100.000 hab. vs 260/100.000 hab.) (Croda⁷⁰ *et al.*, 2012). Atualmente é recomendado realizar a busca ativa de sintomático respiratório (SR), isto é, com tosse independentemente da sua duração, em toda a população indígena de forma continuada para uma avaliação clínica e laboratorial. Uma vez confirmada a TB, é oferecido o TDO (Brasil², 2019). Porém, essas medidas não têm a eficácia necessária para o controle, sendo fundamental a busca por novos métodos que possam avaliar o risco de progressão para a doença, quebrando a cadeia de transmissão da TB.

Na última década, vários biomarcadores com potencial diagnóstico que poderiam ser desenvolvidos como ensaios de POC foram identificados. No entanto, poucos estão disponíveis atualmente. Uma revisão recente de 399 biomarcadores adequados para o POC concluiu que apenas 12 foram validados prospectivamente e apenas um havia alcançado o endosso da OMS para pacientes com HIV (LAM) (Yerlikaya¹⁰⁷ *et al.*, 2017). Recentemente, um estudo prospectivo em indivíduos HIV positivos relatou 89% de sensibilidade do LAM quando comparado com a cultura, e sensibilidade semelhante à

triagem baseada nas regras da OMS, quando comparada aos testes Xpert MTB / RIF (Yoon¹³ *et al.*, 2017).

Sanchez-Rodríguez¹¹⁵ *et al.* (2002) analisaram a resposta de Ac IgG a Ags de filtrado de cultura por immunoblot e ELISA para detecção de IgG com melhor reatividade em um grupo de índios Totonaca (México) com TB pulmonar. No immunoblot, o Ag 85 foi o melhor reconhecido (45,8%; 22/48) e os resultados no ELISA foram mais elevados (S=70%; Sp= 100%). Os títulos positivos para o Ag85 foram correlacionados com os quadros menos avançados e com a resposta à quimioterapia, embora o grupo controle fosse de apenas 10 indivíduos saudáveis. Araujo⁶⁷ *et al.* (2004) avaliaram a resposta de Ac específicos (IgA sérica, IgG, IgE e sIgA saliva) para três Ag específicos (PPD, HSP60, 38 kDa) de *Mtb*, em 80 amostras de soro e saliva de crianças indígenas Warao (34 TB e 46 contatos), pela técnica de ELISA. As sIgA 38 kDa, IgG-HSP60 e IgA, IgG e IgE anti PPD apresentaram variação de sensibilidade entre 26,5% e 38,2% e especificidade entre 77,4% e 97% e a combinação anti-PPD IgG/IgE e 38 kDa sIgA saliva mostrou sensibilidade de 64,7% e especificidade de 81,8%. Araujo⁸¹ *et al.* (2008) também avaliaram respostas imunológicas de diferentes isotipos (IgM, IgG, IgE, sIgA) entre indígenas (Warao) e não-indígenas (Crioulo) utilizando os antígenos PPD e 38 kDa por ELISA. Foram realizadas combinações entre os isotipos estudados e os resultados mostraram que há diferenças no reconhecimento entre os dois povos. Porém, as reatividades dos testes ou apresentaram alta sensibilidade ou alta especificidade.

Comparados a estes estudos, a F1, aqui avaliada, fornece resultado mais próximo de um OMS TPP2 (triagem) de perfil mínimo (S=90% e Sp=70%). Isto é importante, pois a acurácia do teste pode ser reforçada adicionando outras moléculas antigênicas. Porém, considerando que a população indígena tem altos índices de TB e precariedade no acesso ao diagnóstico e tratamento, uma vez validada a presente acurácia da F1, esta poderia se constituir em uma ferramenta útil para auxiliar na identificação dos sintomáticos suspeitos de TB. Os estudos comparativos da sorologia e SM apoiam em parte esta sugestão. Ambos os ELISAs, PPE59 e F1, adicionaram positividade ao SM, que é também um método simples, rápido e de baixo custo, mas apenas IgA F1 identificou com sucesso todos os SM+ (95,4%), exceto um, e ainda detectou 60% dos paucibacilares (SM-). Considerando que os SM+ são prioritários na identificação precoce, a sorologia F1 tem potencial para auxiliar na seleção destes casos e consequentemente também na interrupção da transmissão da doença.

Um teste de triagem com alto VPN e VPP moderado pode estratificar a população suspeita de TB, para os quais o monitoramento é apropriado, *versus* aqueles que precisam de acesso a diagnósticos avançados e mais caros, como GeneXpert e cultura (Yerlikaya¹⁰⁷ *et al.*, 2017). Em nosso estudo, a PPE59 e, principalmente, a F1 produziram um VPP moderado (60% e 62%, respectivamente) e mais alto VPN (73% e 89%, respectivamente). Portanto, os nossos resultados mostram que os testes sorológicos são encorajadores para o auxílio no diagnóstico.

Amicosante¹¹⁶ *et al.* (2017) realizaram um inquérito com um total de 723 entrevistados de 114 países, e concluíram que mais de 80% dos especialistas aceitariam um novo teste para o diagnóstico rápido da tuberculose ativa se esse fosse oferecido a um preço acessível. E quase metade dos especialistas pesquisados declararam que aceitariam um novo teste para o diagnóstico de tuberculose mesmo na ausência de dados robustos sobre o desempenho do teste, desde que desenvolvido segundo os critérios da OMS, o que indica que os métodos atuais não suprem muitas das dificuldades diagnósticas, seja na questão financeira, de desempenho ou de acesso. Portanto, o teste sorológico aqui desenvolvido, principalmente para a F1 tem potencial para ser mais extensivamente avaliado em estudos prospectivos em população indígena.

As limitações deste trabalho são várias, mas destacamos a ausência de informações clínicas e sociodemográficas do grupo HCC, impossibilitando uma análise mais discriminatória, inclusive o não acompanhamento ao longo de pelo menos dois anos seguintes à coleta do soro. Outra limitação foi o baixo número de pacientes com TB pulmonar, limitando nossas inferências, mas os resultados da sorologia são representativos do quadro de TB SM^{+/-}.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo, do ponto de vista clínico, mostraram que o ELISA IgA F1 identificou a totalidade dos casos bacilíferos e 60% dos casos paucibacilares, portanto revestindo-se de certa superioridade em relação à SM. O grupo HCC, contatos recentes de TB, apresentaram resultados acima do *cutoff* nos ELISAs em 10% dos indivíduos para a PPE59 e em 20% dos indivíduos para F1, dos quais reatividades para ambos os Ag em magnitude similar foi evidenciada em 5 indivíduos HCC. Portanto, estudos prospectivos devem ser assegurados para avaliar o risco de adoecimento. Considerando que o teste tem potencial para formatação POC, esses Ag, principalmente o F1, têm potencial interesse como ferramenta para auxiliar no controle da TB em áreas negligenciadas como as populações indígenas, e validação prospectiva em suspeitos de TB merece ser realizada.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar a prova de conceito da aplicabilidade da F1 na detecção de Ac por teste mais simples em membrana (imunodot).
- Realizar estudos prospectivos em sintomáticos respiratórios suspeitos de TB para validar o teste.
- Buscar novos marcadores específicos de *Mtb*, com potencial imunodiagnóstico, que juntamente com a F1 se conforme ao perfil TPP máximo recomendado pela OMS.
- Avaliar o potencial imunológico da F1 em outros grupos étnicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO, World Health organization [database on the Internet]. 2017. Global tuberculosis report 2017. Geneva: WHO. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
2. Brasil 2019. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 364 p.
3. Maciel Ethel Leonor Noia, Sales Carolina Maia Martins, Bertolde Adelmo Inácio, Reis-Santos Barbara, 2018. O Brasil pode alcançar os novos objetivos globais da OMS para o controle da TB?. Epidemiol. Serv. Saude, Brasília, 27(2). doi: 10.5123/S1679-49742018000200007
4. Nogueira Muniz Jordana, Fredemir Palha Pedro, Aparecida Monroe Aline, Gonzales Roxana Cardozo, Ruffino Netto Antonio, Villa Tereza Cristina Scatena. A incorporação da busca ativa de sintomáticos respiratórios para o controle da tuberculose na prática do agente comunitário de saúde. Ciênc. Saúde coletiva. 2005; 315-321. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232005000200009>.
5. Ferreira Silvana Margarida Benevides, Silva Ageo Mário Cândido da, Botelho Clóvis. Abandono do tratamento da tuberculose pulmonar em Cuiabá - MT - Brasil. J. bras. pneumol. [Internet]. 2005, Oct [cited 2019 Nov 17]; 31(5): 427-435. Doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132005000500011>
6. Mulinari A C P. Obtenção da proteína codificada pelo gene rv3429 de *Mycobacterium tuberculosis* e avaliação da reatividade imune humoral, [Dissertação]. Instituto Oswaldo Cruz, Pós Graduação em Medicina Tropical, Rio de Janeiro 2016.
7. Chen J, Su X, Zhang Y, Wang S, Shao L, Wu J, et al. 2009. Novel recombinant RD2- and RD11-encoded Mycobacterium tuberculosis antigens are potential candidates for diagnosis of tuberculosis infections in BCG-vaccinated individuals. Microbes and Infection, 11(10-11),876-885. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.008>.
8. Araujo, L S; Moraes, Rm.; Trajman, A; Saad, Mhf. Assessment of the IgA Immunoassay Diagnostic Potential of the Mycobacterium tuberculosis MT10.3-MPT64 Fusion Protein

- in Tuberculous Pleural Fluid. *Clinical and Vaccine Immunology*. v. 17, p. 1963-1969, 2010.
9. Da Silva RJ, Corrêa R, Sardella IG. et al. IgA and IgG antibody detection of mycobacterial antigens in pleural fluid and serum from pleural tuberculous patients. *BMC Immunol* 20, 36 (2019) doi:10.1186/s12865-019-0315-y
 10. Baruzzi Roberto Geraldo, Barros Vera Lucia de, Rodrigues Douglas, Souza Ana Lucia Medeiros de, Pagliaro Heloisa 2001. Saúde e doença em índios Panará (Kreen-Akarôre) após vinte e cinco anos de contato com o nosso mundo, com ênfase na ocorrência de tuberculose (Brasil Central). *Cad. Saúde Pública* [Internet]; 17(2):407-412. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2001000200015>.
 11. Ferreira Maria Evanir Vicente, Matsuo Tiemi, Tanno de Souza Regina Kazue. Aspectos demográficos e mortalidade de populações indígenas do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública* [Internet]. 2011 Dec [cited 2019 Nov 14]; 27(12): 2327-2339. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X2011001200005&lng=en. Doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102311X2011001200005>.
 12. Yoon C, Semitala FC, Atuhumuza E, et al. Point-of-care C-reactive protein-based tuberculosis screening for people living with HIV: a diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(12):1285–1292. doi:10.1016/S1473-3099(17)30488-7.
 13. García-Basteiro AL, DiNardo A, Saavedra B, Silva DR, Palmero D, Gegia M, Migliori GB, Duarte R, Mambuque E, Centis R, Cuevas LE, Izco S, Theron G, 2018. Point of care diagnostics for tuberculosis. *Pulmonology*. 24(2):73-85. doi: 10.1016/j.rppnen.2017.12.002.
 14. Comas, I, Coscolla M, Luo T, Borell S, Holt Ke, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris Sr, Niemann S, Diel R, Aseff A, Gao Q, Young D, Gagneux S 2013. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet*. 2013 Oct; 45(10): 1176–1182. Published online 2013. doi: 10.1038/ng.2744. Acesso em: 20 maio 2019.
 15. Delogu G, Sali M, Fadda G 2013. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 5(1), e2013070. doi:10.4084/MJHID.2013.070
 16. Gupta, R. S. 2016. Applications of genome sequences for discovering characteristics that are unique to different groups of organisms and provide

- insights into evolutionary relationships. Editorial. *Front. Genet.* 7:27. doi: 10.3389/fgene.2016.00027
17. Gupta Radhey S, Lo Brian, Son Jeen, 2018. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Frontiers in Microbiology*. V.9, p. 67. . doi:10.3389/fmicb.2018.00067.
 18. Tortoli Enrico, Fedrizzi Tarcisio, Meehan Conor J., Trovato Alberto, Grottola Antonella, Giacobazzi Elisabetta, Giulia Fregni Serpini, Sara Tagliazucchi, Anna Fabio, Clotilde Bettua, Roberto Bertorelli, Francesca Frascaro, Veronica De Sanctis, Monica Pecorari, Olivier Jousson, Nicola Segata, Daniela M. Cirillo, 2017. The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. *Infection, Genetics and Evolution*. Meegid. doi:10.1016/j.meegid.2017.10.013
 19. Bertolli Filho, C. História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950 [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001. 248p. Antropologia & Saúde collection. ISBN 85-7541-006-7. Available from SciELO Books <http://books.scielo.org>
 20. Maciel M S, Mendes P D, Gomes A P, Siqueira-Batista R. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. *Rev Bras Clin Med*. São Paulo, 2012 mai-jun;10(3):226-30.
 21. Bos KI, Harkins KM, Herbig A, et al. 2014. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*. 2014;514(7523):494–497. doi:10.1038/nature13591.
 22. Pôrto Ângela 2007. Representações sociais da tuberculose: estigma e preconceito. *Rev. Saúde Pública* [Internet]. 41(Suppl1): 43-49. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102007000800007>.
 23. Gonçalves H 2002. Peste Branca: um estudo antropológico sobre a tuberculose. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
 24. Ducati Rodrigo Gay, Ruffino-Netto Antonio, Basso Luiz Augusto, Santos Diógenes Santiago 2006. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 101(7): 697-714. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000700001>.
 25. WHO 2019, World Health organization [database on the Internet]. 2019. Global tuberculosis report 2019. Geneva: WHO. Available from: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

26. Nathavitharana R R, Yoon C, Macpherson P, Dowdy Dw, Cattamanchi A, Somoskovi A, Broger T, Ottenhoff T H M, Arinaminpathy N, Lonroth K, Reither K, Cobelens F, Gilpin C, Denkinger Cm e Schumacher S G 2019. Study Guidance For Tb Triage Tests. Jid 2019:220 (Suppl 3).
27. Tuberculosis in the Americas, 2018. Washington, D.C.: PAHO, 2018. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49510>.
28. BRASIL 2014, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletim epidemiológico 2014. Tuberculose, população indígena e determinantes sociais. V. 45 N. 18.
29. Mulligan CJ, Keith Hunley, Suzanne Cole, Jeffrey C 2004. Population genetics, history, and health patterns in native Americans. Annual Review of Genomics and Human Genetics, v. 5, p. 295-315, 2004.
30. Coimbra Jr. Cea, Santos Rv e Escobar Al, orgs 2005. Epidemiologia e saúde dos povos indígenas no Brasil [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; Rio de Janeiro: ABRASCO. 260 p. ISBN: 85-7541-022-9.
31. IBGE, 2019. [página da internet]. território brasileiro e povoamento-história indígena. Disponível em : <https://brasil500anos.ibge.gov.br/territorio-brasileiro-e-povoamento/historia-indigena/a-origem-dos-indios.html>.
32. FUNASA, 2002. Fundação Nacional de Saúde. Política Nacional de Atenção à Saúde dos Povos Indígenas. - 2ª edição - Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 2002. 40 p.
33. IBGE, 2010. Censo Demográfico 2010- IBGE -Características gerais dos indígenas: Resultados do universo. [página da internet]. Disponível em : https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/95/cd_2010_indigenas_universo.pdf
34. Buchillet D Q 2007. BIBLIOGRAFIA CRÍTICA DA SAÚDE INDÍGENA NO BRASIL (1844-2006). Abya-Yala. 614 pp.
35. Lachi T & Nakayama M 2015. Aspectos radiológicos da tuberculose pulmonar em indígenas de Dourados, MS, Brasil. Radiol Bras. Set/Out. 48(5). p:275-281
36. Ferreira, TF, Santos, AM, Oliveira, BLCA de, Caldas, Ajmc 2019. Tendência da tuberculose em indígenas no brasil no período de 2011-2017. Cien Saude Colet [periódico na internet] (2019/Fev). disponível em: <http://www.cienciaesaudecoletiva.com.br/artigos/tendencia-da-tuberculose-em-indigenas-no-brasil-no-periodo-de-20112017/17110?id=17110>.

37. SINAN. (Ed.). Sistema De Informação De Agravos De Notificação. 2019. Disponível em: <www.portalsinan.saude.gov.br>. Acesso em: 10 maio 2019.
38. Ferraz Antonio Flavio & Valente Joaquim Gonçalves 2014. Aspectos epidemiológicos da tuberculose pulmonar em Mato Grosso do Sul. Rev. bras. epidemiol. [Internet]. Mar; 17(1): 255-266. <http://dx.doi.org/10.1590/1415-790X201400010020ENG>.
39. Basta Paulo Cesar, Marques Marli, Oliveira Roselene Lopes de, Cunha Eunice Atsuko Totumi, Resendes Ana Paula da Costa, Souza-Santos Reinaldo 2013. Desigualdades sociais e tuberculose: análise segundo raça/cor, Mato Grosso do Sul. Rev. Saúde Pública [Internet]; 47(5): 854-864. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004628>.
40. BRASIL 2013, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletim epidemiológico 2013. O controle da tuberculose na população indígena. V. 44, N. 13.
41. Flynn J L & Chan J 2001. Immunology of tuberculosis. Annu. Ver. Immunol., v. 19, p. 93-129.
42. Ferraz JC, Melo FBS, Albuquerque MFPM, Montenegro SML, Abath FGC 2006. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. Braz J Med Biol Res [Internet]; 39(11): 1387-1397. 2006. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006001100002>.
43. Sasindran S J & Torrelles J B 2011. *Mycobacterium Tuberculosis* Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium?. Frontiers In Microbiology: Cellular and Infection Microbiology, V.2, p.1-16, 26jan. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00002>. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 12 abr. 2019.
44. Guirado E & Schlesinger LS 2013. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. Front Immunol. 22;4:98. doi: 10.3389/fimmu.2013.00098. PMID: 23626591; PMCID: PMC3631743.
45. Flynn JL, Gideon HP, Mattila JT, Lin PL 2015. Immunology studies in non-human primate models of tuberculosis. Immunol Rev. Mar;264(1):60-73. doi: 10.1111/imr.12258. PMID: 25703552; PMCID: PMC4339213.
46. Chai Q, Lu Z, Liu CH 2019. Host defense mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis*. Cell Mol Life Sci. Nov 13. doi: 10.1007/s00018-019-03353-5.

47. Jasenosky Luke D, Scriba Thomas J, Hanekom Willem A H, Goldfeld Anne E 2015. T cells and the human immune response to TB. *Immunological Reviews*. 264: 74–87
48. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(2):149-157. doi:10.1016/j.coi.2008.03.014
49. Mesquita Júnior Danilo, Araújo Júlio Antônio Pereira, Catelan Tânia Tiekoo Takao, Souza Alexandre Wagner Silva de, Cruvinel Wilson de Melo, Andrade Luís Eduardo Coelho et al. 2010. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev. Bras. Reumatol.* [Internet]. Oct; 50(5): 552-580. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042010000500008>.
50. Maglione P J & Chan J 2009. How B cells Shape the Immune Response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.*, v. 39, n. 3, p. 676–686.
51. Chan J, Metha S, Bharrham S, Chen Y, Achkar Jm, Casadevall A, Flynn J 2014. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Seminars in Immunology* 26: p.588–600.
52. Achkar Jm, Chan J, Casadevall A 2015. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev*. HHS public access 264(1): 167-181
53. Casadevall Arturo 2017. Antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med*; 376:283-285. Doi: 10.1056/NEJMcibr1613268
54. Achkar Jm, Casadevall A 2013. Antibody-mediated immunity against tuberculosis: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe* 13: 250–262
55. Zhu Bingdong, Dockrell Hazel M., Ottenhoff Tom H.M. Ottenhoff, Evans Thomas G 2018. Evans And Zhang Ying. Invited Review Series: Tuberculosis Updates. Series Editors: Chi Chiu Leung, Cynthia Chee And Ying Zhang Tuberculosis vaccines: Opportunities and challenges. *Respirology* (2018) 23, 359–368 doi: 10.1111/resp.13245
56. Bezerra J M, Beck S T, Kanunfre K A, Leite O M, Ferreira AW 2009. A study of IgA antibody response to different *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the diagnosis and monitoring of pulmonary tuberculosis. *Braz J Infect Dis.*, v. 13, n. 1, p. 53-58. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702009000100012>.

57. Zimmermann N, Thormann V, Hu Bo Kohler AB, Imai-Matsushima A, Loch C 2016. Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO Mol Med*.8:1325-1339.
58. Chin S T, Ignatius J, Suraiya S, Tye G J, Sarmiento M E, Acosta A, Norazmi M N, Lim T S 2015. Comparative study of IgA V H 3 gene usage in healthy TST– and TST+ population exposed to tuberculosis: deep sequencing analysis. *Immunology*, v. 144, p. 302–311.
59. Erb KJ 1999. Atopic disorders: a default pathway in the absence of infection. *Immunol Today*. Jul;20(7):317-22. DOI:10.1016/s0167-5699(99)01475-9
60. Salzano Francisco M & Hutz Mara H 2005. Genética, Genômica E Populações Nativas Brasileiras. *Revista de Estudos e Pesquisas, FUNAI, Brasília*, v.2, n.1, p.175-197.
61. Alves, C. et al 2005. HLA class II polymorphism in Brazilian populations. *R. Ci. méd. biol.*, Salvador, v. 4, n. 2, p. 113-117, mai./ago.
62. Zembruski VM. Estudo da suscetibilidade genética a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* em indígenas da etnia Xavante. [Tese]. Pós Graduação em genética e biologia molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
63. Augusto DG, Hollenbach JA, Petzl-Erler ML 2015. A deep look at KIR–HLA in Amerindians: Comprehensive meta-analysis reveals limited diversity of KIR haplotypes. *Hum Immunol* 76:272–280.
64. Lindenau Juliana Dal-Ri. A importância dos fatores genéticos do hospedeiro na suscetibilidade a doenças infecciosas introduzidas em populações nativas sul-americanas: a tuberculose nos aché. [Tese]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2016. Disponível: <http://hdl.handle.net/10183/142447>
65. Rook GA, Brunet LR 2005. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut*.;54(3):317–320. doi:10.1136/gut.2004.053785
66. Giampietro Francesca, de Waard Jacobus H., Rivas-Santiago Bruno, Enciso-Moreno José Antonio, Salgado Antonio, Araujo Zaida 2010. In vitro levels of cytokines in response to purified protein derivative (PPD) antigen in a population with high prevalence of pulmonary tuberculosis. *Human Immunology*. 71(11),2010,1099-1104. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.07.006>.

67. Araujo Z, Waard JH, Fernandez de Larrea C, et al 2004. Study of the antibody response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Warao Amerindian children in Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:517-24
68. Confalonieri Ulisses E C. O Sistema Único de Saúde e as populações indígenas: por uma integração diferenciada. Cad. Saúde Pública [Internet]. 1989 Dec [cited 2019 Nov 03] ; 5(4): 441-450. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1989000400008>.
69. Garnelo, Luiza 2012 (Org.). Saúde Indígena: uma introdução ao tema. / Luiza Garnelo; Ana Lúcia Pontes (Org.). - Brasília: MEC-SECADI. 280 p. disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_indigena_uma_introducao_tema.pdf
70. Croda M G, Trajber Z, Lima Rc, Croda J 2012. Tuberculosis control in a highly endemic indigenous community in Brazil, Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Volume 106, Issue 4, April, Pages 223–229, <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.01.005>
71. BRASIL 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde (Ed.). Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Acesso em: 02/ 04/ 2019.
72. Pinto M F T, Steffen R, Entringer A, Costa A C C, Trajman A. 2017. Impacto orçamentário da incorporação do GeneXpert MTB/RIF para o diagnóstico da tuberculose pulmonar na perspectiva do Sistema Único de Saúde, Brasil, 2013-2017. Cad. Saúde Pública, 33(9), e00214515. October 09, 2017. <https://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00214515>
73. MSF - Médecins Sans Frontières. Out of Step: TB policies in 29 countries. 3rd ed. 2017. Geneva, Switzerland: MSF Access Campaign.[Internet]. Disponível em: <https://www.msfacecess.org/out-step-tb-policies-29-countries-3rd-ed>
74. Siqueira Rubens Camargo & Oréface Fernando 2019. Potencial do teste IGRA (Interferon Gama Release Assay) para o diagnóstico de tuberculose ocular. Revisão e análise comparativa com o teste tuberculínico cutâneo (PPD). Rev. bras.oftalmol. [Internet]. 2019 June; 78(3): 202-209. Doi: <http://dx.doi.org/10.5935/0034-7280.20190130>.
75. Escobar AL, Coimbra Jr CEA, Camacho LA, Santos V 2004. Tuberculin reactivity and tuberculosis epidemiology in the Paakanova (Wari') Indians of Rondônia, Southwestern Brazilian Amazon. Int J Tuberc Lung Dis; 8:45-51

76. Basta Paulo Cesar, Camacho Luiz Antonio Bastos 2006a. Teste tuberculínico na estimativa da prevalência de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em populações indígenas do continente americano: uma revisão da literatura. Cad. Saúde Pública [Internet]; 22(2): 245-254. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2006000200002>.
77. Drain P K, Gardiner J, Hannah H, Broger T, Dheda K, Fielding K, Walzl G, Kaforou M, Kranzer K, Joosten S A, Gilpin C, Weyer K, Denkinger C M e Schumacher S G 2018. Study Guidance For Biomarker TB Tests. *jid* 2019;220 (Suppl 3)
78. Pai M, Denkinger C M, Kik S V, A Rangaka M X, Zwerling A, Oxlade O, Metcalfe J Z, Cattamanchi A, Dowdy D W, Dheda K, Banaei N 2014. Gamma Interferon Release Assays for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. Jan 2014 V.27 N.1 p.3–20.
79. Lalvani A, Berrocal-Almanza Lc, Halliday A 2019 Predicting progression to active tuberculosis: A rate-limiting step on the path to elimination. *PLoS Med* 16(5): e1002814. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002814>
80. Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D, Gennaro M L 1998. Heterogeneous Antibody Responses in Tuberculosis. *Infection and Immunity*, Aug. 1998, p. 3936-3940 V. 66, N. 8
81. Araujo Z, Giampietro F, Cancado LC, Singh M, Wide A 2008. Comparison of serological responses in two different populations with pulmonary tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103:661-7
82. Teva Antônio; Fernandez José Carlos Couto; Silva Valmir Laurentino 2009. *Imunologia*. Molinaro, Etelcia Moraes; Caputo, Luzia Fátima Gonçalves; Amendoeira, Maria Regina Reis (Org). *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*, v. 4. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC.
83. Burbelo P D, Keller J, Wagner J, Klimavicz J S, Bayat A, Rhodes C S, Diarra B, Chetchotisakd P, Suputtamongkol Y, Kiertiburanakul S, Holland S M, Browne S K, Sidsiqui S, Kovacs J A 2015. Serological diagnosis of pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection by LIPS using a multiple antigen mixture. *BMC Microbiology*. 5:205 DOI 10.1186/s12866-015-0545-y
84. Vidyarathi A, Khan N, Agnihotri T, Siddiqui Kf, Nair Gr, Arora A, et al. 2017 Antibody response against PhoP efficiently discriminates among healthy

- individuals, tuberculosis patients and their contacts. PLoS ONE 12(3): e0173769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173769>
85. Brennan MJ. The Enigmatic PE/PPE Multigene Family of Mycobacteria and Tuberculosis Vaccination. *Infect Immun.* 2017;85(6):e00969-16. Published 2017 May 23. doi:10.1128/IAI.00969-16
 86. Parkash O, Sing Bp, Pai M 2009. Regions of differences encoded antigens as targets for immunodiagnosis of tuberculosis in humans. *Scand. J. Immunol.* 70:345-357.
 87. Bekmurzayeva Aliya, Sypabekova Marzhan, Kanayeva Damira. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 93 (2013) 381e388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2013.03.003>
 88. Sable SB, Kumar R, Kalra M, et al. Peripheral blood and pleural fluid mononuclear cell responses to low-molecular-mass secretory polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis* in human models of immunity to tuberculosis [published correction appears in *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12):8456]. *Infect Immun.* 2005;73(6):3547–3558. doi:10.1128/IAI.73.6.3547-3558.2005
 89. Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, Abal AT, Ravn P, Oftung F, Andersen P 1998. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 1998; 48:535–543.
 90. Mustafa AS, El-Shamy AM, Madi NM, Amoudy HA, Al-Attiyah R: Cell-mediated immune responses to complex and single mycobacterial antigens in tuberculosis patients with diabetes. *Med Princ Pract* 2008; 17:325–330.
 91. Kaisermann M, Sardella I G, Jonas F, Kampfer S, Singh M, Trajmann A, e Saad M H F 2005. IgA response to *Mycobacterium tuberculosis* recombinants MPT-64 e MT-10.3 antigens in fluid pleural of patients with tuberculous pleurisy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9:461–466.
 92. Sardella I G. Avaliação dos antígenos MPT-64, MT-10.3, ESAT-6, 16kDa e 38 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* e KIT comercial da Lionex na resposta imune humoral na tuberculose pulmonar e extrapulmonar em área endêmica. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, 2008.
 93. Sardella I G. Rv3019c e Rv1980c: clonagem, expressão protéica e purificação de diferentes construções gênicas fusionadas e caracterização imunológica na

- tuberculose. 2014. [Tese]. Universidade Federal do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, 2014.
94. Tavares Ricardo C. Oliveira, Salgado Jorge, Moreira Valéria Barbosa, Mônica Antonia S. Ferreira, Fernanda C. Queiroz Mello, Janaína W. Leung, Leila de Souza Fonseca, Ralf Spallek, Mahaviir Singh, and Maria Helena F. Saad 2007. Interferon Gamma Response to Combinations 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/MPT-64 and ESAT6/CFP-10, Each Related to a Single Recombinant Protein of *Mycobacterium tuberculosis* in Individuals from Tuberculosis Endemic Areas. *Microbiol. Immunol.*, 51(3), 289–296.
 95. Bai Yinlan, Xue Ying, Gao Hui, Wang Limei, Ding Tianbing, Wentao Bai, Fan Ailin, fang Jian Zhang, Zhikai Xu Zhikai 2008. Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and MPT64 fusion protein and its immunoprophylactic potential in mouse model. *Protein Expression and Purification*. Volume 59, June, Pages 189-196.
 96. Alderson MR, Bement T, Day CH, et al 2000. Expression cloning of an immunodominant family of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using human CD4(+) T cells. *J Exp Med*. 2000;191(3):551–560. doi:10.1084/jem.191.3.551.
 97. Tavares Ricardo Candido Oliveira, Salgado Jorge, Moreira Valéria Barbosa, Ferreira Mônica Antonia S, Mello Fernanda Carvalho Queoz, Leung Janaína AW et al 2006. Cell proliferation and interferon-gamma response to recombinant MBP-3, NarL, MT-10.3, and 16kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Brazilian tuberculosis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 101(8): 857-861. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000800006>.
 98. Mon ML, Moyano RD, Viale MN, et al 2014. Evaluation of cocktails with recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* for a specific diagnosis of bovine tuberculosis. *Biomed Res Int*. doi:10.1155/2014/140829
 99. Silva, Vania Maria C, Sardella Isabela Gama, Ronir Raggio Luiz, Antonio Jose Ledo A. Cunha, Aline H. Cavalcanti, Singh Mahavir, Miriam Menna Barreto, Rosana Souza Rodrigues, Thaís Ferrao Carvalho e Maria Helena Feres Saad 2008. Immunoreactivity of five antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in patients attending a public health care facility in an area with high endemicity for TB. *Microbiol Immunol*. 52: 544–550 doi:10.1111/j.1348-0421.2008.00072.x
 100. Malaghini Marcelo, Thomaz Vanete-Soccol, Christian Macagnan Probst, et al 2011. Recombinant antigen production for assays of intradermo reaction for diagnosis and surveillance of tuberculosis. *Journal of Biotechnology*. 156 (1), p. 56-58

101. Sousa A O, Salem J I, Lee F K, Verçosa M C, Cruaud P, Bloom B R, Lagrange P H & David H L, 1997. An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomámi Indians of the Brazilian Amazon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94:13227-13232.
102. Hurtado-Guerrero A F et al 2003. Condição nutricional de um grupo de idosos indígenas no Distrito Sanitário Leste de Roraima. In: COIMBRA JR., C. E. A.; SANTOS, R. V. & ESCOBAR, A. L. (Orgs.) *Epidemiologia e Saúde dos Povos Indígenas no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
103. Tollefson D, Bloss E, Fanning A, Redd J T, Barker K, McCray E 2013. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 17 (9), p. 1139-1150. DOI: <https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0385>.
104. Rubel AJ & Garro LC, 1992. Social and Cultural Factors in the Successful Control of Tuberculosis. *Public Health Reports*, 107, 626-636.
105. Welch James R & Coimbra Jr C E A 2011. Perspectivas culturais sobre transmissão e tratamento da tuberculose entre os Xavánte de Mato Grosso, Brasil. *Cad. Saúde Pública* [Internet]. 27(1):190-194. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2011000100020>.
106. terrasindigenas.org [homepage on the Internet]. Brasil: terras indígenas no Brasil [cited 2019 May 9]. Available from: <https://terrasindigenas.org.br/pt-br/terras-indigenas/3656#demografia>.
107. Yerlikaya, S., Broger, T., MacLean, E., Pai, M., & Denkinger, C. M. (2017). A tuberculosis biomarker database: the key to novel TB diagnostics. *International journal of infectious diseases: IJID*, 56, 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.025>
108. Ahmad Rushdy, Liangxia Xie, Margaret Pyle, Marta F. Suarez, Tobias Broger, Dan Steinberg, Shaali M. Ame, Marilla G. Lucero, Matthew J. Szucs, Melanie et al 2019. A rapid triage test for active pulmonary tuberculosis in adult patients with persistent cough. *Tuberculosis. Sci. Transl. Med.* 11 (516). DOI: 10.1126/scitranslmed.aaz9925.
109. Steingart KR, Henry M, Laal S, et al 2007a. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review [published correction appears in *PLoS Med.*2007 4(8):e254]. doi:10.1371/journal.pmed.0040202
110. Steingart KR, Henry M, Laal S, et al 2007b. A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of

extrapulmonary tuberculosis. *Thorax*. 2007;62(10):911–918.
doi:10.1136/thx.2006.075754.

111. Achkar Jacqueline M & Jenny-Avital Elizabeth R 2011. Incipient and Subclinical Tuberculosis: Defining Early Disease States in the Context of Host Immune Response, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 204, Issue suppl_4, November 2011, Pages S1179–S1186, <https://doi.org/10.1093/infdis/jir451>.
112. Malacarne Jocieli, Rios Diana Patricia Giraldo, Silva Cosme Marcelo Furtado Passos da, Braga José Ueleres, Camacho Luiz Antonio Bastos, Basta Paulo Cesar 2016. Prevalence and factors associated with latent tuberculosis infection in an indigenous population in the Brazilian Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 49(4): 456-464. doi: .
113. Basta PC, Coimbra Jr CEA, Camacho LAB, Santos RV 2006b. Risk of tuberculous infection in an indigenous population from Amazonia, Brazil. *Int J Tuber Lung Dis*; 10: 1354-1359
114. Marques AMC & Cunha RV 2003. A medicação assistida e os índices de cura de tuberculose e de abandono de tratamento na população indígena Guaraní-Kaiowá no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cad Saude Publica* 19: 405-411.
115. Sánchez-Rodríguez, C; Estrada-Chávez, C; García-Vigil, J; Laredo-Sánchez, F; Halabe-Cherem, J; Pereira-Suárez, A; Mancilla, R 2002. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Volume 6 (8): 706-712.
116. Amicosante M, D'Ambrosio L, Munoz M, Mello FC, Tebruegge M, Chegou NN, Seghrouchni F, Centis R, Goletti D, Bothamley G, Migliori GB. Uso atual e aceitabilidade de novos testes diagnósticos para tuberculose ativa: um inquérito mundial. *J Bras Pneumol*. 2017;43(5):380-392.