

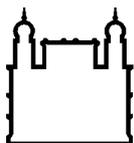
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SOROLÓGICOS DE SUBCLASSES DE IGG  
AOS ANTÍGENOS RV3353 E RV2034 NA TUBERCULOSE LATENTE E ATIVA EM  
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

JOYCE TEIXEIRA DE NORONHA

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2022



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***JOYCE TEIXEIRA DE NORONHA***

Avaliação de biomarcadores sorológicos de subclasses de IgG aos antígenos Rv3353 e Rv2034 na Tuberculose latente e ativa em crianças e adolescentes

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

**Orientador (es):** Profa. Dra. Maria Helena Féres Saad  
Profa. Claudete Aparecida Araújo Cardoso

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2022

Noronha, Joyce Teixeira .

Avaliação de biomarcadores sorológicos de subclasses de IgG aos antígenos Rv3353 e Rv2034 na tuberculose latente e ativa em crianças e adolescentes / Joyce Teixeira Noronha. - Rio de Janeiro, 2022.  
136 f.

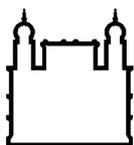
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2022.

Orientadora: Maria Helena Férez Saad.

Co-orientadora: Claudete Aparecida Araújo Cardoso.

Bibliografia: f. 93-115

1. Tuberculose. 2. Sorologia. 3. Crianças. 4. Infecção latente. 5. Biomarcadores. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**AUTOR: JOYCE TEIXEIRA DE NORONHA**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SOROLÓGICOS DE SUBCLASSES DE IGG  
AOS ANTÍGENOS RV3353 E RV2034 NA TUBERCULOSE LATENTE E ATIVA EM  
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

**ORIENTADORAS: Prof. Dra. Maria Helena Féres Saad  
Prof. Claudete Aparecida Araújo Cardoso**

**Aprovada em: 15 / 12 / 2022**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Maria da Glória Boneccine Almeida - Presidente (INI)  
Prof. Dr. Clemax Sant'Anna (UFRJ)  
Prof. Dra. Christiane Mello Schmidt (UFF)  
Prof. Dr. Adolfo Carlos Barreto Santos (UNIAN)  
Prof. Dra. Isabela Gama Sardella (IOC)**

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2022

**Aos meus queridos pais, Hermínia e José (ambos *in memoriam*),  
gratidão por terem sido os melhores pais que alguém poderia ter  
e por todos os ensinamentos, que me fizeram chegar até aqui.  
Essa vitória também lhes pertence.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, gratidão imensa pelo dom da vida, pela oportunidade de aprendizado e aprimoramento, pelas inspirações, pelos direcionamentos, pelo amor, pela fortaleza e pelo amparo frente aos obstáculos da jornada.

À Professora Maria Helena Férez Saad, com quem tive o prazer de conviver e com quem aprendi muito. Serei sempre grata por todos os conhecimentos compartilhados com sabedoria e propriedade, pelos aconselhamentos, pelo voto de confiança a mim concedido e até pelas partilhas de fé.

À Professora Claudete Aparecida Araújo Cardoso, por todos os ensinamentos, ministrados com disciplina, paciência e competência, como também pela amizade de longa data. Gratidão pelas amostras que possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Professor Dr. Tom Ottenhoff (Leiden University Medical Centre, The Netherlands), pela doação dos antígenos que tornaram possível a realização desse projeto.

À mestra Silvia Almeida, gratidão por suas sugestões, pelas palavras de otimismo e por seus imensos esforços, como também por todo o apoio na realização dos testes Elisa.

À Dra. Isabela Gama, gratidão pela disponibilidade e pela preciosa ajuda na realização dos testes Elisa, na revisão de dados e nas análises estatísticas.

Aos Professores da Pós-graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical, por todos os preciosos ensinamentos ministrados nas disciplinas que fazem parte do curso de Mestrado.

Aos meus queridos familiares, amigos e colegas de trabalho, gratidão pelo carinho, pelo apoio, pelas preces e pelo incentivo.

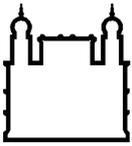
À pós-graduação de Medicina Tropical, pelo incentivo, pelo apoio e pela assistência. Minha gratidão.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para que esse projeto acontecesse.

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

Terás que estudar um livro não impresso. Suas capas são as camas de um hospital e seu conteúdo os corpos doloridos de nossos pacientes. Tens que acompanhar aos teus estudos com compaixão pelos enfermos e um grande sorriso”.

(São José Moscati)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

# **AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SOROLÓGICOS DE SUBCLASSES DE IGG AOS ANTÍGENOS RV3353 E RV2034 NA TUBERCULOSE LATENTE E ATIVA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

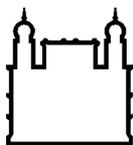
## **RESUMO**

### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL**

**Joyce Teixeira de Noronha**

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, geradora de muitos dos problemas enfrentados pela saúde pública mundial, por ser a principal causa de morte entre as doenças infecciosas. Seu manejo segue desafiador, em especial na faixa etária pediátrica, devido ao caráter paucibacilar da doença, limitando a acurácia dos métodos diagnósticos disponíveis. Assim, biomarcadores alternativos que possam auxiliar no diagnóstico é uma demanda clínica. Estudos anteriores em adultos, mostraram resposta diferenciada para TB ativa *versus* infecção latente da tuberculose (ILTB) por subtipos de IgG, a diferentes antígenos micobacterianos, associados ou não à latência. No presente estudo, propomos avaliar a resposta imunológica de dois destes antígenos (Ag) na população pediátrica. Para tal, 72 amostras de soro de crianças e adolescentes, com TB ativa, ILTB e controle saudáveis expostos a TB (HC) foram avaliados pelo método imunoenzimático (ELISA), quanto a imunorreatividade de subclasses de IgG, frente aos Ags Rv3353 e Rv2034, associados a TB ativa e à infecção ou latência, respectivamente. Reatividade média elevada de IgG1-Rv3353 e IgG3-Rv 3353 na TB, em comparação aos HC, porém sem diferença para o grupo ILTB ( $p>0,5$ ), foram evidenciadas. Interessantemente, reatividade média de IgG4-Rv2034 foi mais elevada em direção ao grupo HC ( $p=0,047$ ), sugerindo um fator protetivo contra a doença ativa. Em análises da curva ROC, obteve-se sensibilidades (S) moderadas para IgG1-Rv 3353 e IgG3-Rv 3353, 40% a 43,2% e baixa para IgG4-Rv 2034 (11,4%), com especificidades (Sp)  $\geq 70\%$ . A combinação dos resultados levou a um aumento da S (55,5%), diminuindo a Sp ( $\leq 63\%$ ). Notavelmente, combinação da positividade dos biomarcadores com os testes convencionais mostrou que a sorologia adiciona positividade na detecção da TB, principalmente entre aqueles com resultados negativos ao teste de rotina diagnóstica, e a restringe nos grupos ILTB e HC. Estes biomarcadores, por primeira vez descritos em grupo pediátrico, embora se caracterizem imperfeitos como produto alvo para indicar suspeitos de TB, têm potencial para auxiliar no diagnóstico da TB ativa. Todavia, entre os ILTB e HC, estudo prospectivo é necessário para determinar risco de evolução para TB ativa entre os positivos e se a positividade de IgG4-Rv2034 se constitui em fator de proteção.

Palavras-chave: Tuberculose. Sorologia. Criança. Adolescente. Tuberculose latente, Tuberculose ativa. Biomarcadores. ILTB



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EVALUATION OF SEROLOGICAL BIOMARKERS OF SUBCLASSES FROM IGG A TO RV3353 AND RV2034 ANTIGENS IN LATENT AND ACTIVE TUBERCULOSIS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

**Joyce Teixeira de Noronha**

Tuberculosis (TB) is an infectious and contagious disease, generating many of the problems faced by world public health, as it is the main cause of death among infectious diseases. Its management remains challenging, especially in the pediatric group, due to the paucibacillary nature of the disease, limiting the accuracy of available diagnostic methods. Thus, alternative biomarkers that can help in the diagnosis is a clinical demand. Previous studies in adults, showed a differentiated response to active *versus* latent TB infection (ILTB) by subtypes of IgG, to different mycobacterial antigens (Ag), associated or not with latency. In the present study, we propose to evaluate two of these Ag in the pediatric population. For this purpose, 72 serum samples from children and adolescents, with active TB, LTBI and healthy controls exposed to TB (HC) were evaluated by immunoenzymatic method (ELISA) for immunoreactivity of IgG subclasses against Ags Rv3353 and Rv2034, associated with active TB and infection or latency, respectively. Elevated mean reactivity of IgG1-Rv3353 and IgG3-Rv3353 in TB compared to HC, but with no difference for the LTBI group ( $p>0,5$ ), were evidenced. Interestingly, mean reactivity of IgG4-Rv2034 was higher towards the HC group ( $p=0.047$ ), suggesting a protective factor against the active disease. In analysis of the ROC curve, moderate sensitivity (S) was obtained for IgG1-Rv 3353 and IgG3-Rv3353, 40% to 43.2% and low for IgG4-Rv2034 (11.4%), with specificities (Sp)  $\geq 70\%$ . The combination of results led to an increase in S (55.5%), decreasing the Sp ( $\leq 63\%$ ). Notably, the combination of biomarker positivity with the tests conventional tests showed that serology adds positivity in the detection of TB, especially among those with negative results on routine diagnostic tests, and restricts it in the ILTB and HC groups. These biomarkers, described for the first time in pediatric group, although they are characterized as imperfect as a target product to indicate TB suspects, have the potential to aid in the diagnosis of active TB. However, between LTBI and HC, a prospective study is needed to determine the risk of progression to active TB among positives and whether IgG4-Rv2034 positivity constitutes a protective factor.

Keywords: Tuberculosis. Serology. Child. Adolescent. Latent Tuberculosis. Active tuberculosis. Biomarkers. LTBI

## ÍNDICE

<b>AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SOROLÓGICOS DE SUBCLASSES DE IGG AOS ANTÍGENOS RV3353 E RV2034 NA TUBERCULOSE LATENTE E ATIVA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Aspectos históricos da tuberculose .....	3
1.1.2 Situação epidemiológica da tuberculose.....	4
1.1.3 Agente etiológico da tuberculose.....	6
1.1.4 Fisiopatologia da tuberculose .....	7
1.1.5 Imunopatogênese na tuberculose.....	10
1.1.6 Características clínicas da tuberculose em crianças e adolescentes.....	16
1.1.7 Diagnóstico da TB na criança .....	20
1.1.8 Estrutura de alguns antígenos da micobactéria com relevância diagnóstica .....	27
1.1.9 Biomarcadores e Tuberculose .....	30
<b>1.2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>35</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>37</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
<b>3.1 DESENHO DE ESTUDO</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2 DADOS, COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.3 ORIGEM DOS SOROS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>3.6 PERÍODO DO ESTUDO</b> .....	<b>39</b>
<b>3.7 POPULAÇÃO DE ESTUDO</b> .....	<b>39</b>

<b>3.8</b>	<b>POPULAÇÃO ELEGÍVEL .....</b>	<b>40</b>
3.8.1	Participantes com tuberculose.....	40
3.8.2	Participantes com ILTB.....	40
3.8.3	Participantes controles saudáveis .....	41
<b>3.9</b>	<b>PREPARO DE POOLS DE SOROS PARA PADRONIZAÇÃO DO ELISA, IN HOUSE (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) ....</b>	<b>41</b>
<b>3.10</b>	<b>Antígenos.....</b>	<b>41</b>
<b>3.11</b>	<b>ELISA.....</b>	<b>41</b>
<b>3.12</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>42</b>
<b>3.13</b>	<b>Considerações éticas.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
4.1	Características demográficas, clínicas e laboratoriais .....	44
4.2	Reatividade de biomarcadores de subclasses de IgG aos antígenos Rv3353 e Rv2034.....	50
4.3	Análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) .....	64
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>LIMITAÇÕES</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>APÊNDICES E/OU ANEXOS</b>	<b>116</b>
10.1	Anexo 1 – Aprovação Comitê de Ética .....	116

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Taxas estimadas de incidência de TB no mundo, 2021 (Global Tuberculosis Report, WHO, 2022).....	4
Figura 2 – Espectro da Tuberculose, desde a infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> à doença ativa (pulmonar) (Adaptado de Pai, 2016a).....	17
Figura 3 – Organização dos genes codificadores dos antígenos ESAT-6 e CFP10, entre outros, na região de diferença 1 (RD1) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Adaptado de Berthet, 1998).....	27
Figura 4 – Representação esquemática da organização do operon Rv2028C–Rv2031, onde o gene Rv2031c é o principal regulador. Localização em kb no genoma entre 2000 e 2500 (Adaptado de Mushtaq, 2015). ....	28
Figura 5 – Representação esquemática da sequência da região promotora Rv 2034 (Adaptado de Gao, 2012). ....	30
Figura 6 – Representação esquemática da estrutura e glicosilação das imunoglobulinas (Adaptado de Schroeder e cols, 2010). ....	32
Figura 7 – Fluxograma da população de 72 crianças e adolescentes, provenientes de estudo prévio <sup>(23)</sup> , cujos soros foram analisados no presente estudo. ....	45
Figura 8 – Parametrização ou otimização do ELISA .....	52
Figura 9 – Distribuição da resposta humoral de IgG1-Rv3353, expressa em densidade óptica. Comparados com os ILTB e HC, os soros de TB mostram reatividade aumentada de IgG1-Rv3353. Distribuição da resposta humoral de IgG1-Rv3353, expressa em densidade óptica individual no soro de tuberculose (TB ●), infecção latente por <i>M. tuberculosis</i> (ILTB ■) e contactantes domésticos (HC ▲). Os TB são apresentados estratificados por forma clínica pulmonar (TBp ▼) e extrapulmonar (TBe ◆). Barras: média com 95%IC. Retas: #p=0,085 (TB vs HC). D.O. densidade óptica x 1000.....	56

<b>Figura 10 – Distribuição da resposta humoral de IgG3-Rv3353, expressa em densidade óptica.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 11 – Distribuição da resposta humoral de IgG4-Rv2034, expressa em densidade óptica.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 12 – Curva ROC para os ensaios A) RV 3353-IgG1, B) Rv 3353 IgG3 e C) Rv2034 IgG4.....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com tuberculose e cujos espécimes clínicos foram utilizados neste estudo. ..47	47
Tabela 2 – Frequência de positividade dos testes diagnósticos dos participantes com tuberculose, estratificados de acordo com a faixa etária (em anos).....49	49
Tabela 3 – Frequência cumulativa dos testes imunológico, microbiológicos e molecular dos participantes com tuberculose, estratificados de acordo com a faixa etária (em anos).....50	50
Tabela 4 – Melhores resultados da padronização do ELISA em amostras de soro de pacientes com tuberculose ou pool + (TB) e pool – (saudáveis). .....51	51
Tabela 5 – Parâmetros de validade do teste de ELISA para a detecção dos subtipos do anticorpo IgG contra os Ag micobacterianos Rv 3353 e Rv 2034, em soros de crianças com tuberculose (TB), infecção latente por <i>M. tuberculosis</i> (ILTB) e de indivíduos sadios contatos saudáveis (HC).....53	53
Tabela 6 – Resposta imune humoral, expressa em média e desvio padrão, pelas subclasses IgG1, IgG3 e IgG4 respondedores aos antígenos micobacterianos (Rv3353 e Rv2034), em amostras de soros de crianças com tuberculose (TB), infecção latente por <i>M. tuberculosis</i> (ILTB) e indivíduos saudáveis, contatos recentes de casos-fonte de TB (HC), estratificados de acordo com a faixa etária. ....55	55
Tabela 7 – Reatividade média dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034, obtidos por ELISA, de acordo com o status sorológico para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). .....59	59
Tabela 8 – Reatividade média dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 IgG4-Rv2034, obtidos por ELISA, de acordo com o gênero. ....60	60
Tabela 9 – Reatividade média dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 IgG4-Rv2034, por ELISA, de acordo com a presença ou ausência de confirmação diagnóstica da tuberculose (TB) na criança. ....61	61
Tabela 10 – Reatividade média, expressa em média $\pm$ desvio padrão ( $\bar{x} \pm DP$ ), dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 IgG4-Rv2034, obtidos por ELISA, de acordo com o score do sistema de pontuação, no grupo TB. ....62	62

<b>Tabela 11 – Reatividade média, expressa em média <math>\pm</math> desvio padrão (DP), dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 IgG4-Rv2034, obtidos por ELISA, de acordo com os testes laboratoriais utilizados para diagnóstico no grupo TB.</b>	<b>.63</b>
<b>Tabela 12 – Eficiência da resposta imunes de subtipos de IgG, aos biomarcadores Rv 3353 e Rv 2034.</b>	<b>65</b>
<b>Tabela 13 – Sensibilidade (S) e especificidade (Sp) dos resultados combinatórios de IgG1 e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034 no soro de crianças com tuberculose (TB), infecção latente (ILTB) e contatos exposto assintomáticos (HC).</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 14 – Distribuição de imunorreatividade de Rv 3353-IgG1 de acordo com as variáveis de estudo.</b>	<b>69</b>
<b>Tabela 15 – Distribuição de imunorreatividade de Rv 3353-IgG3 de acordo com as variáveis de estudo.</b>	<b>70</b>
<b>Tabela 16 – Distribuição de imunorreatividade de Rv 2034-IgG4 entre as variáveis de estudo.</b>	<b>71</b>
<b>Tabela 17 – Sensibilidade dos testes diagnósticos de rotina na TB da criança combinado com a sensibilidade do ELISA IgG1- e IgG3-Rv3353, e IgG4 - Rv2034.</b>	<b>73</b>
<b>Tabela 18 – Sensibilidade do score de pontuação na TB da criança, combinado com a sensibilidade do ELISA IgG1- e IgG3-Rv3353, e IgG4 -Rv2034.</b>	<b>78</b>

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Definição de critérios para os cinco estados categóricos de tuberculose (Adaptado de Drain 2018).....	17
Quadro 2 – Diagnóstico da tuberculose pulmonar em crianças e adolescentes com baciloscopia e/ou teste rápido negativos (Adaptado de Silva 2021).....	26
Quadro 3 – Biomarcadores com potencial para diagnóstico <i>point of care</i> (POC) da tuberculose.....	31
Quadro 4 – Isotipos de anticorpos e suas funções (Adaptado de Schroeder e cols, 2010).....	33

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	Anticorpos
ADA	Adenosina deaminase
Ag	Antígeno
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANI	Identidade nucleotídica média
AUC	Área sob a curva ou <i>Area under the curve</i>
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BACT+	Bacteriologia positiva
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CMSDC	Centro municipal de saúde de Duque de Caxias
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CFP-10	Proteína do filtrado de cultura de 10 kDa
DC	Células dendríticas
DO	Densidade óptica
DosR	<i>Dormancy survival regulon</i>
DP	Desvio padrão
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático)
EndTB	Estratégia pelo fim da Tuberculose
ESAT-6	6 kDa <i>Early secretory antigenic target</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HC	Contactantes domésticos / saudáveis
HGV	Hospital Municipal Getúlio Vargas Filho
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
IC	Intervalo de Confiança
IFF	Instituto Fernandes Figueira
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse imunoglobulina G1
IgG2	Subclasse imunoglobulina G2

IgG3	Subclasse imunoglobulina G3
IgG4	Subclasse imunoglobulina G4
IgM	Imunoglobulina M
IGRA	Interferon gamma release assays (ensaios de liberação de IFN- $\gamma$ )
IL	Interleucina
ILTB	Infecção latente por tuberculose
INI	Instituto Nacional de Infectologia
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kDa	KiloDalton
LAMAP	Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas
LAMICEL	Laboratório de Microbiologia Celular
LB	Linfócitos B
LBA	Lavado broncoalveolar
ILTB	<i>Latent tuberculosis infection</i> (Infecção latente por Tuberculose)
M $\Phi$	Macrófagos
MicroRNA	Micro ribonucleic acid
MNT	Micobactérias não tuberculosas
MS	Ministério da Saúde
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex / Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCJD	Posto de Saúde Jorge David
PMAP	Padrões moleculares associados a patógenos
POC	<i>point of care</i>
PPD-RT 23	<i>Purified Protein Derivatite, Reset Tuberculin</i>
PRR	<i>Pattern recognition patterns</i> (receptores de reconhecimento padrão)
PSHC	Polo sanitário Hélio Cruz
PstS1	Lipoproteína transportadora de fosfato periplasmático 1
PSWL	Polo sanitário Washington Luiz
PT	Prova tuberculínica
QFT-GIT	QuantiFERON-TB Gold In-Tube

RD1	Região de diferença 1
ROC	<i>Receiving Operating Characteristic</i>
S	Sensibilidade
SNC	Sistema nervoso central
Sp	Especificidade
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Pacote Estatístico para as Ciências Sociais)
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
TB	Tuberculose
TBP	Tuberculose pulmonar
TBE	Tuberculose extrapulmonar
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCT	Teste cutâneo à tuberculina
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Th1	Linfócitos T auxiliares ou helper tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares ou helper tipo 2
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> / Fator de necrose tumoral
TPP	<i>Target product profile</i>
TRM	Teste rápido molecular
TT	<i>Tuberculin test</i>
WHO	World Health Organization
ZN	Ziehl-Neelsen

# 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa e importante problema de saúde pública mundial, sendo a primeira causa de morte entre as doenças infecciosas <sup>(1,2)</sup>. O seu principal agente etiológico é o Bacilo de Koch ou *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), que integra o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) <sup>(3)</sup>.

Estima-se que 10,6 milhões de pessoas tenham desenvolvido TB ativa em 2021 <sup>(4)</sup>. Embora o número de casos de TB tenha decrescido em média 1,4 % ao ano, desde 2000, nas últimas décadas, esta taxa não é adequada para se atingir as metas da Estratégia pelo Fim da Tuberculose (*EndTB*) da Organização mundial da Saúde (OMS) <sup>(1-3, 5,6)</sup>.

Atualmente, apesar de terapias eficazes, sua associação às más condições socioeconômicas e sanitárias, juntamente com a emergência de cepas resistentes aos tuberculostáticos, a epidemia do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o retardo no diagnóstico dos casos novos e, mais recentemente, o impacto da pandemia por SARS-CoV-2, representam grande desafio no seu controle global <sup>(2,7-10)</sup>. Portanto, é de fundamental importância a detecção precoce dos indivíduos doentes e seu completo tratamento, com interrupção da cadeia de transmissão e redução da persistência bacteriana e do desenvolvimento de resistência aos fármacos.

Estima-se que 25% da população mundial esteja infectada com o bacilo, porém somente 5-15% desses indivíduos evoluem para um quadro de doença ativa durante a vida; o restante pode permanecer em estado de infecção latente ou eliminar o bacilo através do sistema imune. Esse contingente de indivíduos com infecção latente por tuberculose (ILTB) é obstáculo ao controle da TB, pois, em algum momento da vida, pode abrir um quadro ativo da doença <sup>(1-3,11-14)</sup>.

O deficitário controle da TB nas populações com alta carga da doença é uma fonte de infecção cada vez maior para o grupo pediátrico, face a sua vulnerabilidade <sup>(3,6)</sup>. Estima-se, nos países de baixa endemicidade, uma frequência de 5% e, nos países endêmicos, de 10% a 20% do total de casos, mas esses números são subestimados, uma vez que não há prioridade nos programas de controle para esta população, considerada pouco relevante na cadeia da

transmissão de *Mtb* <sup>(12,15,16)</sup>. Todavia, este paradigma mudou e a OMS reconheceu que as crianças com TB adicionam morbidade à TB global, colocando-as como alvo no 2012 *World TB Day* <sup>(15,17,18)</sup>. Por outro lado, *STOP TB Partnership* e *END TB*, recomendam metas para erradicar as mortes de crianças por TB <sup>(4,18,19)</sup>.

Portanto, frente à complexidade no manejo da TB, se fazem necessárias alternativas diagnósticas rápidas, de fácil operacionalidade e de baixo custo, que não dependam da presença do bacilo no espécime clínico e que requeiram equipamento mínimo, sendo de grande utilidade os estudos de biomarcadores, como indicadores de processos fisiológicos ou patogênicos, além de ferramentas de avaliação diagnóstica e de monitoramento de resposta a uma intervenção terapêutica <sup>(20-23)</sup>. A OMS recomenda que, um teste diagnóstico em suspeitos de TB para uso em larga escala, tenha sensibilidade de 90% e especificidade mínima de 70% <sup>(24)</sup>. Também recomenda que possam distinguir TB ativa de ILTB e outras pneumopatias e tenham potencial para adaptação para testes rápidos no formato POC (*point of care test*), isto é, realizados no local de atendimento <sup>(25)</sup>.

Os testes sorológicos, baseados na resposta de anticorpos (Ac), possuem potencial para o desenvolvimento de métodos que atendam a estes critérios, podendo contribuir para a triagem de novos casos e para o diagnóstico e controle da TB/ILTB <sup>(26)</sup>. Entretanto, embora largamente estudados, não estão disponíveis na rotina laboratorial para TB; eles variam em uma série de características, como a composição do Ag e sua fonte (se nativo ou recombinante), sua composição química, seu grau de purificação e o tipo de imunoglobulina detectada <sup>(27)</sup>. Isso gera heterogeneidade da resposta imunológica ao reconhecimento de Ag de *Mtb*, resultando em sensibilidades e especificidades inadequadas e baixa reprodutibilidade <sup>(27-28)</sup>. A OMS não recomenda nenhum teste sorológico comercialmente disponível. Todavia, incentiva as pesquisas na busca de melhores biomarcadores <sup>(20,24,29-31)</sup>.

Assim, é oportuno intensificar as pesquisas por biomarcadores, a fim de que sejam aplicados com maior simplicidade ao atendimento do paciente, principalmente em crianças, dadas a natureza paucibacilar da doença e as limitações de coleta de espécime clínico (especialmente nos menores de cinco anos), e que a resposta imune pode variar de acordo com a faixa etária <sup>(32,33)</sup>.

Tendo em vista as limitações diagnósticas da TB na faixa etária pediátrica, este estudo tem por finalidade investigar a imunorreatividade a antígenos micobacterianos, associados à infecção ou latência, por subclasses de igG no soro de crianças, de forma a contribuir para o avanço no conhecimento da resposta humoral da infecção latente e/ou ativa.

## **1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA TUBERCULOSE**

A TB é conhecida desde o surgimento das primeiras civilizações. Em múmias egípcias, de cerca de 3.400 a.C., foram encontradas lesões de espondilite (Mal de Pott) que evidenciam a TB. Ossos de coluna vertebral, datados de 8000 a.C. mostraram lesões similares <sup>(9,34)</sup>. Os primeiros documentos sobre a TB foram encontrados na Índia (3300 a.C) e na China (2300 a.C) <sup>(35)</sup>. Apenas em 1819, o médico francês, René Theophile Hyacinthe Laennec, identificou sinais patológicos da TB pulmonar, como consolidação, pleurisia e cavitação e que a infecção poderia ocorrer em outros tecidos do organismo humano <sup>(35,36)</sup>. Chegou a ser considerada uma doença hereditária, tendo em vista a relação de maior risco de adoecimento entre integrantes de uma mesma família, e se tornou um problema social no decorrer do século XIX. Em 1834, Johann Lukas Schönlein cunhou pela primeira vez o termo tuberculose e em 1865, o cirurgião militar francês, Jean-Antoine Villemin, provou experimentalmente a sua natureza infecciosa, ao inocular um coelho com secreção de uma cavidade tuberculosa proveniente de autópsia <sup>(7,8,34-36)</sup>. Finalmente em 1882, o médico e microbiologista alemão Hermann Heinrich Robert Koch, descreveu o isolamento, cultivo e identificação do bacilo da tuberculose, ou bacilo de Koch (BK), em soro animal, por técnica de coloração. Isso representou um marco na luta contra a TB e, posteriormente, ele reproduziu a TB inoculando o bacilo em modelos animais <sup>(35,36)</sup>. A partir daí, foi possível conhecer a transmissão do bacilo e estabelecer a relação entre este e a doença <sup>(9,35)</sup>. Esta sequência investigativa ficou conhecida como postulados de Koch, importante no estudo para enquadramento da etiologia de qualquer doença infecciosa.

### 1.1.2 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA TUBERCULOSE

O manejo da TB na criança é ainda mais desafiador. A doença está associada à transmissão recente de *Mtb* e à falha do controle na comunidade <sup>(37)</sup>. Portanto, a confirmação da doença ativa em pediatria alerta para a busca ativa de adultos com TB no convívio da criança, juntamente com outros indivíduos susceptíveis <sup>(38)</sup>.

A partir do início do século XXI, o número de casos de TB decresceu em média 1,4 % ao ano, entretanto esta taxa não é adequada para se atingir as metas da Estratégia pelo Fim da TB (*EndTB*), isto é, redução da incidência para menos de 10 casos por 100 mil habitantes e do número de óbitos em 95% até 2035; para tal, seria necessária uma redução global de 4 a 5% ao ano, ou ainda, uma queda anual de incidência de casos em 17% até 2035 <sup>(1-3,5)</sup>.

#### 1.1.2.1 TUBERCULOSE NO MUNDO

Em 2021 (Figura 1), estimou-se em 10,6 milhões o número dos que desenvolveram a TB ativa e em 1,4 milhão os óbitos em decorrência dela <sup>(4)</sup>.

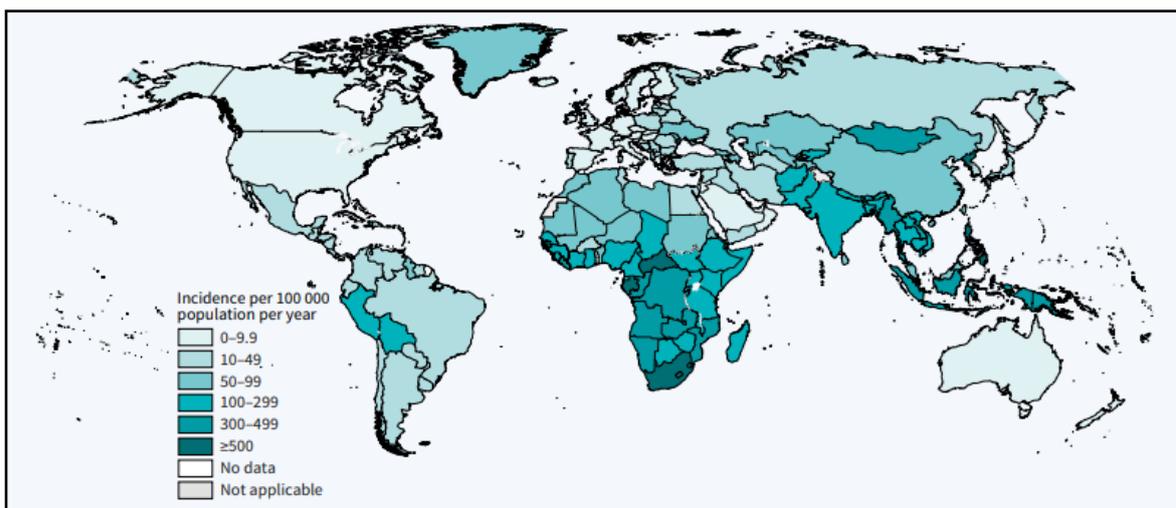


Figura 1 – Taxas estimadas de incidência de TB no mundo, 2021 (Global Tuberculosis Report, WHO, 2022).

A TB acomete mais o sexo masculino, em especial adultos jovens e, em 2018, estimou-se em 11% a frequência de crianças com TB (<15 anos) <sup>(1)</sup>. Estima-se que 55% dos casos até 14 anos não são notificados e que 80% dos óbitos por TB na criança ocorrem em menores de cinco anos <sup>(2,39,40)</sup>.

Os pacientes adolescentes representam maior risco de transmissão da doença, especialmente em ambientes fechados e adensados, como escolas e domicílios inadequados. Alguns precisam de serviços que incluam apoio psicossocial, já que estão em uma faixa etária com desafios específicos, como a pressão por aceitação e o medo do estigma, aumento da prevalência de comorbidades como a infecção por HIV e comportamentos de risco como etilismo, tabagismo ou consumo de outras substâncias, como drogas ilícitas. Assim como nas crianças, os casos de TB em adolescentes não são relatados rotineiramente. Nos países em desenvolvimento, onde a TB é endêmica, as taxas de infecção por *Mtb* entre a população jovem são de 20 a 50%. No entanto, as estimativas não são confiáveis, devido à falta de recursos, levando ao subdiagnóstico e à subnotificação de casos de TB na criança <sup>(39,41)</sup>. A OMS estima que, a cada ano, aproximadamente 10% de todos os novos casos mundiais de TB ocorrem em crianças, com cerca de 200.000 óbitos nas idades de 0-14 anos <sup>(14,40,42)</sup>. A carga anual mundial de infecção por *Mtb* é desconhecida; no entanto, um estudo de modelagem matemática estima que 67 milhões de crianças menores de 15 anos estão infectadas <sup>(41)</sup>.

### 1.1.2.2 TUBERCULOSE NO BRASIL

No Brasil, em 2021, foram diagnosticados 68.271 casos novos de TB, refletindo um coeficiente de incidência de 32 casos/100 mil habitantes <sup>(43)</sup>, que o coloca na trigésima posição no *ranking* dos 30 países com maior carga de TB do mundo, os quais são responsáveis por 90% dos casos de TB a cada ano <sup>(1,2)</sup> (Figura 1). Por outro lado, em 2020, juntamente com outros 15 países, foi responsável por 93% da redução das notificações da TB no mundo <sup>(10)</sup>. Entretanto, é importante notar que 2077 novos casos ocorreram em menores de 15 anos de idade, dos quais os menores de cinco anos representaram 40,1 % e,

destes, mais da metade (21,8%) desenvolveram a forma extrapulmonar da TB, o que indica a fragilidade desta faixa etária <sup>(43)</sup>. Em 2018, foram notificados 9,4% de casos em menores de 19 anos, com predomínio da forma pulmonar (80,1%). A frequência de cura foi de 76,8%, a de letalidade 0,8% e a de abandono foi de 10,4%. A distribuição das formas extrapulmonares variou conforme a idade, com predomínio de formas meníngea e ganglionar nos menores de um ano, da ganglionar nos maiores de um ano e a forma pleural nos adolescentes <sup>(44)</sup>. Considerando o período acumulado de 2018 a 2021, a maior parte das notificações de ILTB se concentrou na região Sudeste, perfazendo 56,3% do total de notificações dos casos tratados no país <sup>(43)</sup>.

O Brasil organizou o Plano Nacional pelo fim da TB, com recomendações para o período de 2021-2025, ajustadas a compromissos internacionais, como a Agenda 2030 dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável, visando diminuir a incidência de TB para menos de 10/100 mil hab. e menos de 230 óbitos, até 2035 <sup>(43,45)</sup>.

### **1.1.2.3 TUBERCULOSE NO RIO DE JANEIRO**

O Estado do Rio de Janeiro (RJ) está entre as unidades federadas com maior número de casos de TB no país. Em 2021, a taxa de incidência de TB foi de 67,4 /100.000 hab. e a taxa de mortalidade foi de 4,4/100.000 hab., ambas maiores que as médias nacionais <sup>(43)</sup>. A frequência de casos novos em crianças (< cinco anos) foi o segundo (1,4 %) entre os estados da região sudeste, enquanto entre os <15 anos foi de 3,4% <sup>(43)</sup>.

### **1.1.3 AGENTE ETIOLÓGICO DA TUBERCULOSE**

As micobactérias são aeróbias ou microaerófilas e intracelulares facultativas, estão incluídas no gênero *Mycobacterium*, termo sugerido por Lehmann e Neumann em 1896, e fazem parte da família *Mycobacteriaceae* <sup>(46,47)</sup>. Apresentam-se em forma de bastonete, são finas e imóveis, ligeiramente curvas e medem de 0,5 a 3 µm, não formam esporos, não são capsuladas e se diferenciam

das demais por reterem fucsina básica em sua parede celular, a qual não se desfaz, mesmo na presença de álcool e ácido; daí a denominação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) <sup>(3,48)</sup>; classificados de crescimento lento por necessitarem de semanas para formar colônias visíveis em meio de cultura *in vitro* <sup>(49)</sup>. Foram descritas ~200 espécies do gênero *Mycobacterium*; mas as que mais frequentemente causam doença em humanos são *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* <sup>(52)</sup>

Em nova proposta de classificação, baseada no sequenciamento de nova geração (NGS), na análise filogenômica por hibridização DNA-DNA (dDDH) e na identidade nucleotídica média (ANI), pelos quais se investigou a coerência genômica entre as cepas tipo do MTBC <sup>(50)</sup>, concluiu-se que as espécies integrantes do complexo seriam todas variantes de *M. tuberculosis* com ampla variedade de hospedeiros, a saber: *M. tuberculosis* var. *tuberculosis*, *M. tuberculosis* var. *africanum* e *M. tuberculosis* var. *canettii*, tipicamente isolados de humanos; *M. tuberculosis* var. *bovis*, tipicamente isolado de gados, outros bovinos ou humanos; *M. tuberculosis* var. *caprae*, tipicamente associado a caprinos; *M. tuberculosis* var. *microti*, tipicamente isolado de ratazanas e outros roedores; *M. tuberculosis* var. *pinnipedii*, tipicamente isolado de mamíferos marinho; *M. tuberculosis* var. *mungi*, normalmente isolado de mangustos e *M. tuberculosis* var. *orygis*, tipicamente isolado de espécies de antílopes (órixes). Embora cada uma dessas variantes cause a doença TB no hospedeiro afetado, podem causar pouca ou nenhuma doença fora de seu hospedeiro adaptado. *Mtb* possui parede celular rica em lipídios, como os ácidos micólicos e arabinogalactano, o que lhe confere baixa permeabilidade e resistência à maioria dos antimicrobianos, além de facilitar sua sobrevivência nos macrófagos (MΦ) alveolares <sup>(3,51)</sup>.

#### 1.1.4 FISIOPATOLOGIA DA TUBERCULOSE

A TB na infância não é de fácil manejo, pois além de ser paucibacilar, há sobreposição de sintomas com outras doenças mais prevalentes na infância <sup>(6,16)</sup>. A TB infantil está associada à transmissão recente de *Mtb* por meio do contato frequente com algum caso fonte, o qual elimina aerossóis contendo bacilos, geralmente em ambientes próximos à criança como o domiciliar ou escolar <sup>(6,52-54)</sup>.

Para as crianças de <10 anos, que geralmente têm vida social mais restrita, é possível, e altamente recomendável, a identificação do caso fonte. Tal fato ocorre menos frequentemente em adolescentes (> 10 anos) visto que, por estarem em uma fase de ampliação do seu convívio social, geralmente frequentam lugares fora do âmbito familiar, tendo múltiplos contatos, inviabilizando muitas vezes a detecção do caso fonte e elevando o risco de exposição ao bacilo da TB <sup>(55,56)</sup>.

A inalação de partículas de aerossóis contendo bacilos que penetram nas vias aéreas inferiores <sup>(57)</sup>, pode levar ao desenvolvimento de processo inflamatório pneumônico localizado, o foco primário de Ghon, descrito pelo patologista austríaco Anton Ghon (1866-1936). A partir desse foco, o bacilo se dissemina por linfáticos locais para o linfonodo regional (com/sem associação com derrame pleural), formando o Complexo primário de Ghon. Os bacilos são capazes de adentrar a circulação sistêmica, através dos linfonodos regionais, com disseminação hematogênica, antes que a resposta imune contenha a progressão da doença. Daí, podem sobreviver em órgãos-alvo por períodos prolongados ou evoluírem para desenvolvimento de doença ativa, dependendo, dentre tantos fatores, da dinâmica patógeno-hospedeiro no local de infecção <sup>(58,59)</sup>. Com o desenvolvimento da resposta imune, há fibrose progressiva das lesões primárias de Ghon que geralmente evoluem para cura, caracterizada pela calcificação da lesão primária (complexo de Ranke) <sup>(60)</sup>. A progressão da doença resulta em pneumonite focal e espessamento da pleura subjacente. Se a caseificação for intensa, o centro da lesão pode se liquefazer, desaguar no brônquio associado e causar obstrução, pneumonia, atelectasia e, até evoluir para uma cavidade tuberculosa primária residual <sup>(41,59,61)</sup>.

O período de incubação em crianças, até o desenvolvimento da hipersensibilidade cutânea, é geralmente de duas a 12 semanas, mais frequentemente de quatro a oito semanas. Quando os bacilos permanecem quiescentes, às vezes por anos, caracterizam a ILTB <sup>(41,46)</sup>, e o hospedeiro permanece em risco de progressão para a doença ativa ou “reativação” <sup>(12)</sup>. Os indivíduos com maior probabilidade de evoluir para TB ativa são aqueles que tiveram contato prolongado com um caso de TB ativa, ou seja, mais de seis horas por dia <sup>(62)</sup>.

A TB atinge principalmente os pulmões, com desenvolvimento de complexo primário em cerca de 85 a 95% dos casos <sup>(14,62)</sup>; todavia, pode acometer qualquer

outro tecido humano em até 15% dos casos, o que constitui as formas extrapulmonares <sup>(3, 14)</sup>. A forma pulmonar bacilífera é a mais relevante para a saúde pública, por ser a responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença <sup>(3)</sup>. Das pessoas infectadas, cerca de 5% evoluem rapidamente para a doença ativa <sup>(12)</sup>, nos primeiros dois a três anos após a infecção <sup>(3,13,41,63,64)</sup>, enquanto outros 5 a 10% podem fazê-lo ao longo da vida. As áreas mais comumente acometidas são os ápices dos pulmões, fígado, baço, meninges, peritônio, linfonodos, pleura e ossos <sup>(41)</sup>.

A infecção primária de TB e suas complicações em bebês e crianças pode cursar com disseminação linfo-hematogênica maciça levando à meningite, doença miliar ou disseminada, ocorrendo em 0,5 a 2% das crianças infectadas <sup>(41)</sup>. A maioria dos casos (>90%) ocorre dentro de um ano (principalmente dois a seis meses) após a infecção primária, com maior risco de progressão nessa faixa etária <sup>(6,41,55)</sup>. Linfonodos aumentados, clinicamente significativos, ou TB endobrônquica podem ocorrer dentro de três a nove meses. Lesões osteoarticulares podem se desenvolver geralmente em um ano; lesões renais podem ser evidentes cinco a 25 anos após a infecção. Em geral, as complicações intratorácicas da infecção primária ocorrem no primeiro ano. A TB que ocorre mais de um ano após a infecção primária pode ser uma infecção secundária ao crescimento endógeno de bacilos persistentes da infecção primária e disseminação subclínica. A reinfecção exógena pode resultar em TB em casos raros, mas acredita-se que a maioria dos casos de TB pós-primária ou de reativação em adolescentes seja secundária a organismos endógenos. Na ausência de complicações precoces, a TB de reativação é rara em bebês e crianças pequenas. <sup>(41)</sup>. A linfadenopatia hilar e a doença segmentar subsequente, complicando a infecção primária, ocorrem com mais frequência em crianças mais novas. Aproximadamente 50% das crianças não tratadas, com menos de um ano de idade, desenvolvem linfadenopatia ou lesões segmentares significativas radiograficamente, quando comparadas com 24% das crianças de um a 10 anos de idade e 16% das crianças de 11 a 15 anos de idade. Por outro lado, crianças mais velhas e adolescentes, raramente apresentam complicações da infecção primária, mas têm um risco maior de desenvolver TB pulmonar (TBP) de reativação na adolescência ou na idade adulta <sup>(41)</sup>.

### 1.1.5 IMUNOPATOGÊNESE NA TUBERCULOSE

As manifestações clínicas da TB se correlacionam com as respostas imunológicas do hospedeiro aos antígenos micobacterianos <sup>(49)</sup>. Após a infecção por *Mtb*, a doença pode se manifestar em qualquer época da vida, dependendo do equilíbrio entre o patógeno e a imunidade do hospedeiro, principalmente a imunidade celular, que é fundamental para a defesa <sup>(6,23,66)</sup>.

A infecção por *Mtb* ocorre, principalmente, por via inalatória, por meio da aspiração de partículas infectantes <10 $\mu$ , chamadas Núcleos de Wells, expelidas pelos portadores bacilíferos com TBP ao tossir, espirrar ou falar <sup>(57,63)</sup>. Estas contêm bacilos, os quais, ao ultrapassarem os mecanismos de defesa inespecíficos das vias aéreas, alcançam os alvéolos e ativam os neutrófilos. Essas células são substituídas, em torno de uma semana, por M $\Phi$  pulmonares residentes. Eles, juntamente com as células dendríticas (DC), apresentam os antígenos (Ag), resultantes de fagocitose, a linfócitos T (LT) CD4 e CD8 circulantes <sup>(68)</sup>; também sinalizam e ativam estas e outras células inflamatórias, via citocinas <sup>(49,63,64,67-69)</sup>, iniciando um processo inflamatório inespecífico, formando o foco de Ghon <sup>(67)</sup>. Após algumas semanas de infecção, com a multiplicação bacilar e a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), a resposta imune celular se estabelece, com formação de granuloma, havendo infiltração de neutrófilos e monócitos, aumento progressivo de LT CD4 e CD8 e linfócitos B (LB) que circundam os M $\Phi$  infectados, DC, células Natural Killer (NK) e fibroblastos; esse mecanismo limita a disseminação de *Mtb*<sup>(58)</sup> e cria um local para a interação de LT e M $\Phi$  ativados pelo IFN- $\gamma$ , os quais agem, facilitando o sequestro de mais bacilos e impedindo sua multiplicação <sup>(58,68-70)</sup>. A partir desse foco, *Mtb* se dissemina por linfáticos locais para o linfonodo regional, formando o complexo de Ghon, com ou sem reação pleural. Apesar disso, alguns bacilos persistem viáveis por meses a décadas e a doença latente pode sofrer reativação, pois os bacilos utilizam uma variedade de estratégias, na tentativa de alterar a resposta imune inata, estabelecendo uma infecção crônica <sup>(58,64)</sup>. Este processo que se caracteriza por ativação e recrutamento de diversas células do sistema imune (M $\Phi$ , neutrófilos, DC e linfócitos), além da produção de citocinas e outros componentes envolvidos na imunidade inata do hospedeiro contra infecções micobacterianas e que resultam em uma resposta imune de

hipersensibilidade do tipo tardia, mediada por células <sup>(12,49,63)</sup>, é avaliada pela Prova Tuberculínica (PT) ou os ensaios de liberação de IFN- $\gamma$  ou Interferon gamma release assays (IGRA). O hospedeiro pode abrir um quadro de doença, quando há um *déficit* desta resposta imune, ocorrendo resposta inflamatória patológica, com replicação e/ou disseminação da bactéria <sup>(63)</sup>. Indivíduos com bacterioscopia negativa, porém com cultura e/ou teste rápido molecular (TRM-TB) positivos, também podem transmitir o bacilo <sup>(3)</sup>. Assim, a chance de infecção depende de fatores como: infectividade do caso índice, da quantidade e virulência do patógeno, da frequência, duração e proximidade do contato, de ambientes adensados, com baixa circulação de ar, deficiente exposição à luz solar, dentre outros, além de fatores imunológicos e genéticos individuais <sup>(3,6,70)</sup>, com risco maior aos < 2 anos, cuja evolução clínica pode se apresentar de forma mais grave <sup>(61)</sup>. Com a progressão do granuloma, circundado por mais linfócitos (além de outros tipos de células), há necrose e, com o crescimento da população bacteriana, os bacilos migram para os gânglios regionais e mediastínicos. Os focos metastáticos são a origem tanto da tuberculose extrapulmonar (TBE) quanto da TBP de reativação em algumas crianças e em muitos adultos <sup>(41)</sup>.

A TB é uma doença heterogênea, com diferentes padrões e apresentações clínicas, de acordo com a idade e a competência imune <sup>(61,67)</sup>. As crianças podem se infectar após apenas 15-20 min de exposição ao *Mtb*. Nos lactentes e nas crianças pequenas, especialmente os < 5 anos, a infecção desencadeia doença primária com alta taxa de mortalidade, acometendo frequentemente sítios extrapulmonares e, em casos graves, incorrer em uma forma disseminada, a TB miliar <sup>(6,37,61,67)</sup>. A natureza primária e extrapulmonar da TB em lactentes/crianças jovens sugere incompetência na contenção de *Mtb*, por produção e função insuficientes de receptores TLR, DC e M $\Phi$ , bem como uma capacidade deficiente dos LT CD4 para expressar a função efetora Th1 <sup>(67)</sup>. Acredita-se que as crianças pequenas tenham tendência às respostas T helper 2 (Th2), com diminuição do tipo Th1 e vias inflamatórias, porque seus LT CD4 migram do timo, sendo funcionalmente imaturos, com alterações na diferenciação para células efectoras Th2. Isso explicaria por que a maioria das crianças tem pouca resposta aos antígenos micobacterianos do PPD e do IGRA <sup>(69)</sup>. Com a progressiva maturação imunológica, o risco de progressão para a doença ativa diminui <sup>(41)</sup>. Portanto, a maioria dos adultos possui sistema imunológico mais eficaz contra *Mtb* e

produzindo resposta imune Th1, resultando no sequestro de MΦ infectados em granulomas pulmonares e contenção da infecção <sup>(67)</sup>.

A contribuição dos LB e imunoglobulinas (Ig) na resposta imune contra o *Mtb* ainda precisa ser melhor explorado. Choreño-Parra e colaboradores (2020) afirmam que os LB afetam a imunidade mediada por células (IMC), pois auxiliam a ativação e a maturação dos LT de memória, por meio de interações variadas, dentre elas apresentação de antígenos, sinalização co-estimulatória, produção de ampla gama de citocinas e funções efetoras mediadas por anticorpos (Ac)<sup>(71,72)</sup>; essas propriedades podem influenciar a função de LT, MΦ, neutrófilos e células dendríticas. Além disso, os LB também regulam a proliferação dos LT durante as respostas imunes agudas e participam da manutenção e/ou reativação de suas respostas de memória <sup>(71-75)</sup>.

Os LB passam por um amplo espectro de diferenciação durante seus estágios de desenvolvimento, desde o fígado e a medula óssea, até o sangue periférico e os tecidos linfoides secundários e granulomas (focos ectópicos), evoluindo de células progenitoras a células maduras, com capacidade de diferenciação em funções T1 e T2, em células ativadas com capacidade de células apresentadoras de antígenos, em células produtoras de Ig (plasmócitos) e em células de memória <sup>(74)</sup>. Durante a resposta primária a um Ag, os LB virgens podem se transformar em LB efetores, proliferar e sofrer maturação de afinidade dentro dos centros germinativos (GC), com o suporte de LT auxiliares (Th), recombinação e troca de classe de Ig, via esta que origina LB de memória (MBCs) e plasmablastos, os precursores de células plasmáticas (PCs), as quais produzem e secretam grandes quantidades de Ac específicos <sup>(71,73)</sup>. Essa diversidade de LB se associa a múltiplas funções efetoras, dependendo do estado de desenvolvimento da célula recrutada e dos estímulos antigênicos <sup>(74)</sup>. Os LB podem ser encontradas ao lado dos LT em granulomas humanos e há descrição de anticorpos no plasma de pacientes com TB, direcionados a um conjunto de antígenos extracelulares de *Mtb* <sup>(64)</sup>. Demonstrou-se que camundongos deficientes em LB apresentavam recrutamento neutrofílico elevado e imunopatologia pulmonar exacerbada após infecção por *Mtb*, sugerindo, que os

LB podem influenciar o resultado da infecção, moderando as respostas inflamatórias <sup>(64)</sup>.

Os LB são capazes de regular a resposta imune via citocinas, produzindo e liberando citocinas específicas após interação com antígenos, LT ou ligantes de receptores semelhantes a Toll. Podem secretar citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL2, IL6, GM-CSF e CCL3) ou citocinas inibitórias / anti-inflamatórias (IL10 e IL17) para regular as respostas dos LT e limitar a infiltração de Th17 e neutrófilos <sup>(76)</sup>. As citocinas de função Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e o Th17 (IL-17) controlam a formação de granulomas e regulam a expressão de quimiocinas, modulando, assim, o recrutamento e a manutenção de células imunes no local da infecção, além de estimular as funções bactericidas de LT e M $\Phi$ , aumentando a apresentação de Ag e o *cross-priming* ou sinalização co-estimulatória <sup>(75,77)</sup>. Já as citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e Th2 (IL -4 e IL-13) promovem respostas humorais e neutralizam as respostas Th1 exageradas, inibindo TNF- $\alpha$ , IL-12 (citocina polarizadora Th1) e a expressão de antígeno leucocitário humano de classe II, o que limita a apresentação de Ag, o *cross-priming* e a migração de linfócitos Th1 (Th1) em direção aos pulmões <sup>(75,77)</sup>.

Assim como os LT influenciam a sinalização e o funcionamento dos LB, nos órgãos linfoides secundários e terciários, como linfonodos e tecido linfoide associado a brônquios (BALT), os LB facilitam a apresentação do Ag aos LT. Eles também podem participar do *priming* dos LT, transferindo Ag micobacterianos para as células dendríticas via exossomos e microvesículas extracelulares. Igualmente, as interações Fc-FcR podem aumentar a fagocitose de *Mtb*, as funções efetoras de M $\Phi$  e de células dendríticas <sup>(76)</sup>. Vale ressaltar que essas interações LB-LT facilitam a ativação e diferenciação de LB em células plasmáticas <sup>(76)</sup>.

#### **1.1.5.1 IMUNIDADE HUMORAL**

Os LB possuem função primordial na imunidade mediada por Ac (IAM) ou imunidade humoral, que parece desempenhar papel importante nas fases iniciais da infecção, quando os M $\Phi$  ativados iniciam a fagocitose dos bacilos, cujos

antígenos são capazes de estimular resposta de LB, por intermédio de estímulo dos linfócitos Th <sup>(28)</sup>. A partir daí, os LB sintetizam Ig capazes de neutralizar / inativar produtos de defesa e de degradação de *Mtb*, estando envolvidos nos mecanismos de opsonização, ativação do complemento e citotoxicidade celular, mediada por células NK <sup>(28,75,77,78,79)</sup>. A resposta humoral é caracterizada por variabilidade de funções, associada a fatores como especificidade do Ag, síntese de isotipos de Ig (IgA, IgM e IgG) e suas subclasses, além de modificações pós-traducionais, como glicosilação <sup>(23,75)</sup>. Esses Ac, ao interagirem com os Ag, cada qual com funções específicas e afinidades diferentes para com os receptores FcγR, formam complexos imunes. Eles podem se ligar a receptores Fcγ (FcγR), estimulatórios e/ou inibitórios, causando modulação das funções imunes celulares <sup>(73,75)</sup>, o que gera imunidade efetora diversificada <sup>(64,73,75)</sup>. Os complexos Ag-Ac podem levar ao aumento do processamento e apresentação de antígenos para linfócitos CD4+ por fagócitos (MΦ ou células dendríticas), resultando em ativação aumentada de LT CD4 + auxiliares que, por sua vez, promovem respostas citotóxicas de LT CD8 + e células NK <sup>(79)</sup>.

Na fase inicial, a IgA tem maior participação, e mais tardiamente, destaca-se a IgG, que possui elevação mais marcante em pacientes com doença em atividade, demonstrando papel importante na resposta à agressão pelo microorganismo <sup>(28)</sup>. Nos recém-nascidos, há resposta aos antígenos, predominando a síntese de IgM; a proteção pela IgG se dá por sua passagem transplacentária e a IgA é fornecida principalmente pelo leite materno. Os níveis das imunoglobulinas com valores próximos aos adultos ocorrem aos 2 anos de idade para IgM, aos 6 anos para IgG e aos 10 anos para IgA <sup>(32)</sup>.

Vários estudos indicam que o sorodiagnóstico tem o potencial de rastrear a progressão da ILTB para doença ativa e alguns relataram que a concentração de anticorpos foi mais alta no soro de pacientes com TBP com baciloscopia de escarro positiva do que em pacientes com escarro negativo <sup>(80)</sup>. Por outro lado, os LB e os componentes imunes a eles associados são capazes de regular a resposta do hospedeiro a vários patógenos intracelulares, incluindo *Mtb*, além de modular o nível de reação granulomatosa e a resposta de LT durante a patogênese da TB <sup>(80,81)</sup>. Portanto, *Mtb* pode alterar seu estado fisiológico, de acordo com os diferentes estágios da infecção no hospedeiro, o que inclui

alterações na expressão antigênica imunodominante. Dessa forma, a ILTB ou a TB ativa poderiam ser detectadas por um perfil específico de anticorpos <sup>(80)</sup>, sugerindo que eles possuem diferentes alvos de resposta, uma vez que se observou, em modelos animais, que os bacilos, em diferentes estados de crescimento durante a infecção pulmonar, expressam diferentes antígenos imunodominantes ou alvos; acredita-se que o mesmo ocorra em humanos, ou seja, que cada estágio da TB é caracterizado por determinados Ag micobacterianos (assinaturas de marcadores específicos) <sup>(82)</sup>. Essas diferenças nos Ac para cada estágio poderiam ser resultado de regulação diferencial dos genes de *Mtb*, diferenças de afinidade ou na regulação imune.

A avidéz de anticorpos é variável em pacientes com TB, e foi demonstrado que, logo após o tratamento da TB, há aumento na quantidade de anticorpos e diminuição na avidéz, sugerindo esgotamento da resposta das células B <sup>(63)</sup>. Em outro estudo, foram demonstradas frequências de células B circulantes mais baixas em indivíduos com TB ativa, sugerindo que essa deficiência ocorre durante a replicação do bacilo, conduzindo a uma diminuição da função destas células durante a TB ativa; esse fenômeno tem consequências significativas para a ativação das células T e pode afetar o resultado da infecção por TB <sup>(77)</sup>. Foi ainda demonstrado que os Ac de indivíduos com ILTB podem restringir o crescimento intracelular do *Mtb* de maneira mais bem-sucedida, quando em comparação com Ac de pacientes com TB ativa, os quais induzem baixa ativação de atividades efetoras em células imunes inatas <sup>(71)</sup>.

Estudos descrevem que a participação dos LB e Ig na depuração de *Mtb* é muito variável, possivelmente, e em parte, como resultado de diferenças genéticas ou ambientais nas populações de estudo. Entretanto, o sistema imunológico, incluindo o compartimento de LB, difere entre as espécies e, portanto, certos estudos realizados em animais não podem ser completamente extrapolados para doenças infecciosas humanas <sup>(75)</sup>. É interessante notar que foi descrito que o Ag associado à dormência Rv2659c induziu resposta de IgA em LB de memória em casos de ILTB, e que a maior parte dessas subpopulações celulares clássicas era produtora de IgA, concluindo que este novo conhecimento traz subsídios para o desenvolvimento de novas vacinas contra a tuberculose e seu controle <sup>(83)</sup>. Esses fatores corroboram a necessidade de uma avaliação mais aprofundada e abrangente das respostas imunes, que incluam função de

imunidade celular e humoral <sup>(75)</sup>, visando avanços nas áreas de diagnóstico, terapia e prevenção <sup>(64)</sup>.

### 1.1.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA TUBERCULOSE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Após a infecção pelo *Mtb*, a expressão clínica da TB difere entre as faixas etárias e nem todos os indivíduos infectados apresentam o mesmo risco de desenvolver doenças <sup>(41)</sup>. Cerca de 15 a 25% da doença em crianças menores de 15 anos é extrapulmonar e as manifestações mais comuns são a linfadenopatia (67%), envolvimento do sistema nervoso central (SNC) (13%), doença pleural (6%), acometimento miliar/disseminado (5%) e TB óssea (4%) <sup>(12)</sup>.

A TB se manifesta por uma síndrome infecciosa, normalmente de curso subagudo ou crônico, e a maioria dos pacientes apresenta febre, anorexia, sudorese noturna, emagrecimento e adinamia, além de sinais e sintomas específicos da área acometida <sup>(14)</sup>. Podem ocorrer outros sinais clínicos como palidez, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia <sup>(29)</sup>. Todavia, apresentação binária da TB foi revista recentemente em favor de uma diversidade de manifestações clínicas, associadas a cinco estágios categóricos <sup>(11)</sup>, que incluem (Quadro 1): *cura* espontânea com eliminação do bacilo por ação do sistema imune do paciente; *ILT*B, paciente encontra-se assintomático e pode desenvolver TB doença (por comprometimento do sistema imunológico) ou desenvolver infecção *incipiente*, a qual pode evoluir para TB doença na ausência de qualquer fator desencadeante; doença *subclínica*, detectada através de alterações radiológicas e testes microbiológicos, sem sintomas clínicos compatíveis com TB e, finalmente, *doença ativa*, onde o paciente é sintomático, com alterações radiológicas e detectada nos testes microbiológicos; pode ocorrer recuperação espontânea em qualquer uma dessas trajetórias clínicas (Figura 2) <sup>(11,42)</sup>.

Presença de critério					
Categoria TB	Exposição ao Mtb	Mtb viável	Atividade metabólica Mtb (curso/progressão iminente de infecção)	Anormalidade radiográfica /evidência microbiológica de Mtb ativo	Sintomas sugestivos de doença ativa
Infecção por TB eliminada	×				
Infecção latente por TB	×	×			
Infecção por TB incipiente	×	×	×		
Doença subclínica da TB	×	×	×	×	
Doença ativa da TB	×	×	×	×	×

Quadro 1 – Definição de critérios para os cinco estados categóricos de tuberculose (Adaptado de Drain, 2018).

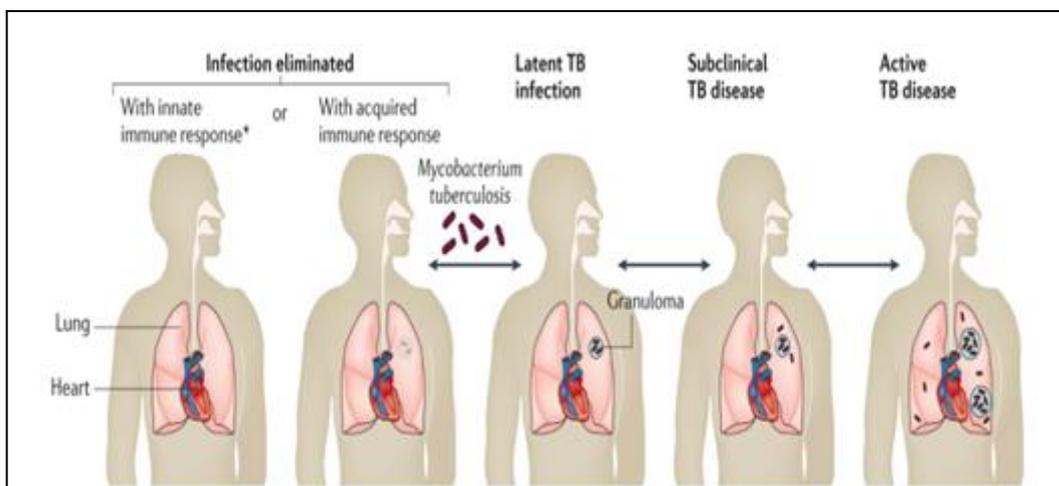


Figura 2 – Espectro da Tuberculose, desde a infecção por Mycobacterium tuberculosis à doença ativa (pulmonar) (Adaptado de Pai, 2016a).

A variação genética e fenotípica das micobactérias, juntamente com a interação destas e o sistema imune de seus hospedeiros individuais, pode influenciar a patogênese e a progressão da TB <sup>(11)</sup>.

A TB na criança e na adolescência tem o diagnóstico difícil e desafiador, com diferenças na fisiopatologia e na clínica, devido à semelhança e à sobreposição sintomática com outras doenças comuns da infância, além da dificuldade de confirmação bacteriológica e em virtude de seu caráter paucibacilar <sup>(6,16,39)</sup>. Os fatores que influenciam o equilíbrio entre o risco de ILTB e a progressão para TB ativa são idade, estado nutricional, vacinação com BCG, condições ambientais, virulência da cepa infectante e estado imunológico do hospedeiro <sup>(6,57)</sup>. Como as crianças são infectadas pelo contato próximo com um indivíduo com diagnóstico de TB bacilífero, a confirmação da doença em pediatria é evento sentinela que impõe a identificação do adulto, caso fonte, no relacionamento próximo da criança, juntamente com outros indivíduos susceptíveis <sup>(38)</sup>. Muitas vezes a suspeita da TB nessa faixa etária, ocorre em uma criança com sintomas inespecíficos e com história de contato com adulto bacilífero, assim como em casos de pneumonia que não melhoram com o tratamento antimicrobiano para germes comuns; podem ser também assintomáticas e confundidas com ILTB <sup>(84)</sup>. Na suspeita de TB, recomenda-se avaliar a tríade clássica: tosse crônica, redução do apetite e perda ponderal. Geralmente, quando os sintomas são persistentes (e não remittentes), possuem valor no diagnóstico da TB em crianças. Ao término da infância e no início da adolescência, aparecem formas sintomáticas semelhantes às encontradas em adultos <sup>(3)</sup>. Por outro lado, a ILTB acomete parte das crianças expostas, as quais podem evoluir com doença, portanto dificultando o controle, pois por não apresentarem sintomas, a procura do serviço médico é baixa e métodos de identificação, como o centenário e de baixo custo teste cutâneo a tuberculina (TCT), também conhecido como Prova Tuberculínica (PT) ou teste do PPD (*purified protein derivative*) ou Reação de Mantoux, tem a desvantagem de retorno para leitura favorecendo o absenteísmo diagnóstico <sup>(3)</sup>.

Do ponto de vista clínico, a TB na infância apresenta sinais e sintomas inespecíficos, e às vezes crianças com TBP ativa, no início do quadro, podem ser assintomáticas e podem ser confundidas clinicamente com casos de TB latente

(3,6,16,38,84). O maior risco de progressão da ILTB para a TB ativa está nos menores de cinco anos de idade (principalmente até dois anos), os quais podem desenvolver formas extrapulmonares (ex. meningite) ou disseminadas da doença (6,37). Nos menores de dois anos de idade, a primoinfecção pode progredir para doença grave, sem sintomas prévios significativos, geralmente nos primeiros 12 meses após o contato com casos de TB ativa, com apresentação semelhante em imunossuprimidos (6,54,56). Entre os 2-10 anos, a primoinfecção raramente progride para doença grave; e caso sim, há sintomas clínicos significativos. Por fim, nos maiores de 10 anos, a primoinfecção geralmente evolui para TB ativa do padrão tipo adulto. Nestes casos, a intervenção precoce pode reduzir a possibilidade de doença cavitária e de transmissão da doença à comunidade (6). Logo, a infecção e o início da doença são geralmente tempo-dependente em adultos e geralmente são eventos distintos. Em crianças, os dois estágios se sobrepõem, podendo causar confusão ao decidir qual regime de tratamento usar (11,40,41,64).

A apresentação de TB doença ocorre de duas formas (3,9). A primeira é a TB primária, que normalmente ocorre em seguida ao primeiro contato do indivíduo com o bacilo, sendo mais comum em crianças e pacientes com condições clínicas imunossupressoras. Já a TB pós-primária ou secundária pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais comum no adolescente e no adulto (3).

Na TBE, o diagnóstico é frequentemente não confirmado por se tratar de uma forma paucibacilar, requerendo exames complementares, por vezes, mais invasivos (14).

A TB pleural é a forma mais comum de TBE, exceto nos pacientes vivendo com HIV (PVHIV), crianças e mulheres, onde a TB ganglionar é mais frequente (15,17). Há também acometimento de região osteo-articular, principalmente coluna cervical, região coxofemoral, joelhos e tornozelos e a apresentação mais grave, a TB meningoencefálica, de difícil diagnóstico (14).

A maioria dos infectados por *Mtb* não evolui para doença ativa, todavia podem manter bacilos viáveis em estado latente (não replicantes), em ambiente intracelular, a ILTB (3,6,85), um estado de resposta imune persistente à estimulação pelos antígenos micobacterianos (3,6,37). A infecção prévia por *Mtb* não evita o adoecimento, comprovando que a doença não confere imunidade e recidivas podem ocorrer (3).

Portanto, as crianças desempenham um papel importante na transmissão da TB, porque abrigam uma infecção parcialmente curada que permanece latente, apenas para reativar como TBP contagiosa muitos anos mais tarde sob pressões sociais, emocionais e fisiológicas ou imunológica, que surgem durante a adolescência, a gravidez, a velhice ou o *déficit* da resposta imune. Assim, crianças infectadas com *Mtb* constituem um reservatório de TB de longa duração na população <sup>(41)</sup>.

### 1.1.7 DIAGNÓSTICO DA TB NA CRIANÇA

As características próprias da TB na infância, isto é, sua natureza paucibacilar, além da incapacidade de expectoração voluntária, dificultam o diagnóstico <sup>(3,14,16)</sup>. No Brasil, seu diagnóstico se baseia, inicialmente na combinação de critérios clínico-epidemiológicos, através de cuidadosa anamnese, e é complementada por testes baseados na resposta imune, exames radiológicos e exames microbiológicos e moleculares, além de exames histopatológicos<sup>(3,14)</sup>.

Nos testes baseados na resposta imune, a centenária PT é realizada utilizando-se o composto Tuberculina PPD R23, que demarca uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia aos antígenos micobacterianos, tendo como ponto de corte o valor de 5 mm no Brasil, considerando como positivo quando  $\geq 5$ mm <sup>(3,6,14,37)</sup>. A sensibilidade deste método varia de 50 a 70% nos pacientes com quadro clínico sugestivo de TB e de 75 a 85% naqueles com TB confirmada, sendo baixa em pacientes imunocomprometidos (45%). A especificidade varia de 95 a 100% nas crianças não vacinadas e de 49 a 65% nas vacinadas <sup>(56,86,87)</sup>. Tem por limitação, além a necessidade de retorno para leitura, menor especificidade, reação cruzada com a vacinação por BCG (quando aplicado em menos de três anos após a vacina) e com infecção prévia por MNT <sup>(3,14,16,49,56,86,88,89)</sup>.

Os IGRAs avaliam a resposta imune mediada por células do sangue, *in vitro*, a partir da mensuração de IFN- $\gamma$  liberado por linfócitos T estimulados por antígenos específicos de *Mtb* (ESAT- 6, CFP -10 e TB 7.7) para a versão comercial QuantiFERON-TB Gold In-Tube® (QFT-GIT) e a versão mais recente, e descrita mais sensível, QuantiFERON-TB Plus® (QFT-Plus), contendo apenas o ESAT-6 e CFP10 (TB1), que induzem resposta de células T CD4+, adicionado de

outros peptídeos (TB2) que induzem resposta das células T citotóxica CD8<sup>+</sup> (90). Tem a vantagem de requerer uma única visita e ser mais específico, não produzindo reação cruzada com a vacinação BCG e infecção prévia por MNT. Todavia, ainda é de elevado custo e demanda estrutura laboratorial para sua realização, além de produzir resultados indeterminados (4 a 10%) e menor sensibilidade (3,14,65,86,89,91). Nas crianças com quadro clínico suspeito de TB, a sensibilidade varia de 60 a 80% e naquelas com TB confirmada de 80 a 85%, sendo baixa em pacientes imunocomprometidos (cerca de 45%). A especificidade está em torno de 89 a 100% nas crianças vacinadas e varia de 90 a 95% naquelas não vacinadas (3,23,56,87). Segundo o manual de recomendações de controle da TB, do Ministério da Saúde (3) (2019), os IGRAs não devem ser aplicados para crianças < dois anos de idade, pela baixa sensibilidade, principalmente sob condições imunossupressoras.

Segundo o Consenso da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia<sup>(14)</sup> (2021), a PT e o IGRA são os métodos disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) na investigação da ILTB nas unidades de saúde públicas. O IGRA liberado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o QFT-GIT (3,15), para o rastreio em crianças de dois a 10 anos de idade (92). Ambos podem ser utilizados como métodos na investigação da ILTB, e uma vez excluída a presença de TB ativa, recomenda-se o tratamento preventivo para a ILTB (3,93). Porém, tem por desvantagem serem incapazes de diferenciar ILTB da forma ativa da TB e de prever a evolução de uma para a outra (14), além de possuírem sensibilidade limitada em crianças (particularmente nos menores de cinco anos de idade) e pacientes imunocomprometidos (3,16,41,54,86,91,93,94).

**A radiografia** de tórax (R-X) é o método de avaliação inicial, devido à sua facilidade de execução, acessibilidade, baixo custo e baixa dose de radiação, além de ser o principal exame de triagem em crianças com suspeita de TB (14,23). Apresenta baixa especificidade diagnóstica, mas é útil na avaliação da apresentação da doença, no diagnóstico diferencial, na busca de comorbidades/complicações e no seguimento terapêutico (14). O RX de tórax deve ser solicitado em todas as crianças e adolescentes com suspeita de TB e pode estar alterado antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos (3). Na criança, onde é maior a dificuldade em se estabelecer o diagnóstico bacteriológico, os métodos de imagem ganham mais relevância. Nos pacientes menores de 10 anos

de idade, predominam as imagens compatíveis com a TB primária ou o complexo primário, com consolidações parenquimatosas, segmentares ou lobares, além de linfadenopatias, especialmente hilares, para-traqueais e em região subcarinal (14,65). A linfadenopatia regional é a marca radiológica da infecção primária na infância (6,14,37,95). Nos menores de cinco anos de idade, especialmente os menores de dois anos, se evidencia imagens miliares (infiltrados micronodulares ou nodulares difusos) e características de pneumonia crônica. Na adolescência (10-19 anos de idade), o aspecto radiológico é o de TB pós-primária ou do tipo adulto, com acometimento predominantemente no terço superior ou no segmento superior do lobo inferior de ambos os pulmões, muitas vezes mostrando cavitações (3,6,95).

Entre os achados radiológicos, a adenopatia hilar, com ou sem compressão brônquica, é considerada sugestiva de TB primária nas crianças. Eventualmente, são observadas imagens cavitárias associadas ao padrão de disseminação brônquica e padrão difuso/ miliar, bem como comprometimento de outros locais, como a pleura (14). Porém, estas apresentações não são patognomônicas e outras como condensação, imagens cavitárias, infiltrado difuso e derrame pleural comumente se confundem com outras causas de acometimento pulmonar (14,23,66). Há também acentuada variação inter observacional do exame, com a especificidade em torno de 74% e sensibilidade de 39% (14,95). Na TB secundária ou de reinfecção, das manifestações radiográficas possíveis, destacam-se as formas incipientes, nodulares, pneumônicas, cavitárias, pseudotumorais e extrapulmonares, principalmente em lobos superiores (15). Nos casos em que há dificuldade na avaliação da radiografia simples, e quando é possível, a tomografia de tórax (TC) pode ser indicada, por ser mais sensível e específica do que o RX, devendo ser realizada em pacientes sintomáticos respiratórios com alterações mal definidas ou duvidosas nos quais o contexto clínico-epidemiológico leva à suspeita de TB (14), especialmente nos casos de adenomegalias hilares com ou sem compressão brônquica e abdominais (3,16,23,56), sendo igualmente útil nos casos duvidosos de nódulos, cavidades, adenopatias intratorácicas ou outras alterações traqueobrônquicas, como espessamento das paredes, dilatação (56). Também se recomenda a ultrassonografia (USG) de tórax, em casos de suspeita de adenopatias intra-abdominais, como também no derrame pleural infrapulmonar (em substituição à incidência em decúbito lateral (Hjelm-Laurell) (14,56). A maioria

das crianças parece desenvolver sinais radiológicos após a infecção por *M. tuberculosis*, incluindo 60-80% das crianças com menos de dois anos de idade <sup>(6)</sup>.

Os **exames microbiológicos** são realizados através de bacterioscopia com pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pelo método de Ziehl-Nielsen (ZN) e de cultura *in vitro* do espécime clínico. Quando positivos, confirmam a TB ativa em pacientes adultos, com quadro clínico sugestivo de TB, e em sintomáticos respiratórios <sup>(3)</sup>. A baciloscopia, é o teste mais simples, rápido e de baixo custo. Apresenta sensibilidade de cerca de 80%, reduzindo para 20-60%, nos casos de coinfeção com HIV <sup>(3,14)</sup>. Porém, na faixa etária pediátrica, devido à natureza paucibacilar, aliada à dificuldade de expectoração voluntária, a sensibilidade da baciloscopia e da cultura diminui para 15-30% e 50% respectivamente <sup>(3)</sup>. A microscopia de fluorescência pode incrementar a capacidade de detecção do bacilo em 10%, o que também se pode ser obtido, com a microscopia convencional, após centrifugação e/ou sedimentação do escarro <sup>(14)</sup>. Nas situações de incapacidade de produção de escarro, a técnica de indução de escarro com solução salina hipertônica é útil. O material também pode ser obtido por meio de broncoscopia com lavado broncoalveolar (LBA) e nos casos suspeitos de TBE, a baciloscopia do material obtido também é indicada, apesar de menos sensível. Na TB ganglionar, o diagnóstico é realizado através de aspirado por punção por agulha ou ressecção ganglionar; na TB pleural, o líquido pleural apresenta-se com baixo rendimento para a pesquisa de BAAR (< 5%), em contraste com o empiema tuberculoso, cujo rendimento da baciloscopia é alto. A pesquisa dos níveis de adenosina desaminase (ADA), se constitui em alternativa fácil e rápida para diagnóstico da TB pleural no líquido pleural em adultos, apresentando sensibilidade e especificidade altas, de 88-90% e 83-92% respectivamente <sup>(14,58)</sup>. Em crianças mais jovens, recomenda-se coleta de amostras de lavado gástrico, se possível, ou amostras de escarro induzido, lavado broncoalveolar, swab laríngeo e aspirado nasofaríngeo <sup>(3,6,23,37,38)</sup>.

A cultura é considerada “padrão-ouro”, é sensível (80%) e específica (98%) nos espécimes do adulto; permite isolamento e especiação de micobactérias, além de avaliar a sensibilidade aos fármacos, todavia é morosa e laboriosa <sup>(3,14)</sup>. Na faixa etária pediátrica, a sensibilidade da cultura é mais baixa, variando de 7-40% <sup>(37)</sup>. Os métodos para cultura que utilizam a semeadura em meios sólidos, como o Löwenstein-Jensen e o Ogawa-Kudoh, são os mais comumente utilizados

por apresentarem a vantagem de ter menor custo e um baixo índice de contaminação. A partir do crescimento de micobactérias, é necessária a complementação com teste de especificação e teste de sensibilidade a antimicrobianos, por métodos bioquímicos, fenotípicos ou por técnicas moleculares <sup>(3,14)</sup>. É utilizada também na suspeita de TBE e, para avaliação de resistência aos fármacos, testam-se estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida <sup>(14)</sup>.

Os **testes rápidos moleculares** para TB (TRM-TB ou GeneXpert®) são baseados na amplificação de ácidos nucleicos para detecção de *Mtb* e também são úteis na triagem de cepas resistentes à rifampicina, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Na TB pulmonar, em criança, possui sensibilidade limitada de cerca de 66 %<sup>(37,96)</sup>, mas o custo elevado, necessidade de estrutura e pessoal qualificado, dificuldades de operacionalidade para utilização em campo ou local de triagem dos pacientes minimiza seu uso diagnóstico, assim como detecção de bacilos mortos ou inviáveis, impossibilita seu uso no diagnóstico dos casos de reingresso após abandono do tratamento e/ou nas recidivas <sup>(3)</sup>. O teste é rápido, com resultado disponível em média de 2 horas, a partir de uma amostra de escarro, e sensibilidade de 90% em adultos <sup>(14)</sup>. É indicado para o diagnóstico de casos novos de TBP e laríngea em adultos e adolescentes, em amostras de escarro espontâneo, escarro induzido, LBA e lavado gástrico, como também no diagnóstico de TBE em líquido, gânglios linfáticos e macerado de tecidos. O GeneXpert® MTB/RIF foi avaliado em 13 estudos que incluíram um total de 3.347 espécimes para o diagnóstico de TB pulmonar pediátrica, e mostrou sensibilidade que variou de 55 a 90% para escarro expectorado, de 40 a 100% para escarro induzido, e de 40 a 100% para lavagem gástrica ou aspirado <sup>(97)</sup>. Uma versão atualizada da técnica, o GeneXpert Ultra ou Xpert MTB/RIF Ultra, tem se mostrado mais sensível em crianças (63% a 67%) e alta especificidade (96% a 100%), sugerindo possível alternativa de diagnóstico, principalmente, em PVHIV, menores de 10 anos e na TBE, embora os estudos ainda sejam divergentes no grupo imunossuprimido <sup>(98,99)</sup>.

Os **métodos histopatológicos** também auxiliam no diagnóstico de casos de TB pulmonar e extrapulmonar, por meio de fragmentos de tecidos, cuja lesão se apresenta, usualmente, como granuloma com necrose de caseificação,

composto por histiócitos epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos<sup>(15)</sup>. Os granulomas sem necrose central podem fazer diagnóstico diferencial com outras doenças granulomatosas <sup>(12,14)</sup>. No diagnóstico da TB pleural, pode ser um aliado, juntamente à baciloscopia, aos testes moleculares e à cultura, pois a presença de granulomas pode ocorrer entre 50-97% dos casos, mesmo com positividade de culturas oscilando entre 40-80%. A ausência de BAAR positivo, pode dificultar o diagnóstico de TB ganglionar, uma vez que os granulomas podem estar presentes em outras doenças. Para tal, se faz necessária a complementação com cultura (positiva entre 50-90%) e métodos moleculares a partir do macerado do material biológico. Outras apresentações incluem granulomas intestinais (especialmente ileocecais), cutâneas (acompanhadas de áreas de vasculite) e ósseas <sup>(14)</sup>.

Em 2002, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose do MS do Brasil propôs um **sistema de pontos** para o diagnóstico de TB em crianças e adolescentes, negativos à baciloscopia ou com TRM-TB não detectado. Através de um algoritmo dos parâmetros estado nutricional, achados clínico-radiológicos, avaliação da PT e história epidemiológica de contato (sem envolver a confirmação bacteriológica), classifica a TB pulmonar como “pouco provável” ( $\leq 25$  pontos), “possível” (entre 30 e 35 pontos) e “muito provável” ( $\geq 40$  pontos). Para cada pontuação, são, então, preconizadas diferentes recomendações: quando a soma de pontos for  $\geq 40$  pontos, recomenda-se iniciar o tratamento para TB; para 30-35 pontos, orienta-se iniciar tratamento, a critério médico; e para soma  $< 25$  pontos, recomenda-se prosseguir com a investigação <sup>(3,14)</sup>. Em ponto de corte entre 30 e 40, o teste aumenta a sensibilidade diagnóstica (de 58 para 89%), mas diminui a especificidade (de 86 para 70%) <sup>(3,14)</sup>. Houve modificações no sistema de pontuação ao longo do tempo, com relação à interpretação da PT, a qual indica infecção por *Mtb*, se houver endureção  $\geq 5$  mm, mesmo nos pacientes vacinados com BCG ao nascer. A versão atual está no Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil, de 2019, e foi resumida no Quadro 2.

<b>Quadro clínico</b>	<b>Quadro radiológico</b>	<b>Contato de adulto com tuberculose</b>	<b>PPD (ou PT)</b>	<b>Estado nutricional</b>
Febre ou sintomas como tosse, adinamia, expectoração, emagrecimento, sudorese > 2 semanas (15 pontos)	Adenomegalia hilar ou padrão miliar Condensação ou infiltrado (com ou sem escavação) inalterado > 2 semanas Condensação ou infiltrado (com ou sem escavação) > 2 semanas evoluindo com piora ou sem melhora com o uso de antibióticos para germes comuns (15 pontos)	Próximo, nos últimos dois anos (10 pontos)	PPD entre 5-9 mm (5 pontos)  PPD ≥ 10 mm (10 pontos)	Desnutrição grave (5 pontos)
Assintomático ou com sintomas < 2 semanas (0 pontos)	Condensação ou infiltrado de qualquer tipo < 2 semanas (5 pontos)	Ocasional ou negativo (0 pontos)		
Infecção respiratória com melhora após uso de antibióticos para germes comuns ou sem antibióticos (10 pontos)	Radiografia normal (5 pontos)	Ocasional ou negativo (0 pontos)	PT < 5 mm (0 pontos)	Peso ≥ percentil 10 (0 pontos)

Quadro 2 – Diagnóstico da tuberculose pulmonar em crianças e adolescentes com baciloscopia e/ou teste rápido negativos (Adaptado de Silva, 2021).

Existe um perfil de risco distinto de TB entre as crianças, sendo que as mais novas e os adolescentes têm maior risco de progressão de infecção para doença, do que crianças entre 5 e 10 anos de idade <sup>(41)</sup>. Atenção deve ser dada aos casos-índices que apresentam bacterioscopia negativa, com cultura e/ou TRM-TB positivos, pois também podem transmitir o bacilo <sup>(3)</sup>. Logo, é importante identificar os ILTB, visto que o uso de isoniazida (H) por seis meses, conforme normas do Ministério da Saúde (MS), diminui o risco de progressão da TB infecção (latente) para TB doença <sup>(3)</sup>. Tomando em consideração a Nota Informativa Nº 5/2021, do MS, outras opções seriam o uso da rifampicina por 4 meses (em 120 doses diárias) ou a rifapentina/isoniazida por 12 semanas, com tomada semanal <sup>(88)</sup>.

### 1.1.8 ESTRUTURA DE ALGUNS ANTÍGENOS DA MICOBACTÉRIA COM RELEVÂNCIA DIAGNÓSTICA

A sequência completa do genoma de *Mtb* foi descrita em 1998 e inclui cerca de 4 milhões de pares de bases e 4000 genes, em parte, ainda não caracterizados ou desconhecidos <sup>(46,48,100)</sup>. Estudos de genômica comparativa em cepas virulentas de *Mtb*, *M. bovis*, avurulentos Mbv BCG e *Mtb* H37Ra demonstrou a presença de 16 regiões de diferença (RD) entre estes microrganismos <sup>(101)</sup>. Este sistema secretório atua na patogênese de *Mtb* em várias vias desde a virulência até a imunorregulação. Estas regiões codificam para 129 antígenos associados. A RD1 (codifica para 11 proteínas), a RD2 (codifica para 13 proteínas) e a RD3 (codifica para 12 proteínas), as quais foram encontradas ausentes comparando *Mtb* H37Rv e várias cepas de *M. bovis* BCG <sup>(102)</sup>. O locus RD1, que abrange os quadros de leitura abertos *Rv3871* a *Rv3879c*, está preservado essencialmente nas cepas patogênicas *Mtb*, *M. africanum* e *M. bovis*, e ausente em cepas vacinais de *M. bovis* ou Bacillus Calmette-Guérin (BCG) e na maioria das MNT, indicando que, talvez, este tenha sido o evento de deleção primário responsável pela atenuação de *M. bovis* <sup>(101,103-105)</sup>. Entre os principais antígenos do locus RD1, estão o alvo antigênico secretório precoce-6 (ESAT-6) e a proteína de filtrado de cultura-10 (CFP-10), codificados pelos genes *Rv3874* e *Rv3875* (Figura 3), respectivamente, e expressas precocemente na infecção por *Mtb* <sup>(105-107)</sup>.

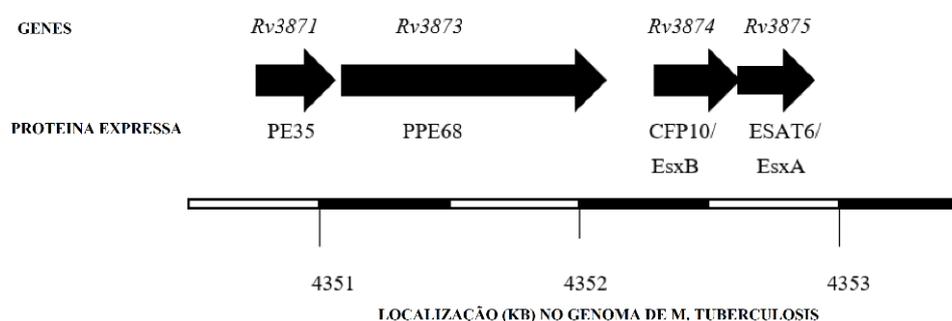


Figura 3 – Organização dos genes codificadores dos antígenos ESAT-6 e CFP10, entre outros, na região de diferença 1 (RD1) de *Mycobacterium tuberculosis* (Adaptado de Berthet, 1998).

O ESAT-6 é a proteína mais caracterizada dentro da região RD1 e foi proposta como ferramenta de diagnóstico de infecção por *Mtb*, especialmente nos

países em desenvolvimento, juntamente com o CFP-10, dada a importância de sua secreção na virulência micobacteriana <sup>(104)</sup>. Este peptídeo é essencial para evitar a união fagossoma-lisossoma e a apoptose (morte celular programada), permitindo, assim, a entrada do bacilo no citoplasma<sup>(62)</sup>. Entretanto, ambos os antígenos são expressos nas MNT *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens* e *M. marinum*, das quais apenas a primeira induz patologia similar ao *Mtb*, mas como é rara de ocorrer não desafia a especificidade destes antígenos para *Mtb* nos IGRAs comerciais.

O antígeno 16-kDa alfa-cristalina (acr, Rv2031c, hspX, 14 kDa antigen, HSP16.3), codificado pelo gene *Rv2031c* localizado no operon Rv2028c-2031c e que atua como principal regulador do operon<sup>(108)</sup> (Figura 4), é descrito como fortemente imunogênico para células T e B, sendo indutor de produção de anticorpos<sup>(109)</sup>. É a proteína dominante produzida por *Mtb* durante o estágio latente da infecção, sendo essencial para a replicação bacteriana no interior dos MΦ, para a manutenção da estabilidade proteica do bacilo e recomendado como um dos antígenos componentes nas estratégias de vacinas, visando respostas imunes protetoras contra a infecção primária por *Mtb*, bem como contra a reativação da ILTB <sup>(105,110,111)</sup>. Todas as quatro proteínas codificadas no operon são idênticas no *M. bovis* e, portanto, corroboram a coevolução próxima destas duas espécies do MTBC.

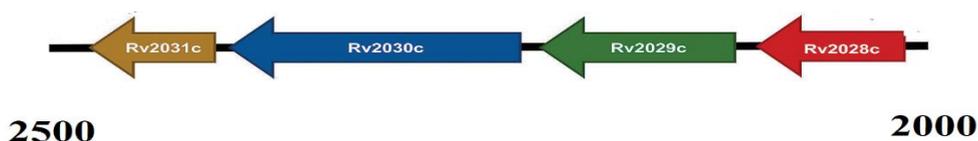


Figura 4 – Representação esquemática da organização do operon Rv2028C–Rv2031, onde o gene *Rv2031c* é o principal regulador. Localização em kb no genoma entre 2000 e 2500 (Adaptado de Mushtaq, 2015).

A lipoproteína glicosilada transportadora de fosfato periplasmático 1 (PstS1 ou 38kDa), codificada pelo gene *Rv 0934*, é caracterizada como uma adesina, se liga ao receptor de manose do macrófago e promove a fagocitose, além de induzir repostas Th1<sup>(112,113)</sup> e expressão diferencial de interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) entre TB, ILTB e expostos ao *Mtb*, sugerindo potencial na imunidade protetora e no diagnóstico <sup>(114,115)</sup>. Em estudo de acompanhamento de 120 participantes com ILTB, observou-se que a combinação PstS1:CFP10 mostrou níveis de resposta de IFN-

$\gamma$  semelhante a CFP-10-ESAT6. Foi sugerido que essa estimulação é maior em pacientes com ILTB do que naqueles com TBP, portanto com potencial antigênico na detecção de ILTB <sup>(116)</sup>.

Genes associados à latência foram descritos como sendo expressos na adaptação à hipóxia e às baixas concentrações de óxido nítrico, nutrientes e pH, em correlação com os eventos que provavelmente ocorrem com os bacilos contidos nos granulomas tuberculosos <sup>(109,117,118)</sup>. Esta dormência de *Mtb* no hospedeiro em meio adverso é atribuída à sua sofisticada capacidade de evadir-se da resposta imune, permitindo sua indefinida persistência. As principais estratégias adotadas por *Mtb* para manter sua fase de latência incluem manifestação imunológica [manipulação do receptor toll-like (TLR), citocina e função da célula imune] e bioquímica (desenvolvimento de resistência a intermediários reativos). Ensaio *in vivo* e *in vitro* indicam o gene regulador ou *DosR* (*dormancy survival regulon*) como principal durante o estágio de latência de *Mtb*, o qual, por sua vez é regulado pela mesma proteína reguladora de resposta *DosR*; ele ativa a expressão gênica de 48 proteínas, dentre estas, os antígenos Rv2029c, Rv2031c, Rv2628, Rv2034 e Rv3353 <sup>(109,118-124)</sup>. Entretanto, uma vez que *Mtb* sai da condição hipóxica, o regulon *DosR* é também crítico para a rápida multiplicação bacilar por meio de fatores promotores de ressuscitação (*Rpf*).

O *Rv2029c* (*pfkB*) é membro do regulon *Dos* e é regulado positivamente durante a hipóxia e em  $M\Phi$ , é um gene não essencial para o crescimento de *M. tuberculosis* *in vitro* ou *in vivo* e codifica uma proteína que funciona como uma 6-fosfofrutoquinase (*PfkB*), estando envolvida na glicólise, convertendo o açúcar-1-P em açúcar-1, 6-P <sup>(125)</sup>. Em estudo de Leyten e colaboradores <sup>(126)</sup> (2006), envolvendo resposta de linfócitos T a proteínas codificadas pelo *DosR*, observou-se que havia maior resposta de IFN- $\gamma$  em indivíduos PPD + com relação àqueles que desenvolveram TB ativa (dentre eles, os antígenos Rv 2029 e Rv 2628). Essa seria uma indicação de que os indivíduos PPD + reconhecem mais antígenos de latência. O mesmo estudo mostrou respostas mais pronunciadas de IFN- $\gamma$  ao antígeno CFP-10 (secretado durante replicação ativa do *Mtb*) em indivíduos com TB ativa.

Por outro lado, o *Rv 2034* é descrito ser um regulador transcricional envolvido na regulação do metabolismo lipídico, na adaptação à hipóxia e

estresse nutricional em *Mtb*, sendo, portanto, um gene regulador do *Dos R* <sup>(127)</sup>. (Figura 5)

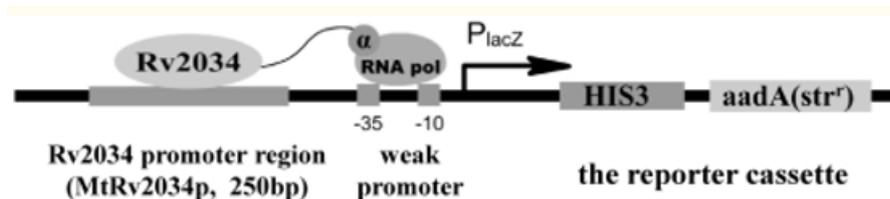


Figura 5 – Representação esquemática da sequência da região promotora Rv 2034 (Adaptado de Gao, 2012).

O *Rv 3353* é um gene cujo produto protéico ainda não foi identificado, mas resposta de IFN- $\gamma$  foi demonstrada em indivíduos TCT+/IGRA+, mostrando indiretamente que a proteína é conhecida do sistema imune do hospedeiro durante a infecção por micobactérias. Sua expressão foi demonstrada 12,44 vezes aumentada em *Mtb* com 24 horas em estado de supressão nutricional, enquanto ambos, *Rv2034* and *Rv3353*, foram expressos *in vivo* durante infecção experimental em modelo animal <sup>(128,129)</sup>.

Portanto, todos estes antígenos representam um interessante candidato a vacina, bem como possível biomarcador de TB.

### 1.1.9 BIOMARCADORES E TUBERCULOSE

No contexto desafiador do manejo da TB, testes POC seriam desejáveis para auxiliar no diagnóstico ou triagem de TB/ILTB, com dosagem única de biomarcadores, por intermédio de dispositivos portáteis, em diversos espécimes clínicos não-respiratórios como sangue, urina e ar exalado, dentre outros, para o atendimento inicial dos pacientes com suspeita de TB <sup>(26)</sup>.

Anticorpos específicos e citocinas, dentre outras moléculas, com potencial expressão diferencial entre indivíduos saudáveis, infectados e doentes, podem ser úteis para melhor compreensão da fisiopatologia da doença. Podem ainda, ter aplicabilidade no diagnóstico e para monitorar o tratamento, especialmente na faixa etária infanto-juvenil <sup>(23,26,32,64,93)</sup>, dado o potencial de realização do diagnóstico de forma mais rápida e precisa em uma faixa etária que usualmente apresenta lesões paucibacilares e testes bacteriológicos negativos; similarmente

o observado em pacientes coinfectados TB-HIV <sup>(26,130)</sup>. A identificação precoce dos indivíduos com ILTB é importante, visto que se pode implementar terapia preventiva, para redução do risco de sua progressão para TB doença e que seu uso na infância deve levar em consideração o sistema imune, cuja atividade difere com a faixa etária <sup>(23)</sup>.

A obtenção de biomarcadores acurados e de simples operacionalidade na TB permanece um grande desafio, a despeito de inúmeros estudos e do sequenciamento do genoma micobacteriano, pois nenhum até o momento, embora muitos tenham potencial, se caracteriza como POC, quer sejam microbiológicos, imunológicos ou transcriptômicos (Quadro 3) <sup>(131-133)</sup>.

Biomarcadores	Urina	Sangue		Hálito
		Não estimulado	Estimulado	
<i>M. tuberculosis</i>	LAM*, Ag 85b# DNA	DNA, Ag 85b#		
Hospedeiro	IP10	MicroRNA, Perfis metabolômicos e proteômicos, IP10, Assinaturas transcricionais e metabólicas	Caracterização fenotípica de células ativadas por fluorescência, ELISA Assinaturas transcricionais	Compostos orgânicos voláteis (VOCs)

Quadro 3 – Biomarcadores com potencial para diagnóstico *point of care* (POC) da tuberculose.

\*Único disponível no formato POC para detecção do antígeno micobacteriano lipoarabinomanana (LAM), presente na urina do hospedeiro.

# Ag85 é uma família de três proteínas (Ag85A, Ag85B e Ag85C) com atividade enzimática, que liga ácidos micólicos ao arabinogalactano da parede celular (Adaptado de García-Basteiro, 2017).

O predomínio de testes mais elaborados tem limitado sua efetiva implantação nos setores básicos ou deficitários de saúde pública, retardando o diagnóstico e o controle da TB, mostrando a necessidade de ofertas diagnósticas variadas para auxiliar a erradicação da TB.

### 1.1.9.2. As Imunoglobulinas (Ig)

Anticorpos (Ac) ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas heterodímicas, sintetizadas por LB ativados, compostas por duas cadeias pesadas (H) e duas leves (L). Elas são separadas funcionalmente em domínios variáveis (V) que se ligam a antígenos e domínios constantes (C) que especificam funções efetoras, como ativação do complemento ou ligação a receptores Fc (fração cristalina) <sup>(134)</sup> (Figura 6). São definidos pelos isotipos de cadeias pesadas (H) ( $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  e  $\epsilon$ ). Em humanos, existem cinco diferentes isotipos de Ig <sup>(134)</sup>, cujas funções estão descritas no Quadro 4.

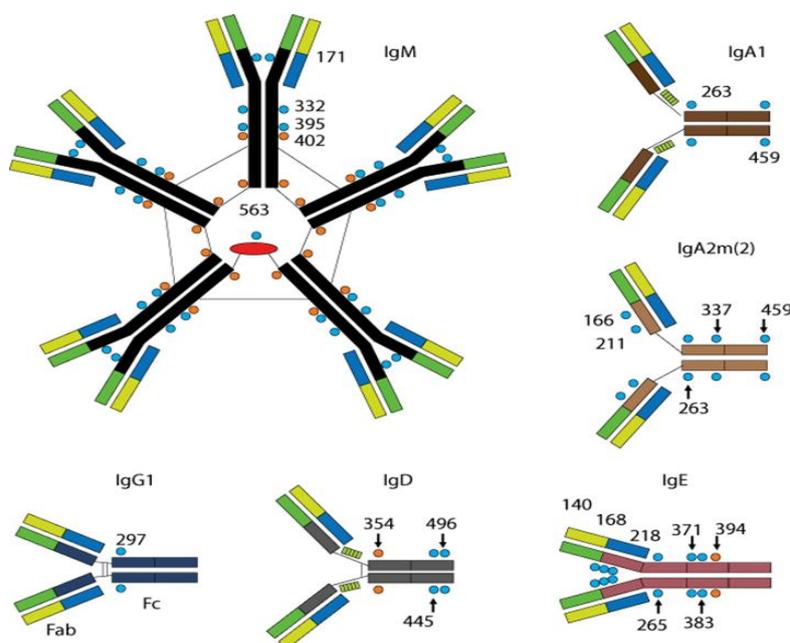


Figura 6 – Representação esquemática da estrutura e glicosilação das imunoglobulinas (Adaptado de Schroeder e cols, 2010).

O Quadro 4 apresenta os isotipos de anticorpos e os correlaciona com suas funções.

	<b>IgA (<math>\alpha</math>)</b>	<b>IgD (<math>\delta</math>)</b>	<b>IgE (<math>\epsilon</math>)</b>	<b>IgG (<math>\gamma</math>)</b>	<b>IgM (<math>\mu</math>)</b>
Localização	Saliva, lágrimas, muco, leite materno e fluido intestinal	Sangue, superfície dos linfócitos B	Pele, pulmões e membranas mucosas	Sangue e nos fluidos dos tecidos	Sangue e no sistema linfático
Função	Protege contra patógenos ingeridos e inalados	Pouco clara, acredita-se que suporta a maturação e a	Associadas as manifestações alérgicas, e resposta protetora contra parasitas	Ajudam na resposta protetora às infecções virais e bacterianas	Primeira linha de defesa contra infecções. Papel importante na regulação

		ativação dos linfócitos B			imunológica.
--	--	---------------------------	--	--	--------------

Quadro 4 – Isotipos de anticorpos e suas funções (Adaptado de Schroeder e cols, 2010).

A IgG corresponde a 70-75% das proteínas do soro, sua plasticidade permite realizar todas as funções das moléculas de imunoglobulinas. Está presente no soro em quatro subclasses e diferem em abundância: IgG 1 (65%), IgG 2 (22%), IgG 3 (7%) e IgG 4 (4%) <sup>(135)</sup>. Apesar de apresentarem ~ 90% de similaridade em sua sequência de aminoácidos, as diferenças são suficientes para lhes conferir singularidades em relação a ligação antígeno-anticorpo, meia vida, transporte placentário, ativação do complemento e células efetoras. Apenas a IgG4 não fixa complemento nem faz opsonização <sup>(134)</sup>.

A glicosilação das imunoglobulinas é importante na ligação a receptores Fc (FcγR) em células efetoras, bem como mediadores imunológicos. Quando as sequências de IgG são mutadas de tal forma que a glicosilação é eliminada, há redução ou nenhuma ligação da IgG glicosilada a FcγR. Isso levou à sugestão de que o N-glicano em Asn297 era crítico para o envolvimento de IgG com FcγR <sup>(134)</sup> (Figura 6). As diferenças são definidas porque os isotipos e subclasses de anticorpos interagem diferencialmente com três classes de receptores FcγR das células, determinando variedade de células efetoras ativadas e sua resposta imune. IgG1 e IgG3 ligam-se a todas as três classes FcγR. A IgG4 liga-se apenas a FcγRII e III, embora significativamente mais fraca do que a ligação de IgG1. E IgG2 liga-se apenas a FcγRII <sup>(134,135)</sup>.

Embora exista similaridades na resposta imune das subclasses, diferenças são evidenciadas, tais como IgG1 e IgG3 respondem predominantemente a Ag proteicos, enquanto IgG2 e IgG4 a Ag polissacarídeos. Portanto, diferenças na natureza de determinados Ags induzem predominância de subclasses diferentes da esperada, e isto é motivo de investigações associadas a proteção e desenhos vacinais <sup>(135)</sup>.

Vários estudos demonstram a relevância da imunidade humoral na TB, que continua sob investigação, todavia, embora largamente estudados no diagnóstico da TB, os testes sorológicos 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

(27,28). A OMS não recomenda nenhum teste sorológico comercialmente disponível (29,30), mas incentiva as pesquisas na busca de biomarcadores melhores (24).

Achkar & Ziegenbalg (32) (2012) revisaram 23 estudos sobre uso da sorologia como método diagnóstico na TB na faixa etária pediátrica e observaram grandes variações entre os níveis de anticorpos, bem como as taxas de sensibilidade (14 a 85%) e especificidade de (86 a 100%). Foram, entretanto, encontradas dificuldades na comparação dos resultados por diferenças na metodologia, tais como: idade dos pacientes, composição antigênica isolados ou combinados, uso de *kits* comerciais ou métodos *in house* e forma clínica de TB apresentada pelos pacientes nas pesquisas (confirmada, não confirmada e improvável). Assim, é oportuno intensificar pesquisas por biomarcadores, os quais devem ser submetidos à avaliação, aplicados com maior simplicidade ao atendimento do paciente, principalmente em crianças com TB, em decorrência da natureza paucibacilar da doença e pelas limitações de coleta de espécime clínico, especialmente nos menores de cinco anos, uma vez que a resposta imune pode variar de acordo com a faixa etária (32). Nonyane e colaboradores (24) (2018), avaliando um painel multiplex de antígenos (Ag) de *Mtb* para sorodiagnóstico de TB na criança não infectada pelo HIV, observaram que as diagnosticadas com TB ativa apresentaram respostas sorológicas variáveis (com relação à idade). Sugeriram que isto se devia aos Ac maternos e à posterior maturação das respostas dos LB durante a infância, nas diferentes manifestações da TB, o que pareceu ser mais evidente no grupo de participantes maiores de cinco anos.

Proteína altamente imunogênica, como a PstS1, teve seu potencial diagnóstico na ILTB em adultos, para detecção de IFN- $\gamma$  e subclasses de IgG, a partir de uma construção contendo peptídeos da proteína, fusionados ao antígeno micobacteriano CFP10 (PstS-1<sub>(285-374)</sub>:CFP10), e demonstrou sensibilidade e especificidade similares ao complexo proteico internacionalmente utilizado ESAT-6:CFP-10<sup>(136)</sup>, além de alta reatividade de IgG2 em ILTB (81). Schmidt e colaboradores (137) (2020) descreveram estudo em crianças e adolescentes, em que a reatividade diferencial de IgG anti-Mce1A (proteína de parede celular de *Mtb*) poderia ser utilizada para distinguir a TB com baciloscopia positiva da ILTB com sensibilidade de 74% e especificidade de 64%, inclusive em menores de cinco anos.

Em estudos de resposta imune mediada por subclasses de IgG, realizados com antígenos associados à latência, observou-se em especificidade  $\geq 90\%$ , sensibilidade variando de alta a moderada para detecção de TB em adultos para IgG2 (86,7%) e IgG1-Rv3353 (69,2%), e IgG1-PstS1<sub>(285-374)</sub>: CFP10 (53,3%). Foi evidenciado pela primeira vez, níveis mais elevados de IgG2-PstS1<sub>(285-374)</sub>: CFP10 e IgG2-Rv3353 em indivíduos com ILTB vs controles expostos não infectados, em comparação com a imunorreatividade menor ou ausente entre indivíduos com TB<sup>(81)</sup>. Outro antígeno associado à latência, Rv2628, foi descrito por estimular forte resposta em indivíduos infectados remotamente, sugerindo diferenciar infecção recente de remota, além de mostrar alguma associação à proteção contra TB<sup>(117)</sup>. No estudo de Araújo e colaboradores<sup>(81)</sup> (2018), as IgG1-Rv2628 e -Rv2034 mostraram imunorreatividade associada a TB, enquanto as de IgG3-Rv2029 e -Rv2031 estavam associadas a ILTB. Embora já se tenha observado alta reatividade de IgG1 para os antígenos Rv3353, Rv2628 e Rv0867, houve redução após início do tratamento, sugerindo que este seja um potencial biomarcador da eficácia do tratamento<sup>(138)</sup>. Pouco se conhece sobre a relevância dos subtipos de imunoglobulinas, induzidos pela maioria destes antígenos na TB/ILTB da criança.

Assim, o presente estudo propõe conhecer a imunorreatividade de subclasses de IgG, frente a antígenos micobacterianos, associado à latência ou a fase de crescimento ativo, estudo este raro, considerando a população pediátrica.

## **1.2 JUSTIFICATIVA**

O diagnóstico da TB em crianças e adolescentes possui limitações, como a difícil distinção entre ILTB e TB ativa, por inespecificidade de apresentação clínica e das alterações radiológicas, além de sua característica paucibacilar, que compromete os resultados dos testes microbiológicos.

Visando o controle da TB, dentre várias ações, são imprescindíveis pesquisas direcionadas a métodos diagnósticos acurados, de baixo custo e de fácil operacionalidade e que possam ser realizados em diferentes espécimes biológicos, pois os testes moleculares, embora promissores, têm limitações no diagnóstico da TB ativa na criança. Na criança, testes sorológicos são desejáveis por preencher estes critérios, mas a acurácia é importante e deverá apresentar características de perfil de produto alvo, definido pela Organização Mundial da

Saúde (OMS) para o diagnóstico, triagem de suspeitos de TB ou monitoramento de tratamento de TB <sup>(24,139)</sup>. Na ILTB, a acurácia do biomarcador deve estar associada à identificação daqueles em maior risco de adoecimento, isto é, crianças contactantes de TB, assintomáticas, sem alteração radiológica suspeita de TB, infecção pelo HIV ou outra morbidade imunossupressora. Sem avanços que prevejam o desenvolvimento de TB ativa e da ILTB, a fim de proporcionar o tratamento precoce e evitar evolução para doença ativa e transmissão, não seremos capazes de erradicar adequadamente os focos de TB e alcançar a estratégia da OMS, que é reduzir as mortes por TB a zero nas próximas décadas <sup>(5,19)</sup>. A OMS reconhece que a TB, na criança, adiciona dificuldades no controle da TB, pois o manejo diagnóstico da doença é desfavorável e os pacientes com ILTB poderão, em algum momento, abrir quadro de TB doença. Logo, o presente estudo, utilizando moléculas antigênicas de *Mtb*, associadas à latência e/ou à infecção, pode contribuir na identificação de biomarcadores do soro em criança, visto que os estudos nesta população são raros.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estimar a imunorreatividade de subclasses de IgG a antígenos micobacterianos, associados à latência ou fase de crescimento ativo (Rv2034 e RV3353, respectivamente) em soros de crianças e adolescentes diagnosticados com TB ou ILTB, e controles, utilizando teste convencional imunoenzimático *in house*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a imunoreatividade dos subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4
- Estimar a sensibilidade e a especificidade dos testes imunoenzimáticos “*in house*”
- Correlacionar a resposta imune humoral com as características demográficas e clínicas dos participantes

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 DESENHO DE ESTUDO**

Trata-se de estudo de corte transversal.

#### **3.2 DADOS, COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS**

Os soros utilizados neste estudo, foram previamente obtidos da tese de doutorado defendida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas/Faculdade de Medicina/ Universidade Federal Fluminense (UFF), Rio de Janeiro (RJ), intitulada “Biomarcadores séricos: ferramenta para o diagnóstico diferencial entre tuberculose latente e tuberculose pulmonar em crianças e adolescentes” <sup>(23)</sup>. Os pacientes considerados elegíveis, para o estudo prévio, responderam um questionário eletrônico (Magpi®), para a coleta de dados sociais, epidemiológicos e demográficos. Em seguida foi realizada coleta de 2 ml de sangue venoso periférico por profissional experiente, preferencialmente no momento da definição do caso. Os espécimes foram transportados para o Laboratório Multidisciplinar de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas (LAMAP) da Universidade Federal Fluminense (UFF), para processamento por centrifugação a 3500 RPM por 5 min, seguida de retirada dos soros, que foram depositados em microtubos de 30 µL, em diferentes alíquotas, e estocados em freezer -80°C. As alíquotas foram transferidas ao Laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL)/IOC/FIOCRUZ e mantidos a -20°C, sem sofrer sucessivos congelamento e descongelamento, até a hora do uso. Todos os experimentos foram realizados no LAMICEL.

#### **3.3 ORIGEM DOS SOROS**

Os soros foram previamente obtidos de participantes, atendidos em diferentes instituições de saúde: Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP/UFF), Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF)/Fiocruz – Rio Janeiro, RJ, Ambulatório de TB, PS Jorge

David (PSJD)- Nilópolis, Ambulatório de TB - Polo Sanitário Hélio Cruz (PSHC) e Polo Sanitário Washington Luiz (PSWL)– São Gonçalo, Ambulatório de TB, PS integrante do programa de controle da TB da Secretaria de Saúde de Itaboraí (PS/SSI), Hospital Municipal Getúlio Vargas Filho (HGV) - Niterói (unidade de internação pediátrica), Ambulatório de Tisiologia do Centro Municipal de Saúde de Duque de Caxias (CMSDC).

### **3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Participantes de zero a 19 anos, de ambos os sexos, com as seguintes características: Contatos de pacientes com TB sintomáticos ou não e pacientes sintomáticos com suspeita clínico-radiológica de TB e diagnosticados de acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde <sup>(3)</sup>.

### **3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Participante que inicialmente recebeu o diagnóstico de TB, mas que durante o acompanhamento pelas equipes das unidades de saúde teve troca de diagnóstico.

### **3.6 PERÍODO DO ESTUDO**

Os espécimes clínicos foram coletados nas instituições descritas no item 6.2, no período de 01/09/2014 a 30/06/2017.

### **3.7 POPULAÇÃO DE ESTUDO**

Crianças e adolescentes recrutados, os quais foram avaliados por médicos assistentes e submetidos a exames de rotina, para detecção ou exclusão de TB ativa, nas unidades participantes do estudo prévio.

### **3.8 POPULAÇÃO ELEGÍVEL**

Crianças (zero a 9 anos, 11 meses e 29 dias) e adolescentes (10 a 19 anos), com TB ativa, ILTB ou controles, recrutados nas unidades de origem, e fontes dos soros coletados no estudo prévio. Considerou-se a adolescência como o período de vida entre 10 e 19 anos de idade, segundo a definição da OMS <sup>(140)</sup>.

#### **3.8.1 PARTICIPANTES COM TUBERCULOSE**

No estudo prévio, as crianças e os adolescentes com sintomas suspeitos de TB e/ou com história de contato com adultos com TB, foram avaliadas nas respectivas clínicas de atendimento. Foram diagnosticados com TB pulmonar ou extrapulmonar aqueles com história de febre, tosse seca ou produtiva, dor torácica, desconforto respiratório, sudorese noturna e/ou perda de peso, com diagnóstico clínico, radiológico e/ou laboratorial (positivos para PT, e/ou BAAR, e/ou cultura e/ou TRM) e aqueles que receberam o diagnóstico de TB através do sistema de pontuação do Ministério da Saúde <sup>(141)</sup>. Os pacientes TB foram classificados em TB confirmada, se a cultura e/ou o TRM-TB foram positivos em algum espécime clínico e TB não confirmada, quando esses testes foram negativos ou não realizados, conforme os critérios de Graham <sup>(33)</sup> e, ainda, subclassificados em "TB BACT+" quando algum exame bacteriológico (BAAR e/ou TRM e/ou cultura) foi positivo, visto que um exame BAAR+, associado a quadro clínico, epidemiológico, imunológico e radiológico, tem a probabilidade maior de ser TB. Para o presente estudo foram incluídas amostras de soro de 32 participantes com TB pulmonar e 13 amostras de participantes com TB extrapulmonar.

#### **3.8.2 PARTICIPANTES COM ILTB**

Participantes com história de contato para TB, assintomáticos, com radiografia de tórax normal e prova tuberculínica positiva (PT  $\geq$  5mm e PT  $\geq$  10mm de acordo com a idade, o estado de imunossupressão e o status de vacinação BCG <sup>(141)</sup>. Para o presente estudo, estavam disponíveis 14 soros. Vale ressaltar que, no período da tese que gerou as amostras para este estudo, o MS considerava como resposta positiva, a medida da induração igual ou maior do que

5 mm para os pacientes não vacinados com o BCG ou vacinados há mais de dois anos, e igual ou maior a 10 mm, naqueles vacinados há menos de dois anos <sup>(141)</sup>.

### **3.8.3 PARTICIPANTES CONTROLES SAUDÁVEIS**

Participantes com história de contato para TB, com radiografia de tórax normal e PT negativa. Para o presente estudo, 13 soros eram de participantes com estas características, aqui designados de HC.

### **3.9 PREPARO DE POOLS DE SOROS PARA PADRONIZAÇÃO DO ELISA, IN HOUSE (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)**

Inicialmente, para a padronização do ELISA, *pool* contendo 14 soros de crianças com TB confirmada (*pool* +) e *pool* de 18 assintomáticos, sem história de TB conhecida e com PT negativa (*pool* -), provenientes da soroteca do LAMICEL, foram preparados. Os *pools* foram preparados com 30 µL de cada um dos soros dos respectivos grupos. Estes foram também utilizados para controle dos resultados dos experimentos, sendo aplicado em cada placa de ensaio.

### **3.10 ANTÍGENOS**

Antígenos recombinantes de *Mtb*, associados à latência e fase ativa de crescimento (Rv2034 e Rv3353), foram produzidos em *Escherichia coli*, e doados pelo Dr. Tom Ottenhoff (Leiden University Medical Centre, The Netherlands).

### **3.11 ELISA**

A padronização e os posteriores ensaios foram desenvolvidos de acordo com Araújo *et al* <sup>(81)</sup> (2018) para monitorar a presença de Ac. Flat Botton imunoplate C96 (Nunc, Maxisorp, Thomas Sci, USA) foram adsorvidas com 50µL do antígeno em quatro concentrações 0,5, 1, 2 e 2,5µg/ml, diluído em tampão carbonato–bicarbonato pH9,6 (NaHCO<sub>3</sub> 15mM; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15mM). Em seguida, as placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C, durante duas horas e

posteriormente lavadas, por 3 vezes seguidas, com 200 $\mu$ L de tampão fosfato-salino, contendo 0,05% de tween20 (Sigma. USA) (PBST) pH7,4 (NaCl 9,92mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 90mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18,98mM; 0,05% Tween 20). Após as lavagens, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação dos poços. Para isto, foi adicionado 100 $\mu$ L do tampão de bloqueio (PBST 0.01% + 5% de soroalbumina bovina) e as placas foram incubadas a 37°C, em câmara úmida, por duas horas. Seguindo-se de nova etapa de lavagem, foram adicionados, em duplicata, 50 $\mu$ L do *pool* de soros de pacientes com TB, com ILTB e controles sem exposição à TB, diluídos em concentrações que variaram entre 1:2 a 1:1.1280 e incubadas durante 1h a 37°C em câmara úmida, seguido da etapa de lavagem descrita acima. Na etapa seguinte, foram adicionados individualmente 50 $\mu$ L de anticorpo anti-humano IgG 1, IgG2, IgG3 ou IgG4 (Invitrogen - MA, USA), conjugado à peroxidase em diferentes concentrações 0,25; 0,5 e 1 $\mu$ g/ml, nos respectivos poços. As placas foram incubadas em câmara úmida, a 37°C, por 1h e, em seguida, foi realizada a lavagem das placas. A etapa de revelação consistiu na adição de 50 $\mu$ L de substrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), seguido de incubação por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida mediante adição de 50 $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico 2,5N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), procedendo à leitura das absorbâncias com filtro de 450 nm no leitor de placas (BioTek Instruments U.SA). Após padronização das variáveis Ag, Ac e conjugados, foram realizados os testes de avaliação dos soros, individualmente, na concentração ideal definida. *Pool* de soros de TB ou ILTB foram adicionados às placas dos diferentes testes, para controle de variabilidade inter-experimental. Um controle branco (*Blank*) foi aplicado em cada placa e a densidade óptica (DO) não ultrapassava de 0,1, caso contrário é considerado erro operacional e os testes eram repetidos.

### **3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O banco de dados contendo as informações demográficas, clínicas e epidemiológicas dos participantes para este estudo foi obtido de acordo com o item 3.1 usando o *software* Excel e as características da população foram analisadas. Para as análises estatísticas e a construção dos gráficos foram

utilizados os softwares SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) e GraphPad Prism6.0 (GraphPad Software Inc.CA, USA para Windows. Para os ensaios de padronização, os resultados foram avaliados em média e para escolha do melhor resultado a ser utilizado no estudo foi realizado o teste de Mann-Whitney para comparar as distribuições das densidades óticas (DO) entre os *pools* de TB e controles;  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Foram utilizados testes não-paramétricos para comparações da média das densidades óticas (DO) obtidas entre mais de dois Grupos (Mann Whitney) e de 3 grupos (Kruskal-Wallis), com correção de Dunn. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As positivities dos ensaios para as diferentes proteínas de *Mtb* foram calculadas através da Curva ROC (*Receiver Operating Curve*) para obtenção dos melhores pontos de corte (*cut-off*) para os testes, baseados nas melhores sensibilidades e especificidades. Análise combinatória dos resultados das diferentes proteínas aqui testadas foi realizada, a fim de avaliar se a combinação dos resultados favoreceu a sensibilidade, sem alterar a especificidade do teste.

### **3.13 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense (CEP-UFF) em 10 de agosto de 2015, sob o número CAAE 45470115.0.0000.5243 e a aprovação se encontra em anexo (Anexo 1). No estudo prévio, após a aplicação do TCLE, com assinatura e a devida autorização pelos responsáveis legais e maiores de 18 anos e também dos termos de assentimento livre e esclarecido (TALE) pelos participantes com idade entre sete e 18 anos que tinham conhecimento do seu diagnóstico, foi aplicado um questionário eletrônico (e-questionário na plataforma MagPi®), para pesquisa de dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Para assegurar a confidencialidade dos participantes, todos os TCLE, os TALE e os arquivos eletrônicos, foram mantidos trancados, quando não estivessem em uso pela equipe envolvida no projeto. O banco de dados foi elaborado sem a identificação nominal dos participantes, e desta forma, foram mantidos o sigilo ou anonimato e a confidencialidade das informações durante todo o trabalho.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E LABORATORIAIS**

Das 79 amostras disponíveis para análise, sete mostraram volumes insuficientes e foram excluídas, perfazendo um total de 72 amostras de soro, efetivamente incluídas no estudo. Destas, 45 (63%) foram diagnosticados com TB ativa, 14 (19%) com ILTB e 13 (18%) foram classificados como contatos de caso índice (HC), sem nenhuma evidência diagnóstica de infecção/doença ativa, embora nenhum acompanhamento tenha sido realizado. Todos os soros foram ensaiados quanto a presença de Ac das subclasses da IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), de acordo com a padronização realizada, no reconhecimento dos antígenos Rv3353 e Rv2034 (Figura 7).

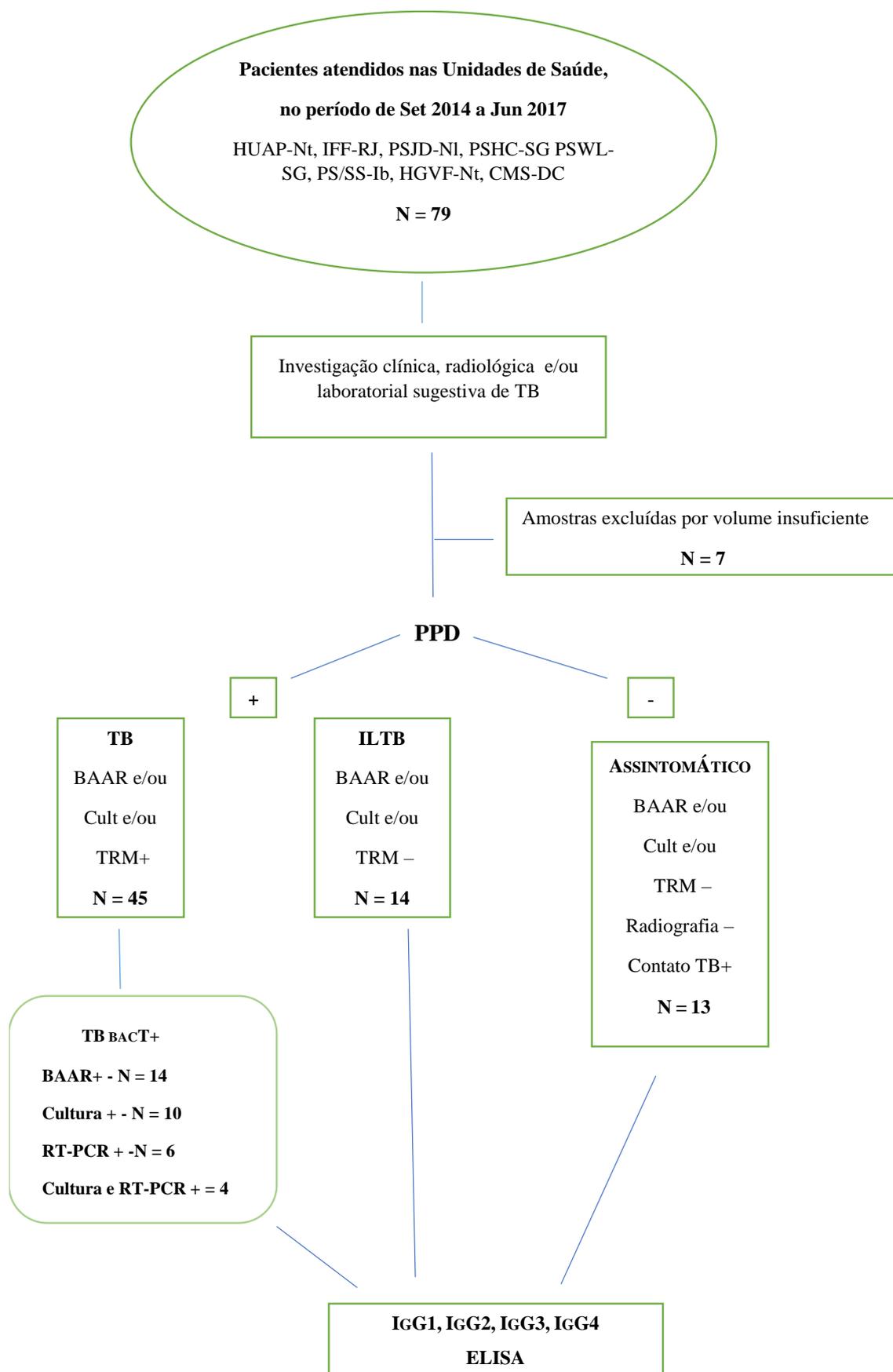


Figura 7 – Fluxograma da população de 72 crianças e adolescentes, provenientes de estudo prévio <sup>(23)</sup>, cujos soros foram analisados no presente estudo.

Na Tabela 1, estão descritas as principais características demográficas, clínicas e laboratoriais dos participantes do estudo. Os pacientes com TB apresentavam média de idade maior, porém a maioria com distribuição similar nas faixas de < 5 anos (42,2 %) e de >10 anos (46,7 %), sem significância estatística entre os grupos ( $p = 1,0$ ). Os ILTB compõem o grupo mais jovem em média de idade e a faixa etária mais jovem (< 5 anos) representou 35,7 % dos casos, enquanto para o grupo HC, predominaram (53,8%) participantes com idades entre 5 e 10 anos, faixa etária menos representada entre os TB (11,1%). Aliás, contrariamente a TB, o grupo HC foi menos respresentado entre os < 5 anos. Não houve diferença significativa, quanto ao gênero entre os grupos. A sorologia para HIV estava disponível apenas para o grupo TB e considerando os que tinham resultados informados 15,4 % (6/ 39) eram positivos. A TB pulmonar foi predominante (71,1%) enquanto, entre os que desenvolveram TB extrapulmonar, a forma ganglionar foi diagnosticada em 46,1% (6/13), seguida da TB osteoarticular (30,8%, 4/13), pleural (15,4%, 2/13) e miliar (7,7 %; 1/13). É interessante notar que apenas metade das crianças com TB informaram história de contato prévio com TB (51,1 %) e um adolescente tinha história de tratamento prévio para TB, entretanto em 100% dos ILTB e HC, o contato era conhecido.

A dificuldade diagnóstica da TB na população do estudo é confirmada pela frequência de apenas 26,67% dos casos de TB foram confirmados, segundo os critérios de Graham (2015) <sup>(33)</sup>. Os testes diagnósticos de rotina empregados para a classificação da TB ativa não foram realizados em todos os casos suspeitos de TB, a frequência de testes não realizados variou de 22,2 % a 42% (microbiológicos e PT), passando a 46,6 % para o score clínico e 68,9% para o TRM. Entre os testes realizados, os mais aplicados foram os microbiológicos, seguidos da PT, pontuação no score clínico, e o TRM. A PT utilizada para detectar os infectados retornou positivo em 100 % (14/14) dos classificados como ILTB e 100% negativa (13/13) nos classificados como HC, embora relatando contato conhecido com TB (Tabela 1). Dos pacientes que realizam os testes microbiológicos, os mais utilizados na prática clínica para confirmação etiológica, >60% resultaram negativos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com tuberculose e cujos espécimes clínicos foram utilizados neste estudo.

Variáveis	Número (%)			P valor
	TB	ILTB	HC	
	45 (63)	14 (19)	13 (18)	
<b>Média de idade</b>	8a6m	6a4m	7a5m	0,612
<b>Faixa etária (anos)</b>		12		
0 - <5	19 (42,2)	5 (35,7)	2 (15,4)	1,000
5 – 10	5 (11,1)	4 (28,6)	7 (53,8)	1,000
>10	21 (46,7)	3 (21,4)	4 (30,8)	1,000
<b>Gênero</b>				
Masculino	22 (48,9)	8 (57,15)	6 (46,15)	
Feminino	23 (51,1)	6 (42,85)	7 (53,85)	
<b>Sorologia HIV</b>				
Positivo	6 (13,3)	-	-	
Negativo	39 (86,7)	-	-	
<b>Infecção Locorregional</b>				
<u>TB pulmonar</u>	32 (71,1)	-	-	
<u>TB extra</u>	13 (26,7)	-	-	
TB ganglionar	6 (46,1)	-	-	
TB ostearticular	4 (30,8)	-	-	
TB pleural	2 (15,4)	-	-	
TB miliar	1 (7,69)			
<b>História de Contato conhecido</b>	23 (51,1)	14 (100)	13 (100)	
<b>Número de testes realizados/total</b>				
<b>Diagnóstico Laboratorial</b>				
PT	26/45 (57,7)	14/14 (100)	13/13 (100)	
NR	19/45 (42,2)	0	0	
<b>Microbiológico</b>				
BAAR	35/45 (77,8)	-	-	
NR	10/45 (22,2)	-	-	

Cultura		27/45 (60)	-	-
NR		18/40 (40)	-	-
TRM		14/45 (31,1)	-	-
NR		31/45 (68,9)	-	-
Pontuação no score clínico		24/45 (53,3)	-	-
NR		21/45 (46,7)	-	-

TB: Tuberculose; ILTB: infecção latente por tuberculose; HC: controle saudável; PT: Prova tuberculina; +: positivo. -: negativo; NR: não realizado; BAAR: bacilo álcool ácido resistente; TRM: teste rápido molecular (baseado na reação em cadeia da polimerase em tempo real).

A Tabela 2 mostra a frequência de resultados de cada teste diagnóstico de rotina utilizado, estratificados de acordo com a faixa etária dos pacientes com TB. A alta frequência dos exames laboratoriais não realizados é preocupante, sendo o mais sofisticado, TRM (RT-PCR) o menos aplicado. Quanto aos testes microbiológicos, BAAR e cultura, a faixa etária menos beneficiada foi a de crianças menores (0-5 anos), com 90,9 % e 84,6 % dos casos negativos, seguida das crianças maiores (5-10 anos), em 75 % e 66,7 %, respectivamente. Já os adolescentes (10 a 19 anos), foram os que mais se beneficiaram com os exames por pesquisa de BAAR (60%) e cultura (63,6%), comparados aos mais jovens. Por outro lado, o teste baseado na resposta imune a PT (84,6 %) foi o que mostrou maior frequência de positividade no grupo dos TB menores de 5 anos. Analisando a população de TB em geral, e que realizou os exames laboratoriais, apenas a PT alcançou frequência de positividade >60%, decrescendo para o TRM (43 %), BAAR (40 %) e cultura (37 %).

Tabela 2 – Frequência de positividade dos testes diagnósticos dos participantes com tuberculose, estratificados de acordo com a faixa etária (em anos)

Exames	Resultados por faixa etária (em anos) nos pacientes diagnosticados com TB			Número (%) Todos com exame realizado
	0 < 5 N = 19	5 < 10 N = 5	10 a 19 N = 21	
<b>PT</b>				
Positiva	11 (84,6)	0 (0)	6 (66,7)	17/26 (65,4)
Negativa	2 (15,4)	4(100)	3 (33,3)	9/26 (34,6)
NR	6	1	12	
<b>BAAR</b>				
Positiva	1 (0,9)	1 (25)	12 (60)	14/35 (40)
Negativa	10(90,9)	3 (75)	8 (40)	21/35 (60)
NR	8	1	1	
<b>Cultura</b>				
Positiva	2 (15,4)	1(33,3)	7 (63,6)	10/27 (37)
Negativa	11(84,6)	2(66,7)	4 (36,4)	17/27 (63)
NR	6	2	10	
<b>TRM</b>				
Positiva	3 (37,5)	0 (0)	3 (60)	6/14 (43)
Negativa	5 (62,5)	1 (100)	2 (40)	8/14 (57)
NR	11	4	16	

TB: Tuberculose; PT: Prova tuberculínica; N: número de casos; NR: não realizado; BAAR: bacilo álcool ácido resistente; TRM: teste rápido molecular (baseado na reação em cadeia da polimerase em tempo real).

Os casos de TB considerados confirmados foram aqueles que mostraram positividade para o exame de cultura e/ou TRM. Um total de 12/45 (26,7%) foram assim classificados, dos quais a cultura positiva ocorreu em sua maioria nos casos de pacientes adolescentes (n = 7), decrescendo em positividade para as crianças menores de cinco anos (n=2) e na faixa etária entre 5 e 10 anos (n = 1); o TRM foi positivo em seis casos, dos quais três eram menores de 5 anos e três eram adolescentes (Tabela 2).

Na análise cumulativa de resultados dos testes diagnósticos realizados, e estratificados de acordo com a faixa etária (Tabela 3), observou-se que, de seis indivíduos adolescentes (10 a 19 anos) com PT+, BAAR confirmou diagnóstico em 3 casos; o mesmo ocorreu com as associações PT+/Cultura+ e PT+/TRM+. Não houve positividade de PT na faixa de 5 a 10 anos. O diagnóstico foi confirmado, pelos quatro testes diagnósticos, em dois adolescentes. De 11

crianças menores de cinco anos, com PT+, TRM confirmou diagnóstico em um caso. De 12 indivíduos adolescentes com BAAR+, a cultura confirmou diagnóstico em cinco deles e TRM, em dois. Houve sobreposição de positividade para os testes de cultura e TRM em 4 amostras: duas em menores de 5 anos e 2 em adolescentes.

Embora a utilização de múltiplos testes aumente a acurácia diagnóstica para o grupo adolescente, os menores de 10 anos foram pouco beneficiados.

Tabela 3 – Frequência cumulativa dos testes imunológico, microbiológicos e molecular dos participantes com tuberculose, estratificados de acordo com a faixa etária (em anos)

Resultados cumulativos Por faixa etária (anos)	Número de positivos/total (%)		
	0 - < 5	5 - < 10	10 a 19
PT/BAAR+	0/8	0/3	3/6 (50)
PT/Cultura+	0/8	0/3	3/6 (50)
PT/TRM+	1/8 (12,5)	0/3	3/6 (50)
BAAR/Cult+	0/1	0/1	5/12 (41,7)
BAAR/TRM	0/1	0/1	2/12 (16,7)
Cultura/TRM+	2/2	0/1	2/7 (28,6)
PT + BAAR + Cultura +TRM	0/0	0/0	2/2 (100)

PT: Prova tuberculínica; NR: não realizado; BAAR: bacilo álcool ácido resistente; TRM: teste rápido molecular (baseado na reação em cadeia da polimerase em tempo real).

#### **4.2 REATIVIDADE DE BIOMARCADORES DE SUBCLASSES DE IGG AOS ANTÍGENOS RV3353 E RV2034**

A padronização dos testes de ELISA foi realizada com pools de soros de criança diagnosticadas com TB (*pool* +, n=14) ou sem história de TB conhecida e com PT negativa (*pool* -, n=18), provenientes da soroteca do LAMICEL. Para otimização do teste quanto a reatividade diferencial entre os *pools* e melhor linearidade das curvas, estes, bem como os antígenos (Rv3353 e Rv2034) e conjugados (anti-IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) foram ensaiados em diferentes concentrações e diluições. As melhores parametrizações obtidas estão descritas na Tabela 4 para as concentrações de antígeno e fatores de diluição de anticorpo

secundário (conjugado) e de espécime clínico que foram utilizados para os ensaios individualmente. As reatividades obtidas na padronização de IgG2 não foram satisfatórias, pois geraram baixos valores de densidade óptica (DO) e sem discriminação significativa entre os *pools* + e -, portanto, não prosseguimos com os testes para esta subclasse de IgG. O mesmo ocorreu para a IgG4, que apresentou reatividade insatisfatória para o antígeno Rv3353, e com IgG1 e IgG3, com relação ao antígeno Rv2034. As subclasses de IgG que tiveram performance diferencial entre os *pools* foram as IgG1- e IgG3-Rv3353 e a IgG4-Rv2034 (Tabela 4 e Figura 8).

Tabela 4 – Melhores resultados da padronização do ELISA em amostras de soro de pacientes com tuberculose ou pool + (TB) e pool – (saudáveis).

	IgG1	IgG3	IgG4
Rv3353	0,5ug/mL	0,5ug/mL	-
Soro	1:8	1:8	-
Anticorpo Secundário	1,0ug/ml	1,0ug/mL	-
Rv2034	-	-	2,5ug/mL
Soro			1:8
Anticorpo Secundário			1,0ug/mL

-: ausência de reatividade diferencial

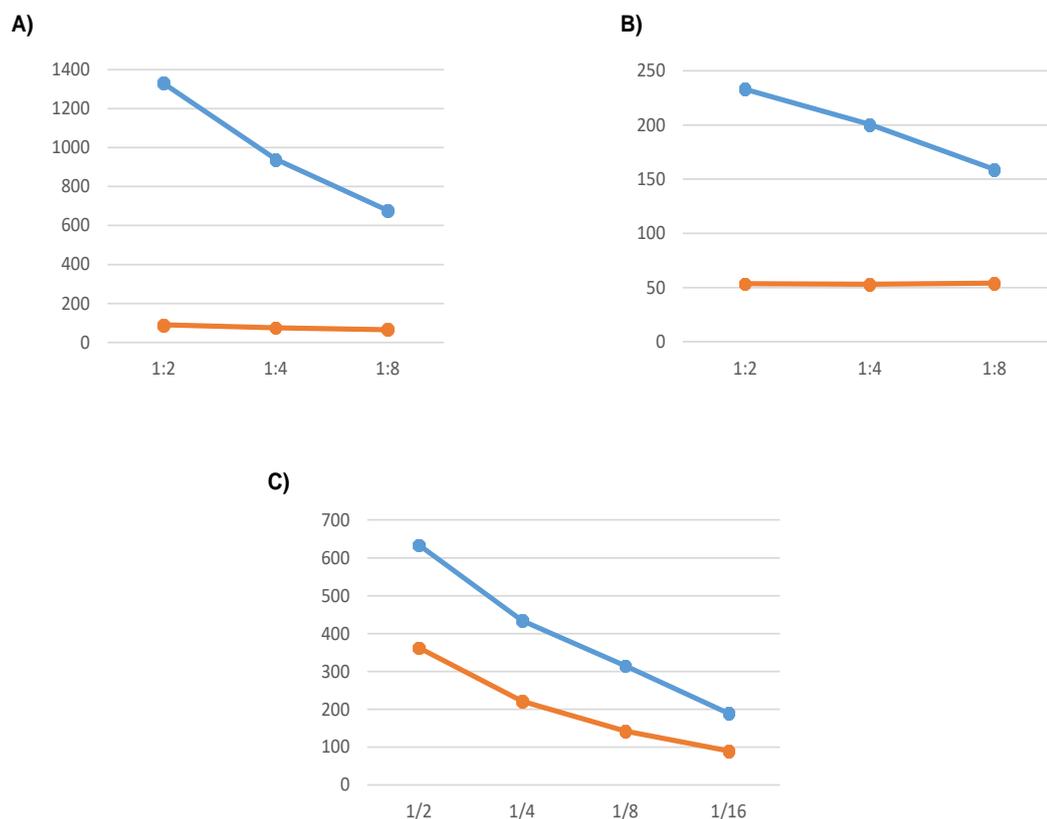


Figura 8 – Parametrização ou otimização do ELISA

Diluições seriadas de pools de soros de crianças com tuberculose pulmonar (**pool +**) e indivíduos saudáveis com prova tuberculínica negativa (**pool-**), diluídos seriadamente de 1:2 a 1:16, utilizando os antígenos, **A)** Rv3353 (0,5 µg/mL), na detecção de subtipo IgG1 1ug/ml; **B)** Rv3353 (0,5 µg/mL), na detecção de subtipo IgG3 (1ug/ml) e **C)** Rv2034 (2,5 µg/mL), na detecção de subtipo IgG4 1ug/ml.

Os soros dos diferentes grupos de criança foram ensaiados individualmente utilizando a parametrização descrita na Tabela 5. Analisando as médias das densidades óticas das amostras testadas, notamos que as IgG1- e IgG3-Rv3353 foram mais elevadas no grupo de TB ativa, embora sem diferença significativa, comparado aos grupos ILTB e HC ( $p > 0,071$ ). A IgG4-Rv2034 mostrou reatividade média mais elevada para os grupos ILTB, aumentando em direção ao grupo HC ( $p = 0,047$ ).

Tabela 5 – Parâmetros de validade do teste de ELISA para a detecção dos subtipos do anticorpo IgG contra os Ag micobacterianos Rv 3353 e Rv 2034, em soros de crianças com tuberculose (TB), infecção latente por *M. tuberculosis* (ILTB) e de indivíduos sadios contatos saudáveis (HC).

ELISA	(Número)			P valor		
	Média de DO ± DP [IC (95%)]			TB x ILTB*	TB x HC*	HC x ILTB*
	TB	ILTB	HC			
<b>IgG1- Rv3353</b>	N = 45	N = 14	N = 13	0,32	0,527	0,765
	237,2 ±291,1	140,4± 109,5	165,8±126,8			
	[149,7±149,7]	[77,15±203,6]	[89,21±242,4]			
<b>IgG3- Rv3353</b>	N = 44	N = 14	N = 13	0,071	0,648	0,422
	156,2±157,5	95,14±44,74	131,6±77,48			
	[108,3±204,1]	[69,31±121,0]	[84,76±178,4]			
<b>IgG4- Rv2034</b>	N = 44	N = 14	N = 13	0,342	<b>0,047</b>	0,641
	812,0±874,3	1113 ±1010	1362±874,5			
	[546,1±1078]	[530,5±1696]	[833,2±1890]			

N: número de amostras,  $\bar{X}$ : média; DP: desvio padrão; IC95%: intervalo de confiança no percentil 95. \*valor p de acordo com teste Mann Whitney.

Considerando a imaturidade das crianças mais jovens em desenvolver resposta imune efetiva, em virtude de um sistema imunológico em desenvolvimento, os menores de cinco anos correm maior risco de desenvolver formas graves de TB e, por isso, analisamos as reatividades médias diferenciais das subclasses de IgG1- e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034 nos grupos TB, ILTB e HC, estratificados quanto a faixa etária. Não foi evidenciado diferença significativa entre as médias dos grupos testados, entretanto, observa-se que IgG1-Rv3353 tende a reatividade média mais elevada nos adolescentes com TB e ILTB, enquanto os HC tendem a maior reatividade média na faixa etária de 5 a 10 anos. É interessante notar que a IgG4-Rv2034 tende a maior reatividade média nas crianças mais velhas com ILTB (> cinco anos), perfil este acompanhado pelos HC, porém em menor intensidade. Similarmente, as crianças com TB na faixa etária entre 5 e 10 anos e as HC menores de cinco anos, tendem, em média, a maior reatividade por IgG4-Rv2034, enquanto as crianças mais jovens (0-< 5 anos) e os adolescentes do grupo TB apresentam menor média de resposta imune (Tabela 6), sugerindo exercer um efeito protetor nos ILTB e HC. A ausência

de significancia estatística, provavelmente, se deve ao pequeno número de amostras testadas.

Tabela 6 – Resposta imune humoral, expressa em média e desvio padrão, pelas subclasses IgG1, IgG3 e IgG4 respondedores aos antígenos micobacterianos (Rv3353 e Rv2034), em amostras de soros de crianças com tuberculose (TB), infecção latente por *M. tuberculosis* (ILTB) e indivíduos saudáveis, contatos recentes de casos-fonte de TB (HC), estratificados de acordo com a faixa etária.

Biomarcador	Faixa etária (anos)	N	TB <sup>a</sup>	$\bar{X} \pm DP$		N	HC <sup>c</sup>	P valor* Inter Grupos	P valor** Intra Grupos
				N	ILTB <sup>b</sup>				
IgG1-Rv3353	0 - <5	19	227,5±220,8 <sup>d</sup>	6	109,8± 45,95 <sup>g</sup>	4	116,5±45,38 <sup>j</sup>	(a x b) 0,1722 (a x c) 0,4979 (b x c) 0,8095	(d x e x f) 0,303
	5-10	5	228,7±135,2 <sup>e</sup>	4	137,0±23,56 <sup>h</sup>	6	236,8±156,9 <sup>l</sup>	(a x b) 0,3968 (a x c) >0,9999 (b x c) 0,5619	(g x h x i) 0,288 (j x l x m) 0,345
	>10-19	21	248,0±372,4 <sup>f</sup>	3	241,2±223,2 <sup>i</sup>	3	94,33±63,38 <sup>m</sup>	(a x b) 0,5613 (a x c) 0,1749 (b x c) 0,4000	
IgG3-Rv3353	0 - <5	18	199,4±224,0 <sup>d</sup>	6	103,1±56,31 <sup>g</sup>	4	121,4±78,90 <sup>i</sup>	(a x b) 0,2854 (a x c) 0,5468 (b x c) 0,8952	(d x e x f) 0,444
	5-10	5	119,5±79,45 <sup>e</sup>	4	75,88±15,63 <sup>h</sup>	6	166,7±83,42 <sup>l</sup>	(a x b) 0,3968 (a x c) 0,3652 (b x c) 0,1143	(g x h x i) 0,970 (j x l x m) 0,613
	>10-19	21	127,9±80,97 <sup>f</sup>	3	78,33±16,69 <sup>i</sup>	3	106,5±78,44 <sup>m</sup>	(a x b) 0,3105 (a x c) 0,3182 (b x c) 0,7000	
IgG4- Rv2034	0 - <5	18	753,3±845 <sup>d</sup>	6	969,6±997,8 <sup>g</sup>	4	1160±876,7 <sup>i</sup>	(a x b) 0,9357 (a x c) 0,2269 (b x c) 0,6095	(d x e x f) 0,441
	5-10	5	1165±751,0 <sup>e</sup>	4	1702±1045 <sup>h</sup>	6	1404±859,6 <sup>l</sup>	(a x b) 0,1905 (a x c) 0,1905 (b x c) 0,5152	(g x h x i) 0,321 (j x l x m) 0,979
	>10-19	21	778,0±942,3 <sup>f</sup>	3	1612±1207 <sup>i</sup>	3	1085±1165 <sup>m</sup>	(a x b) 0,1685 (a x c) 0,3488 (b x c) 0,7000	

N: número de amostras,  $\bar{X}$ : média; DP: desvio padrão; TB = Tuberculose, ILTB = Infecção latente por Tuberculose, HC = controles assintomáticos, \* teste Mann-Whitney; \*\* teste kruskal-wallis.

Os padrões de dispersão das DO individuais nos ensaios de IgG1 e IgG3-Rv3353, e IgG4-Rv2034, representados em média com intervalo de confiança de 95%, nos diferentes grupos de soros arrolados no estudo, estão mostrados nas Figuras 9, 10 e 11.

Para IgG1-Rv3353, os soros mais hiper-reativos estão associados ao grupo TB, produzindo maior dispersão. Interessantemente, os HC apresentam grupo de soros mais reativos que ILTB. Ao proceder a avaliação da dispersão da DO, estratificada por apresentação clínica, a TBp apresenta maior número de soros hiper-reativos, já os TBe produziram perfil de reatividade similar aos do HC. Entretanto não foi encontrada diferença significativa entre os grupos.

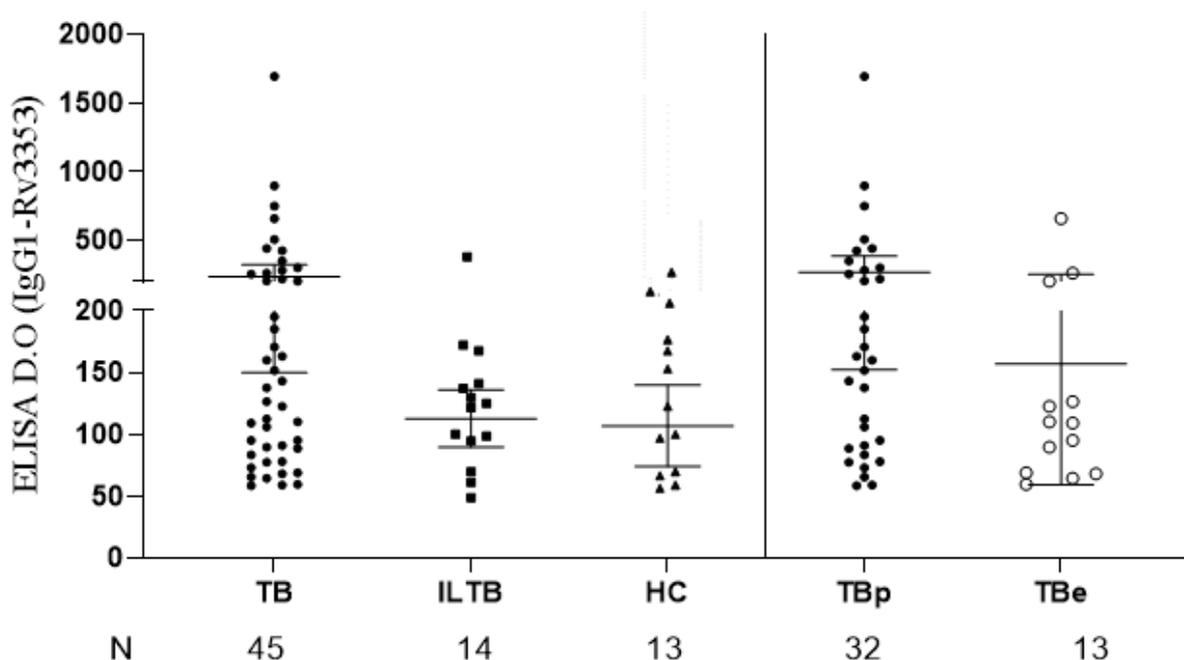


Figura 9 – Distribuição da resposta humoral de IgG1-Rv3353, expressa em densidade óptica. Comparados com os ILTB e HC, os soros de TB mostram reatividade aumentada de IgG1-Rv3353. Distribuição da resposta humoral de IgG1-Rv3353, expressa em densidade óptica individual no soro de tuberculose (TB ●), infecção latente por *M. tuberculosis* (ILTB ■) e contactantes domésticos (HC ▲). Os TB são apresentados estratificados por forma clínica pulmonar (TBp ▼) e extrapulmonar (TBe ◆). Barras: média com 95%IC. Retas: #p=0,085 (TB vs HC). D.O. densidade óptica x 1000

Para a IgG3-Rv 33535, embora o perfil de reatividade individual seja similar a IgG1 para os grupos, este produz reatividades de menor intensidade e menor número de soros hiper-reativos. A reatividade média foi maior quando direcionada ao TB vs ILTB (p=0,071), embora de significância borderline, possivelmente devido ao número baixo de amostras testadas, mas os HC foram mais reativos que os ILTB,

embora sem diferença significativa. Na dispersão individual de DO produzida por apresentação clínica, a TBe exibe um perfil de intensidade de resposta que acompanha a produzida pelos HC (Figura 10), porém não há diferença estatisticamente significativa vs TB.

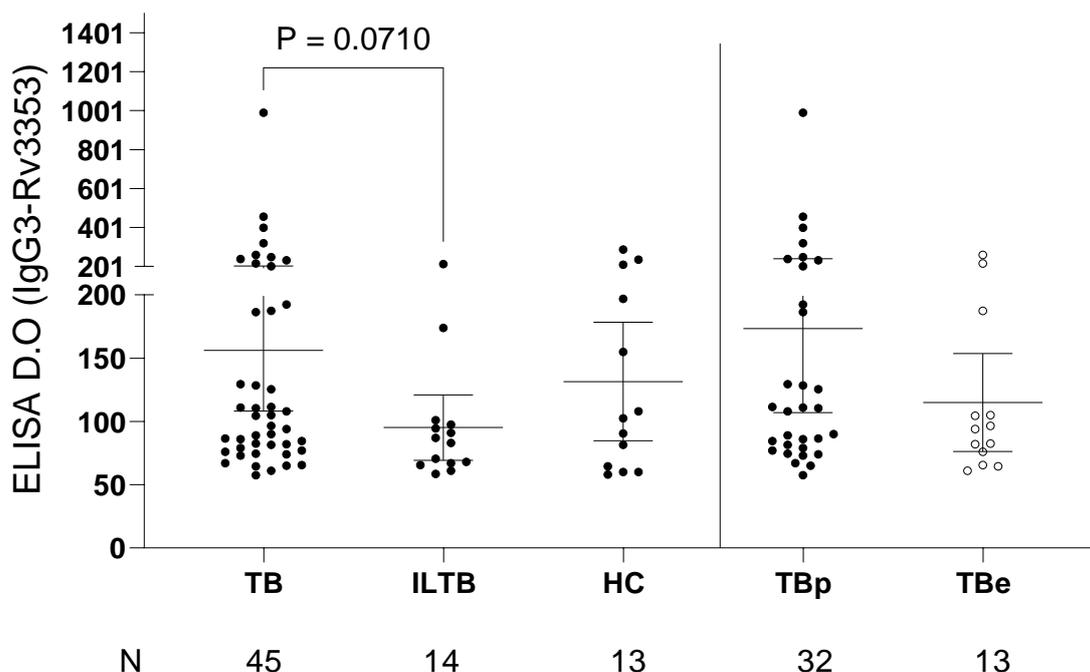


Figura 10 – Distribuição da resposta humoral de IgG3-Rv3353, expressa em densidade óptica. Comparados com os ILTB e HC, os soros de TB embora mostrem intensidade aumentada de IgG3-Rv3353, esta é menor que a observada para IgG1. Distribuição da resposta humoral de IgG3-Rv3353, expressa em densidade óptica individual no soro de tuberculose (TB ●), infecção latente por *M. tuberculosis* (ILTB ■) e contactantes domésticos (HC ▲). Os TB são apresentados estratificados por forma clínica pulmonar (TBp ▼) e extrapulmonar (TBe ◆). Barras: média com 95%IC. P = 0,071 (TB vs ILTB). D.O. densidade óptica x 1000

Para a IgG4-Rv 2034, o perfil bimodal de intensidade de DO é observado para todos os grupos e com reatividade individual crescente e significativa do grupo TB para o grupo HC ( $p=0,0478$ ). Interessantemente, este perfil de resposta não foi observado para IgG1 ou IgG3-Rv3353. Este padrão distinto, aumentado em direção ao HC, pode estar associado a uma resposta protetora e diminuição da resposta poderia estar relacionada com mudança no espectro clínico da infecção por *Mtb*. Observamos que, entre aos HC com D.O. > 1000, 55,5 % (5/9) apresentavam significativa positividade acima do cutoff também para IgG1/IgG3-Rv3353 ( $p=0,021$ ),

enquanto entre os que apresentavam reatividade de D.O < de 1000, 7,7 % (1/13) foi positivo para IgG1/IgG3-Rv3353. Relação similar foi evidenciada para os ILTB (3/7, 43% e 1/7, 14,3 %,  $p=0,559$ ), porém sem diferença significativa. Entretanto, estudo prospectivo seria necessário para melhor compreensão destes resultados.

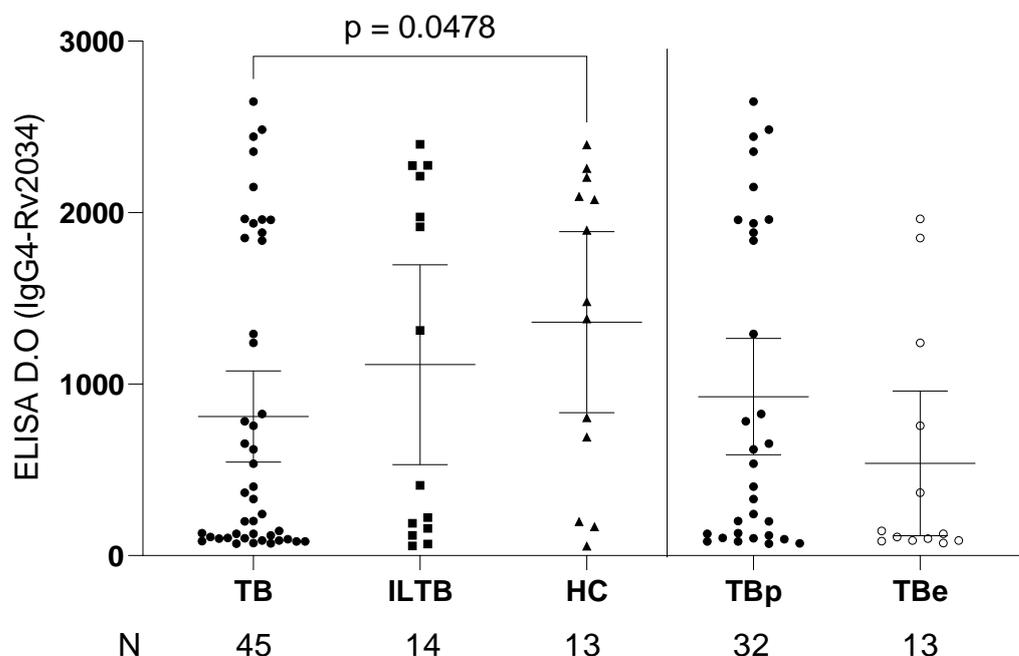


Figura 11 – Distribuição da resposta humoral de IgG4-Rv2034, expressa em densidade óptica. Comparado com o HC, os soros de TB mostram intensidade diminuída de IgG4-Rv2034. Distribuição da resposta humoral de IgG4-Rv2034, expressa em densidade óptica individual no soro de tuberculose (TB ●), infecção latente por *M. tuberculosis* (ILTB ■) e contactantes domésticos (HC ▲). Os TB são apresentados estratificados por forma clínica pulmonar (TBp ▼) e extrapulmonar (TBe ◆). Barras: média com 95%IC.  $P = 0,0478$  (TB vs HC). D.O. densidade ótica x 1000.

Considerando que em sorologia, a resposta imune em imunossuprimidos diminui para muitos antígenos, analisamos reatividade das subclasses de IgG quanto a sorologia para HIV, entre os pacientes com TB (Tabela 7). A média de IgG4-Rv2034 foi significativamente mais elevada no grupo HIV- ( $859,63 \pm 880,85$  x  $440,10 \pm 807,2$ ,  $p = 0,021$ ). Entretanto para IgG1 e IgG3-Rv3353, não foram encontradas diferenças de reatividades média ( $p > 0,693$ ).

Tabela 7 – Reatividade média dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034, obtidos por ELISA, de acordo com o status sorológico para o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

ELISA	HIV status sorológico				P valor
	$\bar{X} \pm DP$				
	Positivo		Negativo		
	N		N		
IgG1-RV3353	6	180,17±135,17	39	249,95±308,4	0,961
IgG3-RV3353	5	170,2±161,66	39	154,4±158,03	0,693
IgG4-RV2034	5	440,10±807,2	39	859,63±880,85	0,021

N: número de amostras,  $\bar{X}$ : média; DP: desvio padrão

As reatividades médias diferenciais das subclasses para os antígenos Rv3353 e Rv2034 foram analisadas de acordo com o gênero do doador dos soros. Os soros dos pacientes TB masculino foram significativamente mais reativos por IgG3-Rv3353 comparados ao ILTB ( $p=0,0002$ ) (Tabela 8).

Tabela 8 – Reatividade média dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034, obtidos por ELISA, de acordo com o gênero.

Biomarcador	Gênero	Reatividade de subclasses de IgG expresso em $\bar{X} \pm DP$						P valor* Inter Grupos	P valor** Intra Grupos
		N	TB <sup>a</sup>	N	ILTB <sup>b</sup>	HC <sup>c</sup>			
IgG1-Rv3353	M	22	325,3±386,6 <sup>d</sup>	8	114,2±32,76 <sup>f</sup>	6	236,9±156,7 <sup>h</sup>	(a x b) 0,163 (a x c) 0,890 (b x c) 0,1921	(d x e) 0,133 (f x g) 0,652
	F	23	152,9±107,8 <sup>e</sup>	6	175,3±164,6 <sup>g</sup>	7	104,9± 47,78 <sup>i</sup>	(a x b) 0,9044 (a x c) 0,2294 (b x c) 0,5245	(h x i) 0,101
IgG3-Rv3353	M	22	184,0±207,0 <sup>d</sup>	8	115,8±50,24 <sup>f</sup>	6	190,9±77,81 <sup>h</sup>	(a x b) 0,9194 (a x c) 0,0995 (b x c) 0,1419	(d x e) >0,999 <b>(f x g) 0,0027</b>
	F	22	128,4±79,61 <sup>e</sup>	6	67,58±8,680 <sup>g</sup>	7	80,71±20,51 <sup>i</sup>	(a x b) 0,0002 (a x c) 0,0631 (b x c) 0,5152	(h x i) 0,0233
IgG4-Rv2034	M	22	1045±935,6 <sup>d</sup>	8	815,9±905,1 <sup>f</sup>	6	1537±665,9 <sup>h</sup>	(a x b) 0,707 (a x c) 0,2139 (b x c) 0,1419	(d x e) 0,0946 (f x g) 0,2891
	F	22	578,5±758,8 <sup>e</sup>	6	1510±1083 <sup>g</sup>	7	1211±1050 <sup>i</sup>	(a x b) 0,1122 (a x c) 0,1647 (b x c) 0,5245	(h x i) 0,6154

N: número de amostras,  $\bar{X}$ : média; DP: desvio padrão; TB = Tuberculose, ILTB = Infecção latente por Tuberculose, HC = controles assintomáticos, \* teste Mann-Whitney; \*\* teste kruskal-wallis

Observou-se, ainda, tendência de maior reatividade média de IgG4-Rv 2034 no grupo que tiveram a TB confirmada ( $903,750 \pm 929,549$  X  $777,531 \pm 865,592$ ), por algum dos testes microbiológicos ou moleculares, comparado ao grupo TB não confirmado, porém sem diferença significativa para nenhum dos biomarcadores ( $p \geq 0,693$ ) (Tabela 9).

Tabela 9 – Reatividade média dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034, obtidos por ELISA, de acordo com a presença ou ausência de confirmação diagnóstica da tuberculose (TB) na criança.

ELISA	Diagnóstico de TB				p valor <sup>1</sup>
	N	confirmada	$\bar{X} \pm DP$		
			não confirmada		
IgG1-Rv3353	12	316,92 $\pm$ 473,382	33	208,18 $\pm$ 190,338	0,939
IgG3-Rv3353	12	137,92 $\pm$ 101,487	32	163,06 $\pm$ 174,864	0,732
IgG4-Rv2034	12	903,750 $\pm$ 929,549	32	777,531 $\pm$ 865,592	0,693

TB confirmada: ao menos um teste microbiológico ou molecular positivo; N: número de amostras;  $\bar{X}$ : média; DP: desvio padrão. <sup>1</sup>Teste de Mann-Whitney.

O sistema de pontuação é uma ferramenta diagnóstica, baseada em algoritmos, para auxiliar no diagnóstico da TB na criança; assim, as reatividades médias dos marcadores aqui ensaiados, foram avaliados quanto à pontuação de score clínico, calculado para os participantes com TB pulmonar abaixo de 10 anos e nos adolescentes com BAAR- ou não realizado. Notadamente, a reatividade média de IgG4-Rv2034 foi significativamente mais elevada entre os casos de TB pontuados pelo score clínico como “muito provável” comparado ao score clínico “possível” ( $978,83 \pm 870,44$  x  $95,00 \pm 19,4079$ ,  $p=0,022$ ), mas não ao “pouco provável” ( $p>0,100$ ). A IgG1-Rv3353 tende a produzir média de reatividade similar, porém sem diferença significativa ( $p=0,074$ ). As análises no grupo “pouco provável” ficaram comprometidas por conter uma única amostra, assim embora IgG3-Rv3353 apresente reatividade alta em relação aos outros dois scores, não é possível fazer maiores inferências (Tabela 10).

Tabela 10 – Reatividade média, expressa em média  $\pm$  desvio padrão ( $\bar{x}\pm DP$ ), dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034, obtidos por ELISA, de acordo com o score do sistema de pontuação, no grupo TB.

ELISA	Diagnóstico da TB pelo Score clínico do sistema de pontuação em ( $\bar{x}\pm DP$ )						p valor <sup>1</sup>
	N	Pouco provável <sup>a</sup>	N	Possível <sup>b</sup>	N	Muito provável <sup>c</sup>	
IgG1- RV3353	1	151,50	5	117,70 $\pm$ 63,398	18	264,08 $\pm$ 374,94	(a x b) 0,380 (a x c) 0,584 (b x c) 0,074
IgG3- RV3353	1	457,00	4	113,38 $\pm$ 51,427	18	166,39 $\pm$ 217,73	(a x b) 0,157 (a x c) 0,144 (b x c) 0,932
IgG4- RV2034	1	70,500	4	95,00 $\pm$ 19,4079	18	978,83 $\pm$ 870,44	(a x b) 0,157 (a x c) 0,100 (b x c) <b>0,022</b>

TB: Tuberculose; <sup>a</sup>Pouco provável, <sup>b</sup>Possível, <sup>c</sup>Muito provável, N: número de amostras,  $\bar{X}$ : média; DP: desvio padrão. <sup>1</sup>Teste de Mann-Whitney.

Quando realizada a avaliação das reatividades médias diferenciais dos biomarcadores de estudo, quanto aos diferentes testes diagnósticos de rotina aplicados ao grupo TB, observou-se que apenas a IgG4-Rv2034 mostrava diferença significativa, quando os soros eram de pacientes com BAAR+ em comparação aos BAAR- (1065 $\pm$ 1019 x 645,0 $\pm$ 814,5, p = 0,05). Perfil similar foi evidenciado para as amostras cultura + vs cultura - (1043 $\pm$ 961,3 vs 654,8 $\pm$ 794,5), porém sem diferença significativa (p = 0,33).

Tabela 11 – Reatividade média, expressa em média  $\pm$  desvio padrão (DP), dos biomarcadores IgG1- e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034, obtidos por ELISA, de acordo com os testes laboratoriais utilizados para diagnóstico no grupo TB.

Reatividade média $\pm$ desvio padrão ( $\bar{X} \pm DP$ ) em relação ao diagnóstico laboratorial									
Exames	N	IgG1-Rv3353	p valor	N	IgG3-Rv3353	p valor	N	IgG4-Rv2034	p valor
BAAR+	14	262,8 $\pm$ 431,3	0,30	14	146,5 $\pm$ 92,95	0,43	14	1065 $\pm$ 1019	0,05*
BAAR –	21	238,5 $\pm$ 240,8		20	169,0 $\pm$ 214,9		20	645,0 $\pm$ 814,5	
Cultura +	10	359,9 $\pm$ 511,4	>0,9	10	150,8 $\pm$ 107,1	0,58	10	1043 $\pm$ 961,3	0,33
Cultura –	17	231,4 $\pm$ 227,1		16	183,1 $\pm$ 237,0		16	654,8 $\pm$ 794,5	
TRM+	6	98,00 $\pm$ 26,32	0,39	6	81,67 $\pm$ 13,91	0,51	6	493,2 $\pm$ 733,8	0,90
TRM-	8	188,9 $\pm$ 116,1		7	147,4 $\pm$ 142,6		7	552,6 $\pm$ 676,4	

BAAR: Bacilo álcool-ácido resistente; TRM: Teste rápido molecular; N: número de amostras,  $\bar{X}$ : média; DP: desvio padrão.

### **4.3 ANÁLISE DA CURVA ROC (RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC)**

Posto que diferenças foram observadas nas análises quantitativas, nós avaliamos os resultados qualitativos através de análise de curva ROC (*Receiving Operating Characteristic*). Comparamos HC *versus* TB, TB *versus* ILTB, ILTB *versus* HC e TB *versus* ILTB/HC, a fim de observar possível potencial discriminatório entre esses grupos. Os resultados se encontram na Tabela 12, a qual apresenta os valores de AUC (*Area Under Curve* ou área sob a curva), DO e as sensibilidades obtidas, tomando como parâmetro o perfil de produto-alvo (PPT) para testes de triagem ou referência. As maiores AUROC e sensibilidade foram obtidas para os ensaios de IgG3-Rv3353 [0,662 (0,51-0,82) e 50%] e [0,604 (0,467-0,741) e 43%] para TB x ILTB e TB x ILTB/HC, respectivamente, com especificidade de 85,7 % e 71,4%. A IgG1-Rv3353, embora com menor AUROC [0,589 (0,43-0,74)] apresentou sensibilidade ligeiramente maior que IgG3 (51%) para TB, mantendo a mesma especificidade (71,4%) na identificação de TB x ILTB. Para os outros ensaios menores AUROCs (<0.58) e sensibilidades ( $\leq 40$  %) foram evidenciadas (Tabela 12).

Tabela 12 – Eficiência da resposta imunes de subtipos de IgG, aos biomarcadores Rv 3353 e Rv 2034.

Imunorreatividade	TPP para triagem em comunidade ou teste de referência para identificar pessoas com suspeita de TB Sensibilidade ( $\geq 90\%$ ) e especificidade ( $\geq 70\%$ ) mínimas			
	Antígenos			
<b>TB (TB vs HC)</b>		<b>Rv3353</b>		<b>Rv2034</b>
		<b>IgG1</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>
AUROC (95% IC)	0,559 (0,38-0,74)	0,543 (0,35-0,74)		0,318 (0,15-0,48)
TB (n)	45	44		44
HC (n)	13	13		13
P	0,520	0,641		0,048
Sensibilidade	17/45 (37,8)	10/44 (22,7)		5/44(11,4)
Especificidade	3/13 (76,9)	3/13 (76,9)		3/13(76,9)
Cutoff	180,75	199,50		2122,00
<b>TB (TB vs ILTB)</b>		<b>Rv3353</b>		<b>Rv2034</b>
		<b>IgG1</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>
AUROC (95% IC)	0,589 (0,43-0,74)	0,662 (0,51-0,82)		0,414 (0,23-0,60)
TB (n)	45	44		44
HC (n)	14	14		14
P	0,318	0,071		0,336
Sensibilidade	23/45 (51,1)	22/44 (50)		5/44 (11,4)
Especificidade	4/14 (71,4)	2/14 (85,7)		4/14 (71,4)
Cutoff	137,25	102,75		2062,75
<b>TB (TB vs ILTB/HC)</b>		<b>Rv3353</b>		<b>Rv 2034</b>
		<b>IgG1</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>
AUROC (95% IC)	0,574 (0,440-0,709)	0,604 (0,467-0,741)		0,368(0,230-0,506)
TB (n)	45	44		44
HC (n)	27	27		27
P	0,292	0,142		0,063
Sensibilidade	18/45 (40)	19/44 (43,2)		5/44 (11,4)
Especificidade	6/27 (77,8)	7/27 (74,1)		7/27 (74,1)
Cutoff	169,00	109,25		2122
<b>ILTB (ILTB vs HC)</b>		<b>Rv3353</b>		<b>Rv 2034</b>
		<b>IgG1</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>
AUROC (95% IC)	0,464 (0,23-0,69)	0,407 (0,17-0,64)		0,445 (0,22-0,67)
TB (n)	14	14		14
HC (n)	13	13		13
P	0,752	0,409		0,115
Sensibilidade	1/14 (7,1)	1/14 (7,1)		4/14(28,6)
Especificidade	0/13(100)	2/13(84,6)		2/13(84,6)
Cutoff	491,5	211,5		2209,75

AUROC: área sob a curva ROC; IC95%: intervalo de confiança no percentil 95; n: número de amostras testadas; P: valor de p para significância estatística; TB: Tuberculose; ILTB: Infecção latente por Tuberculose; HC: controles assintomáticos.

As curvas ROC para os ensaios IgG1- e IgG3-Rv3353, e IgG4-Rv2034, estão apresentadas na Figura 12.

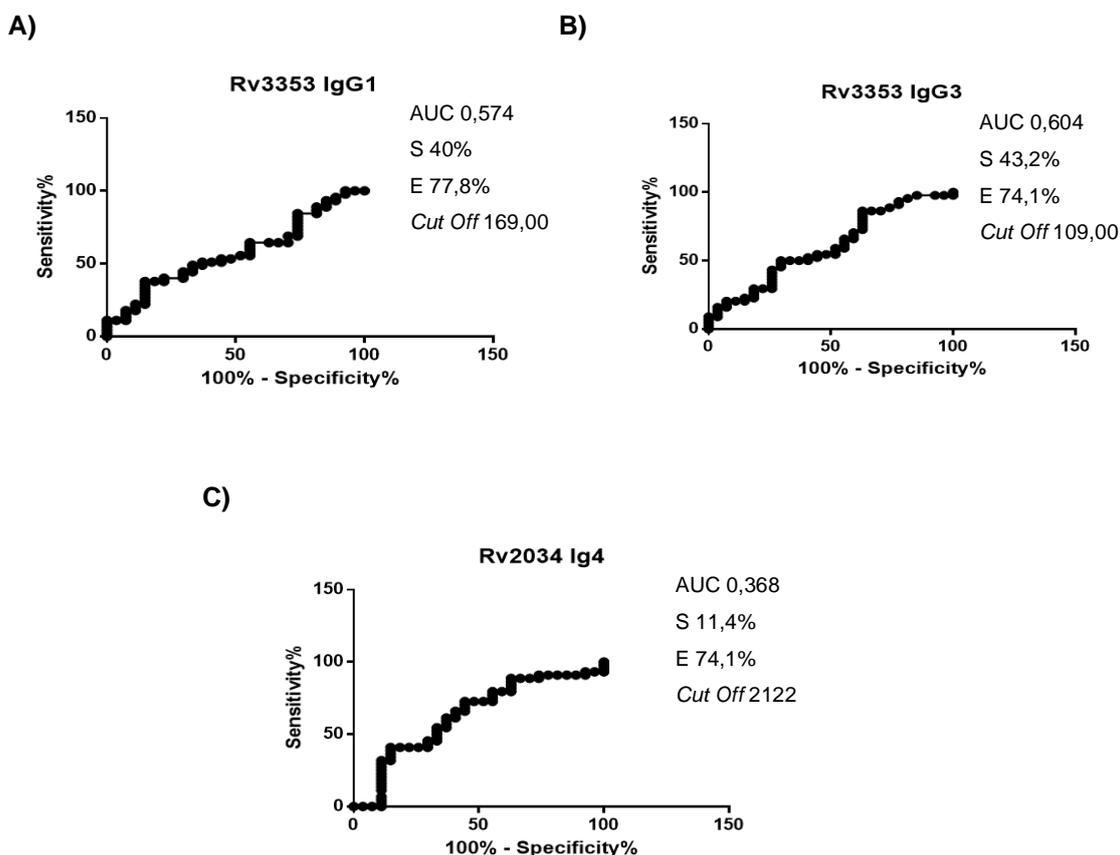


Figura 12 – Curva ROC para os ensaios A) RV 3353-IgG1, B) Rv 3353 IgG3 e C) Rv2034 IgG4.

Considerando que o reconhecimento de múltiplos antígenos pode variar entre os indivíduos, analisamos as reatividades dos biomarcadores combinados (Tabela 13). Utilizando o *cutoff* calculado sobre TB vs ILTB/HC (Tabela 12), observa-se que a combinação dos resultados de IgG1 e IgG3-Rv3353 aumenta a sensibilidade (55,5 %), porém diminui a especificidade (63%); todavia, é interessante notar que os biomarcadores não reconhecem <30% dos ILTB e >40% dos HC. O antígeno Rv 3353 é expresso durante a multiplicação do bacilo e os resultados obtidos podem indicar que estas crianças, embora assintomáticas, estariam em fase replicativa de *Mtb*. Entretanto, ao adicionar a positividade de IgG4-Rv2034, não há aumento da sensibilidade, e considerando que a reatividade aumenta na direção do HC, a resposta aumentada para expostos e latentemente infectados poderia estar associada a proteção. Entretanto, estudos prospectivos são necessários para esclarecer esta hipótese.

Tabela 13 – Sensibilidade (S) e especificidade (Sp) dos resultados combinatórios de IgG1 e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034 no soro de crianças com tuberculose (TB), infecção latente (ILTB) e contatos exposto assintomáticos (HC).

ELISA resultados	Combinatória de TB	Número de positivos (%)			S/Sp (%)
		N=45	ILTB N=14	HC N=13	
IgG1/IgG3-Rv3353		25 (55,5)	4 (28,5)	6 (46,2)	55,5/63
IgG1/IgG3-Rv3353/IgG4-Rv2034		25 (55,5)	6 (42,8)	8 (61,5)	55,5/48

TB: Tuberculose; ILTB: Infecção latente por Tuberculose; HC: controles assintomáticos; S: sensibilidade; Sp: especificidade

Em seguida, analisamos os dados referentes à positividade das amostras aos biomarcadores IgG1 e IgG3-Rv3353, e IgG4-Rv2034 (Tabelas 14, 15 e 16), de acordo com as variáveis do estudo. Para IgG1-Rv3353, maior frequência de testes positivos foram evidenciados entre as crianças com TB de 5-10 anos (62, 5%); entretanto, foi surpresa encontrar frequência quase similar (57,1 %) no grupo HC, mas não para ILTB (25 %). Nas faixas etárias polares (<5 anos e >10 anos), mais de um terço das amostras (>33%) foram positivas na TB, e na ILTB apenas para os adolescentes. Já a IgG3-Rv3353 aumentou a positividade nestas faixas etárias polares (53,3 % e 47, 6 %, respectivamente), inclusive entre os HC (50 % e 25 % vs 0% na IgG1). Por outro lado, enquanto a IgG4-Rv2034 mostra positividade diminuída para todas as faixas etárias do grupo TB, quando comparada ao Rv3353, ILTB (2/3; 66,7%) e HC (1/2; 50%) tendem a produzir maior número de positivos, principalmente nas faixas polares >10 anos e <5 anos, respectivamente. Entretanto, o número baixo de amostras testadas compromete a análise.

Nota-se que os indivíduos do sexo masculino do grupo TB e HC tendem a ser positivos para o Rv3353, enquanto os do sexo feminino no grupo ILTB é que tendem a reatividade positiva para Rv2034. Não houve diferença significativa de positividade para o Rv3353 entre os TB HIV+ vs HIV-, porém os poucos positivos para IgG4-Rv2034 estavam associados ao HIV-. A IgG3-Rv3353 foi que melhor contribuiu para identificar as diferentes formas clínicas da TBE, mas nenhum dos testes detectou a forma TB miliar. A IgG1-Rv3353 tende a ser mais positiva entre os PT com resultado negativo (66, 7 %), enquanto IgG3-Rv3353 tende a ser mais positiva entre os BAAR

e cultura+ (50 %). A IgG1 e IgG3-Rv3353 tendem a positividade entre os TRM- (50 % e 28,6%). Todos os Ags tendem a maior positividade entre os TB não confirmados, com maior positividade para o IgG1 (42,4 %) e IgG3 (43,7 %) -Rv3353, quando comparados ao IgG4-Rv2034 (12,5 %). É interessante notar que quanto ao score clínico, que é utilizado para auxiliar no diagnóstico da TBP na criança, os biomarcadores aqui analisados diferem quanto a sua positividade, pois a IgG1-3353 é mais positiva (55,5 %) naqueles com pontuação associada a TB “muito provável”, enquanto a IgG3-Rv3353, embora detectando 38,9 % destes, parece ter mais positividade associada aos outros scores de menos probabilidade de TB, tais como “não se aplica” (NSA) (42,8 %), “possível” (50 %), “pouco provável” (100%). A IgG4 contribui com menos soros positivos, que se concentra nos NSA (14,3 %) e “muito provável” (11,3 %). Nenhum desses achados apresentou significância estatística, o que pode ser explicado pelo baixo número amostral.

Tabela 14 – Distribuição de imunorreatividade de IgG1-Rv3353 de acordo com as variáveis de estudo.

Variáveis	Número de positivos para IgG1-Rv3353/total (n%)		
	TB <sup>a</sup>	ILTB <sup>b</sup>	HC <sup>c</sup>
<b>Idade (anos)</b>	18/45 (40)	2/14 (14,3)	4/13 (30,7)
0 - >5	6/16 (37,5)	0/5 (0)	0/2 (0)
5-10	5/8 (62,5)	1/4 (25)	4/7 (57,1)
>10	7/21 (33,3)	1/3 (33,3)	0/4 (0)
<b>Gênero</b>			
Masculino	11/22 (50)	0/8 (0)	3/6 (50)
Feminino	7/23 (30,4)	2/6 (33,3)	1/7 (14,3)
<b>Sorologia HIV</b>			
Positivo	2/6 (33,3)		
Negativo	16/39 (41)		
<b>Forma clínica</b>			
TB Pulmonar	15/32 (46,9)		
TB Extrapulmonar	3/13 (23,1)		
TB linfonodo	2/6 (33,3)		
TB osteoarticular	1/4 (25)		
TB pleural	0/2 (0)		
TB miliar	0/1 (0)		
<b>Análises laboratoriais</b>			
<b>PT</b>			
Positivo	8/17 (47)		
Negativo	6/9 (66,7)		
<b>BAAR</b>			
Positivo	4/14 (28,6)		
Negativo	8/21 (38,1)		
NR	6/10 (60)		
<b>Cultura</b>			
Positiva	4/10 (40)		
Negativa	7/17 (41,2)		
NR	7/18 (38,9)		
<b>TRM</b>			
Positivo	0/6 (0)		
Negativo	4/8 (50)		
NR	14/31 (45,2)		
<b>Diagnóstico confirmado</b>			
TB confirmado	4/12 (33,3)		
TB não confirmado	14/33 (42,4)		
<b>Score clínico</b>			
NSA	7/21 (33,3)		
Pouco provável	0/1 (0)		
Possível	1/5 (20)		
Muito provável	10/18 (55,5)		

P: Número de positivities nas amostras; N: número de amostras; <sup>a</sup>TB = Tuberculose, <sup>b</sup>ILTB = Infecção latente por Tuberculose, <sup>c</sup>HC = controles assintomáticos, PT: Prova tuberculínica; NR: não realizado; BAAR: Bacilo álcool-ácido resistente; TRM: Teste rápido molecular

Tabela 15 – Distribuição de imunorreatividade de IgG3-Rv3353 de acordo com as variáveis de estudo.

Variáveis	Número de positivos para IgG3-Rv3353/total (%)		
	TB <sup>a</sup>	ILTB <sup>b</sup>	HC <sup>c</sup>
<b>Idade (anos)</b>	19/44 (43,2)	2/14 (14,3)	5/13 (38,5)
0 - >5	8/15 (53,3)	1/5 (20)	1/2 (50)
5-10	1/8 (12,5)	0/4 (0)	3/7 (42,8)
>10	10/21 (47,6)	0/3 (0)	1/4 (25)
<b>Gênero</b>			
Masculino	11/22 (50)	2/8 (25)	5/6 (83,3)
Feminino	8/22 (36,3)	0/6 (0)	0/7 (0)
<b>Sorologia HIV</b>			
Positivo	2/5 (40)		
Negativo	17/39 (43,6)		
<b>Forma clínica</b>			
TB Pulmonar	16/31 (51,6)		
TB Extrapulmonar	3/13 (23,1)		
TB linfonodo	1/6 (16,7)		
TB osteoarticular	1/4 (25)		
TB pleural	1/2 (50)		
TB miliar	0/1 (0)		
<b>Análises laboratoriais</b>			
<b>PT</b>			
Positivo	8/17 (47,1)		
Negativo	4/9 (44,4)		
<b>BAAR</b>			
Positivo	7/14 (50)		
Negativo	7/20 (35)		
NR	5/10 (50)		
<b>Cultura</b>			
Positiva	5/10 (50)		
Negativa	5/16 (31,2)		
NR	9/18 (50)		
<b>TRM</b>			
Positivo	0/6 (0)		
Negativo	2/7 (28,6)		
NR	17/31 (54,8)		
<b>Diagnóstico confirmado</b>			
TB confirmado	5/12 (41,7)		
TB não confirmado	14/32 (43,7)		
<b>Score clínico</b>			
NSA	9/21 (42,8)		
Pouco provável	1/1 (100)		
Possível	2/4 (50)		
Muito provável	7/18 (38,9)		

P: Número de positivities nas amostras; N: número de amostras; <sup>a</sup>TB = Tuberculose, <sup>b</sup>ILTB = Infecção latente por Tuberculose, <sup>c</sup>HC = controles assintomáticos, PT: Prova tuberculínica; NR: não realizado; BAAR: Bacilo álcool-ácido resistente; TRM: Teste rápido molecular

Tabela 16 – Distribuição de imunorreatividade de IgG4-Rv2034 entre as variáveis de estudo.

Variáveis	Número de positivos para IgG4-Rv2034/total (%)		
	TB <sup>a</sup>	ILTB <sup>b</sup>	HC <sup>c</sup>
<b>Idade (anos)</b>	5/44 (11,7)	4/14 (28,6)	3/13 (23,1)
0 - >5	2/15 (13,3)	1/5 (20)	1/2 (50)
5-10	0/8 (0)	1/4 (25)	1/7 (14,3)
>10	3/21 (14,3)	2/3 (66,7)	1/4 (25)
<b>Gênero</b>			
Masculino	3/22 (13,6)	1/8 (12,5)	1/6 (16,7)
Feminino	2/22 (9,1)	3/6 (50)	2/7 (28,6)
<b>Sorologia HIV</b>			
Positivo	0/5 (0)		
Negativo	5/39 (12,8)		
<b>Forma clínica</b>			
TB Pulmonar	5/31 (16,1)		
TB Extrapulmonar	0/13 (0)		
TB linfonodo	0/6 (0)		
TB osteoarticular	0/4 (0)		
TB pleural	0/2 (0)		
TB miliar	0/1 (0)		
<b>Análises laboratoriais</b>			
<b>PT</b>			
Positivo	2/17 (11,8)		
Negativo	1/9 (11,1)		
<b>BAAR</b>			
Positivo	3/14 (21,4)		
Negativo	1/20 (5)		
NR	1/10 (10)		
<b>Cultura</b>			
Positiva	1/10 (10)		
Negativa	1/16 (6,25)		
NR	3/18 (16,7)		
<b>TRM</b>			
Positivo	0/6 (0)		
Negativo	0/7 (0)		
NR	5/31 (16,1)		
<b>Diagnóstico confirmado</b>			
TB confirmado	1/12 (8,3)		
TB não confirmado	4/32 (12,5)		
<b>Score clínico</b>			
NSA	3/21 (14,3)		
Pouco provável	0/1 (0)		
Possível	0/4 (0)		
Muito provável	2/18 (11,1)		

P: Número de positivities nas amostras; N: número de amostras; <sup>a</sup>TB = Tuberculose, <sup>b</sup>ILTB = Infecção latente por Tuberculose, <sup>c</sup>HC = controles assintomáticos, PT: Prova tuberculínica; NR: não realizado; BAAR: Bacilo álcool-ácido resistente; TRM: Teste rápido molecular

A partir do *cut off* definido de TB X ILTB/HC (Tabela 12), foi realizada análise combinatória entre as positivities aos testes para diagnósticos da TB, principalmente os mais rápidos de serem realizados (Tabela 17), objetivando avaliar

se o teste de ELISA poderia ser utilizado como adjuvante, auxiliando na triagem de TB. Observou-se que, apesar do N amostral reduzido, os ensaios de IgG1- e IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034 demonstram capacidade de adicionar positividade na identificação da TB, principalmente na forma clínica pulmonar, quando em combinação com outras ferramentas diagnósticas rápidas PT e BAAR. Embora o ELISA aqui desenvolvido adicione positividade aos testes com cultura-, este é laborioso e moroso. Nota-se, de modo especial, agregação de positividade de IgG1 e IgG3-Rv 3353, quando é realizada a análise combinatória com os testes diagnósticos de rotina que obtiveram resultados negativos ou não realizados (Tabela 17). Observa-se também que combinando os resultados de IgG1- e IgG3-Rv3353, há aumento da positividade, sugerindo que a combinação destes biomarcadores em um teste de triagem, seria útil no diagnóstico da TB.

Tabela 17 – Sensibilidade dos testes diagnósticos de rotina na TB da criança combinado com a sensibilidade do ELISA IgG1- e IgG3-Rv3353, e IgG4-Rv2034.

Exames	Numero de positivos / total (%)			
		Rv3353		Rv2034
		IgG1	IgG3	IgG4
<b>Total PT +</b>	<b>17/26 (65,4)</b>			
Positivo TBP	13/26 (50)	7/26 (27,9)	6/26 (23)	2/26 (8,7)
<u>PT<sup>+</sup>/IgG1/IgG3-Rv 3353</u>		<u>9/26 (34,5)</u>		
<u>PT<sup>+</sup>/IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4-Rv2034</u>		<u>9/26 (34,5)</u>		
Positivo TBE	4/26 (15,4)	1/26 (3,8)	2/26 (8,7)	0/26 (0)
<u>PT<sup>+</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>		<u>2/26 (7,7)</u>		
<u>PT<sup>+</sup>/IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4-Rv2034</u>		<u>2/26 (7,7)</u>		
Negativo TBP	6/26 (23)	4/26 (15,4)	3/26 (11,5)	1/26 (3,8)
<u>PT<sup>-</sup>/IgG1/ IgG3-Rv 3353+</u>		<u>5/26 (19,2)</u>		
<u>PT<sup>-</sup>/IgG1/IgG3-Rv3353/IgG4 Rv2034+</u>		<u>5/26 (19,2)</u>		
Negativo TBE	3/26 (11,5)	2/26 (7,7)	1/26 (3,8)	0/26 (0)
<u>PT<sup>-</sup>/IgG1/ IgG3-Rv 3353+</u>		<u>2/26 (7,7)</u>		
<u>PT<sup>-</sup>/IgG1/IgG3-Rv3353/IgG4 Rv2034+</u>		<u>2/26 (7,7)</u>		
<u>Total PT/IgG1/ IgG3-Rv 3353+</u>		<u>24/26 (92,3)</u>		
<u>Total PT/IgG1/IgG3-Rv3353/IgG4Rv2034<sup>+</sup></u>		<u>24/26 (92,3)</u>		
NR TBP	13/19 (68,4)	4/19 (21)	7/19 (36,8)	2/19 (10,5)
<u>PT<sup>NR</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353<sup>+</sup></u>		<u>7/19 (36,8)</u>		
<u>PT<sup>NR</sup>/IgG1/IgG3-Rv3353/IgG4-Rv2034<sup>+</sup></u>		<u>7/19 (36,8)</u>		
NR TBE	6/19 (31,6)	0/19 (0)	0/19 (0)	0/19 (0)
<b>PT/ELISA</b>		<b>27/45 (60)</b>	<b>26/44 (59)</b>	<b>20/44 (45,4)</b>
<b>PT/IgG1 e IgG3-Rv 3353<sup>+</sup></b>		<b>31/44 (70,4)</b>		
<b>PT/IgG1/IgG3-Rv3353/IgG4-Rv2034<sup>+</sup></b>		<b>31/44 (70,4)</b>		

<b>Total BAAR +</b>	<b>14/35 (40)</b>			
Positivo TBP	11/35 (31,4)	4/35 (11,4)	6/35 (17,1)	0/35 (0)
<u>BAAR+/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>7/35 (20)</u>	
<u>BAAR+/IgG1/IgG3-Rv</u>			<u>7/35 (20)</u>	
<u>3353/IgG4Rv2034</u>				
Positivo TBE	3/35 (8,6)	0/35 (0)	1/35 (2,8)	0/35 (0)
<u>BAAR+/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>1/35 (2,8)</u>	
<u>BAAR+/IgG1/IgG3-Rv</u>			<u>1/35 (2,8)</u>	
<u>3353/IgG4Rv2034</u>				
Negativo TBP	11/35 (37,1)	6/35 (17,1)	5/35 (14,3)	1/35 (2,8)
<u>BAAR-/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>9/35 (25,7)</u>	
<u>BAAR-/IgG1/IgG3-Rv</u>			<u>9/35 (25,7)</u>	
<u>3353/IgG4Rv2034</u>				
Negativo TBE	8/35 (22,8)	2/35 (5,7)	2/35 (5,7)	0/35 (0)
<u>BAAR-/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>2/35 (5,7)</u>	
<u>BAAR-/IgG/IgG3-Rv</u>			<u>2/35 (5,7)</u>	
<u>3353/IgG4Rv2034</u>				
<u><b>Total BAAR/IgG1 e IgG3-Rv</b></u>			<u><b>25/44 (56,8)</b></u>	
<u><b>3353+</b></u>				
<u><b>Total BAAR/IgG1/IgG3-</b></u>			<u><b>25/44 (56,8)</b></u>	
<u><b>Rv3353/IgG4-Rv2034+</b></u>				
NR TBP	8/10 (80)	5/10 (50)	5/10 (50)	1/10 (10)
<u>BAAR<sup>NR</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>6/10 (60)</u>	
<u>BAAR<sup>NR</sup>/IgG1/IgG3-Rv</u>			<u>6/10 (60)</u>	
<u>3353/IgG4Rv2034</u>				
NR TBE	2/10 (20)	1/10 (10)	0/10 (0)	1/10 (10)
<u>BAAR<sup>NR</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>1/10 (10)</u>	
<u>BAAR<sup>NR</sup>/IgG1/IgG3-Rv</u>			<u>1/10 (10)</u>	
<u>3353/IgG4Rv2034</u>				
<b>BAAR+/ELISA+</b>		<b>28/45 (62,2)</b>	<b>26/44 (59)</b>	<b>17/44 (38,6)</b>
<b>BAAR/IgG1 e IgG3-Rv 3353</b>			<b>32/44 (72,7)</b>	
<b>BAAR/IgG1/IgG3-Rv</b>			<b>32/44 (72,7)</b>	
<b>3353/IgG4Rv2034</b>				

---

<b>Cultura</b>	<b>10/27 (37)</b>			
Positivo TBP	7/27 (25,9)	3/27 (11,1)	4/27 (14,8)	1/27 (3,7)
<u>Cultura<sup>+</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>4/27 (14,8)</u>	
<u>Cultura<sup>+</sup>/IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</u>			<u>4/27 (14,8)</u>	
Positivo TBE	3/27 (11,1)	1/27 (14,8)	4/27 (14,8)	0/27 (0)
<u>Cultura<sup>+</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>4/27 (14,8)</u>	
<u>Cultura<sup>+</sup>/IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</u>			<u>4/27 (14,8)</u>	
Negativo TBP	10/27 (37)	7/27 (25,9)	3/27 (11,1)	1/27 (3,7)
<u>Cultura<sup>-</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>8/27 (29,6)</u>	
<u>Cultura<sup>-</sup>/IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</u>			<u>8/27 (29,6)</u>	
Negativo TBE	7/27 (25,9)	1/27(3,7)	2/27 (7,4)	0/27 (0)
<u>Cultura<sup>-</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>2/27 (7,4)</u>	
<u>Cultura<sup>-</sup>/IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</u>			<u>2/27 (7,4)</u>	
NR TBP	15/18 (83,3)	6/18 (33,3)	9/18 (50)	3/18 (16,7)
<u>Cultura<sup>NR</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>9/18 (50)</u>	
<u>Cultura<sup>NR</sup>/IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</u>			<u>9/18 (50)</u>	
NR TBE	3/18 (16,7)	1/18 (5,5)	0/18 (0)	0/18 (0)
<u>Cultura<sup>NR</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>1/18 (5,5)</u>	
<u>Cultura<sup>NR</sup>/IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</u>			<u>1/18 (5,5)</u>	
<b>Cultura<sup>+</sup>/ELISA+</b>		<b>25/45 (55,5)</b>	<b>24/44 (54,5)</b>	<b>14/44 (31,8)</b>
<b>Cultura/IgG1 e IgG3-Rv 3353</b>			<b>30/44 (68,1)</b>	
<b>Cultura/IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</b>			<b>30/44 (68,1)</b>	

---

<b>TRM</b>	<b>6/14 (42,8)</b>			
Positivo TBP	3/14 (21,4)	0/14 (0)	0/14 (0)	0/14 (0)
Positivo TBE	3/14 (21,4)	0/14 (0)	0/14 (0))	0/14 (0)
Negativo TBP	7/14 (50)	5/14 (35,7)	2/14 (14,3)	0/14 (0)
<u>TRM/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>5/14 (35,7)</u>	
<u>TRM/IgG1/IgG3-Rv</u>			<u>5/14 (35,7)</u>	
<u>3353/IgG4Rv2034</u>				
Negativo TBE	1/14 (7,1)	0/14 (0)	0/14 (0)	0/14 (0)
NR TBP	22/31 (71)	11/31 (35,5)	14/31 (45,2)	5/31 (16,1)
<u>TRM<sup>NR</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>15/31 (48,4)</u>	
<u>TRM<sup>NR</sup>/IgG1/IgG3-Rv</u>			<u>15/31 (48,4)</u>	
<u>3353/IgG4-Rv2034</u>				
NR TBE	9/31 (29)	3/31 (9,7)	3/31 (9,7)	0/31 (0)
<u>TRM<sup>NR</sup>/IgG1 e IgG3-Rv 3353</u>			<u>4/31 (12,9)</u>	
<u>TRM<sup>NR</sup>/IgG1/IgG3-Rv</u>			<u>4/31 (12,9)</u>	
<u>3353/IgG4-Rv2034</u>				
<b>TRM+/ELISA+</b>		<b>25/45 (55,5)</b>	<b>25/44 (56,8)</b>	<b>20/44 (45,4)</b>
<b>TRM+/IgG1 e IgG3-Rv 3353</b>			<b>25/44 (56,8)</b>	
<b>TRM+/IgG1/IgG3-Rv</b>			<b>25/44 (56,8)</b>	
<b>3353/IgG4Rv2034</b>				
<b>BAAR-/Cultura<sup>+</sup></b>	<b>4/21 (19)</b>			
/TBP Cultura+	2/21 (9,5)	1/21 (4,8)	1/21 (4,8)	0/21 (0)
<u>BAAR-/Cultura<sup>+</sup> IgG1 e IgG3-</u>			<u>1/21 (4,8)</u>	
<u>Rv 3353</u>				
<u>BAAR-/Cultura<sup>+</sup> IgG1/IgG3-</u>			<u>1/21 (4,8)</u>	
<u>Rv 3353/IgG4Rv2034</u>				
/TBE Cultura+	2/21 (9,5)	1/21 (4,8)	1/21 (4,8)	0/21 (0)
<u>BAAR-/Cultura<sup>+</sup> IgG1 e IgG3-</u>			<u>1/21 (4,8)</u>	
<u>Rv 3353</u>				
<u>BAAR-/Cultura<sup>+</sup> IgG1/IgG3-Rv</u>			<u>1/21 (4,8)</u>	
<u>3353/IgG4Rv2034</u>				
<b>BAAR-/Cultura<sup>-</sup></b>	<b>12/21 (57,1)</b>			
/TBP Cultura -	8/21 (38)	5/21 (23,8)	3/21 (14,3)	1/21 (4,8)
<u>BAAR-/Cultura- IgG1 e IgG3-</u>			<u>6/21 (28,6)</u>	
<u>Rv 3353</u>				
<u>BAAR-/Cultura- IgG1 e IgG3-</u>			<u>6/21 (28,6)</u>	
<u>Rv 3353</u>				
/TBE Cultura -	4/21 (19)	1/21 (4,8)	1/21 (4,78)	0/21 (0)
<u>BAAR-/Cultura- IgG1 e IgG3-</u>			<u>1/21 (4,8)</u>	
<u>Rv 3353</u>				
<u>BAAR-/Cultura- IgG1 e IgG3-</u>			<u>1/21 (4,8)</u>	
<u>Rv 3353</u>				

<b>BAAR-/Cultura<sup>NR</sup></b>	<b>4/21 (19)</b>			
/ TBP Cultura NR	3/21 (14,3)	0/21 (0)	1/21 (19)	0/21(0)
<b><u>BAAR-/Cultura- IgG1 e IgG3- Rv 3353</u></b>			<u>1/21 (4,8)</u>	
<b><u>BAAR-/Cultura- IgG1 e IgG3- Rv 3353</u></b>			<u>1/21 (4,8)</u>	
/ TBE Cultura NR	1/21 (4,8)	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21(0)
<b>BAAR-/TRM<sup>+</sup></b>	<b>3/21 (14,3)</b>			
/ TBP TRM <sup>+</sup>	1/21 (4,8)	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)
/ TBE TRM <sup>+</sup>	2/21 (9,5)	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)
<b>BAAR-/TRM<sup>-</sup></b>	<b>7/21 (33,3)</b>			
/ TBP TRM <sup>-</sup>		4/21 (19)	2/21 (9,5)	0/21 (0)
<b><u>BAAR-/TRM-/ IgG1 e IgG3- Rv 3353</u></b>			<u>5/21 (23,8)</u>	
<b><u>BAAR-/TRM-/ IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</u></b>			<u>5/21 (23,8)</u>	
/ TBE TRM <sup>-</sup>		0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)
<b>BAAR-/TRM<sup>NR</sup></b>	<b>10/21 (47,6)</b>			
/ TBP TRM <sup>NR</sup>	5/21 (23,8)	2/21 (9,5)	1/21 (4,8)	1/21 (4,8)
<b><u>BAAR-/TRM-/ IgG1 e IgG3- Rv 3353</u></b>			2/21 (9,5)	
<b><u>BAAR-/TRM-/ IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</u></b>			2/21 (9,5)	
/ TBE TRM <sup>NR</sup>	5/21 (23,8)	2/21 (9,5)	2/21 (9,5)	-
<b><u>BAAR-/TRM-/ IgG1 e IgG3- Rv 3353</u></b>			2/21 (9,5)	
<b><u>BAAR-/TRM-/ IgG1/IgG3-Rv 3353/IgG4Rv2034</u></b>			2/21 (9,5)	

IC95% = intervalo de confiança no percentil 95; TBP: Tuberculose pulmonar; TBE: Tuberculose extrapulmonar; PT: Prova tuberculínica; NR: não realizado; BAAR: Bacilo álcool-ácido resistente; TRM: Teste rápido molecular; NA: Não avaliado.

Vale ressaltar que a sensibilidade dos testes variou de baixa a moderada, o que explicaria a baixa identificação entre os testes diagnósticos positivos. A adição de positividade, quando da associação dos ensaios ELISA com PT negativa ou não realizada, alerta para a necessidade de avaliação prospectiva, pois pode se tratar de casos ILTB ou HC em progressão silenciosa de estágio de doença.

Para as amostras TBP, também foi realizada análise combinatória entre os ensaios Rv 3353 e Rv 2034 e o score de pontuação. Observa-se que os ensaios

sorológicos não agregam positividade, exceto para o score classificado como “possível” (de 20,8% para 25%), além de apresentar reatividades naqueles em que o score não foi realizado (Tabela 18).

Tabela 18 – Sensibilidade do score de pontuação na TB da criança, combinado com a sensibilidade do ELISA IgG1- e IgG3-Rv3353, e IgG4 -Rv2034.

Score de Pontuação	de N/T	Numero de positivos/total (%)				Combinatória
		Rv3353		Rv2034		
		IgG1	IgG3	IgG4		
Pouco Provável	1/24 (4,2)	-	1/24 (4,2)	-	1/24 (4,2)	
Possível	5/24 (20,8)	1/24 (4,2)	2/24 (6,2)	-	<b>6/24 (25)</b>	
Muito provável	18/24 (75)	10/24 (41,7)	7/24 (29,2)	2/24 (8,3)	12/24 (50)	
NR	21/45 (28,1)	6/45 (13,3)	8/44 (18,2)	2/44 (4,5)	<b>9/45 (20)</b>	

N/T= número de classificados pelo score de pontuação/total; NR: não realizado

## 5 DISCUSSÃO

Um efetivo controle da tuberculose depende de diagnóstico precoce e tratamento adequado. O tema é controverso e ainda requer investigações, face à diversidade de apresentação clínica da TB e da heterogeneidade de resposta imune a variados antígenos micobacterianos. Davidow e colaboradores <sup>(82)</sup> (2005) descrevem que a infecção por *Mtb* passa por várias fases, inclusive de adaptação do bacilo ao sistema imune do hospedeiro, quanto ao seu metabolismo e perfis de transcrição de antígenos ao longo da infecção. Isso pode influenciar na diversidade de respostas imunes de cada indivíduo, com geração de diferentes perfis de Ac, mesmo que as vezes possam parecer antagônicos, como a presença de Ac que parecem ter atividade protetora, na fase ativa. Sabe-se que os pacientes com TB apresentam Ac IgG reativos contra diversos Ag específicos de *Mtb*. Portanto, o conhecimento sobre a modulação da resposta imune humoral nos diferentes estágios de evolução clínica da TB pode contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e para o controle da doença. O conhecimento da resposta imune humoral da faixa etária pediátrica, frente a antígenos micobacterianos, significa um importante avanço, uma vez que o diagnóstico da TB nesta população é complexo, pois as crianças desenvolvem formas paucibacilares de TBP e podem ter dificuldade em expectorar <sup>(61)</sup>, o que compromete a investigação diagnóstica. No presente estudo, apenas 26,7% dos casos de TB foram confirmados, segundo os critérios de Graham <sup>(33)</sup>. O baixo número de casos confirmados pode ser atribuído ao fato de crianças menores desenvolverem formas paucibacilares da doença <sup>(3)</sup>.

Na Tabela 2, onde descrevemos a distribuição das características diagnósticas dos participantes classificados como TB ativa (infelizmente nenhum outro teste diagnóstico foi realizado nos grupos ILTB e HC, que não a PT), observa-se frequência elevada de crianças, cujos testes diagnósticos resultaram negativos (36 % - 63 %) ou que não foram realizados (22% - 69%). Isto corrobora o quanto é desafiador o diagnóstico da TB na faixa etária pediátrica, especialmente nos menores de cinco anos <sup>(3)</sup>. Entretanto, como no período de 2014 e início de 2015, houve desabastecimento do PPD por interrupção da produção da proteína PPD RT23, utilizada para a realização da PT, pelo laboratório dinamarquês, isto em parte

comprometeu a avaliação diagnóstica dos participantes do projeto anterior pela PT (142,143), refletindo em nosso estudo.

Portanto, esforços devem ser contínuos para compreender a produção de Ac, não só na doença ativa, como também em outros estados categóricos da TB (ILTB, infecção incipiente e doença subclínica), aos diferentes Ag micobacterianos específicos, o que, entre outras informações, poderia contribuir para explorar novos testes, visando o diagnóstico precoce da TB. Entretanto, os estudos de triagem de potenciais biomarcadores para auxiliar no diagnóstico precoce da TB devem contemplar moléculas secretadas durante a doença ativa, bem como nos espectros de infecção. No presente estudo, avaliamos dois antígenos pela primeira vez, um preferencialmente expresso na multiplicação do bacilo (Rv3353) e o Rv2034, expresso na fase de latência, quanto ao reconhecimento por subclasses de IgG, biomarcadores ainda pouco explorados nos estudos da TB em crianças.

Analisando as médias das DO das amostras testadas, nossos resultados indicam que amostras de participantes com TB apresentaram níveis mais elevados de anticorpos específicos para IgG1-Rv3353 e IgG3-Rv3353, em comparação com os HC, porém sem diferença significativa para o grupo ILTB. Por outro lado, as médias dos grupos TB e HC, foram significativamente diferentes ( $p = 0,04$ ) para o biomarcador IgG4-Rv2034, que aumentou em direção ao HC. Nota-se na Figura 11, de dispersão das DOs, um agrupamento de amostras hiper-reativas, para todos os grupos, inclusive para o grupo HC, onde a média é mais elevada. Estas amostras influenciaram nos resultados, sugerindo que esses níveis mais altos representariam algum grau de proteção em relação à infecção e adoecimento por *Mtb*; a maioria destes casos já possuía IgG1/3-Rv3353 elevados, sugerindo estarem infectados, mas com resposta protetora. Entretanto, não havia maiores informações disponíveis sobre a clínica e os dados radiológicos destes casos hiper-reativos. Portanto, maiores estudos devem ser realizados de forma prospectiva, a fim de acompanhar a evolução clínica destas crianças hiper-reativas para IgG4-Rv2034 e a modulação destes aliados as IgG1 e IgG3-Rv3353, antígeno de multiplicação ativa.

A análise da curva ROC não demonstrou bom desempenho dos antígenos Rv3353 e Rv2034, com sensibilidades baixas a moderadas, e especificidade  $>70\%$ . Para um produto alvo para triagem em suspeitos de TB, IgG1 e IgG3-Rv3353 se mostram imperfeitos, pois, embora alcancem especificidade recomendada para o

teste ( $\geq 70\%$ ), a sensibilidade foi moderada. De fato, foram observadas positivities entre os grupos ILTB e HC ao Rv3353, antígeno associado à multiplicação bacteriana. Não sabemos se esses grupos estariam se movendo de maneira silenciosa entre os espectros de evolução da infecção por *Mtb*, e, portanto, esse marcador teria potencial em detectar indivíduos realmente infectados latentemente, de forma a constituir-se em teste adjuvante na triagem de casos com maior risco de evolução para doença ativa. As amostras do grupo HC parecem apresentar dinâmica de ILTB, o que justificaria as altas DO observadas. Uma das hipóteses para esse achado seria a possibilidade de que esses grupos tenham recebido maior carga bacilar ou tenham sido submetidos a vários contatos, portanto maior estímulo antigênico, o que os colocaria em um estágio de maior risco de progressão para a TB subclínica ou TB ativa. Outra possibilidade seria que esse estímulo teria levado à maior produção de Ac protetores, os quais estariam impedindo uma mudança de classificação clínica, especialmente no grupo HC. Jacobs e colaboradores <sup>(31)</sup> (2016) descreveram que altos títulos de IgG contra a proteína PPD foram observados em indivíduos com exposição persistente, porém com PT negativa e que estudos realizados com indivíduos controles saudáveis de países de alta carga apresentaram reatividade alta de anticorpos ao *Mtb*, o que sugeriria uma característica protetiva, por limitação da disseminação do bacilo. Estes autores descrevem que 90% dos indivíduos com TB têm títulos elevados de imunoglobulina sérica contra Ag micobacterianos, no momento da apresentação clínica, com variação individual <sup>(31)</sup>. Parte dos indivíduos expostos a infecção por *Mtb* são capazes de efetivamente eliminá-la <sup>(11)</sup> e desenvolver uma resposta imune contra alguns Ag, mesmo sem resposta positiva na PT. Nossos resultados também podem indicar produção de Ac específicos contra os antígenos, em indivíduos com investigação diagnóstica convencional negativa pela PT.

Isso corrobora a necessidade de futuros estudos, que avaliem correlação entre maiores níveis séricos de subclasse de IgG, com maior risco de adoecimento. Além disso, seria conveniente o acompanhamento clínico e laboratorial, com dosagens sorológicas prospectivas, para a detecção de uma possível mudança de categoria clínica ou verificação do declínio gradual de Ac, após eliminação do bacilo pelo hospedeiro. Menon e colaboradores <sup>(144)</sup> (2018) descrevem que indivíduos saudáveis podem ser imunes após o contato com pacientes com TB e que a

natureza da resposta imune gerada pela infecção por *Mtb*, contribuiria para determinar adoecimento ou não. Estudos de desenho prospectivo contribuiriam para o melhor conhecimento da modulação da resposta imune na faixa etária pediátrica.

As reatividades específicas de imunidade humoral aos Ag micobacterianos Rv3353 e Rv2034 foram similares às observadas em outro estudo de 2018, em adultos <sup>(81)</sup>. Araújo e colaboradores observaram maior tendência a elevação dos subtipos IgG1- e IgG3-Rv3353, no grupo TB. Outros estudos descrevem uma predominância de IgG1 e IgG3 geradas contra *M. leprae* e *Mtb*, entre indivíduos com TB ativa <sup>(123,145)</sup>. Os indivíduos ILTB também demonstraram, com significância limítrofe, níveis menos elevados de IgG3-Rv3353, quando comparados com os casos de TB ( $P = 0,071$ ). As crianças com TB ativa apresentaram níveis de IgG1-Rv3353 mais altos, embora sem diferença estatística significativa, em comparação com o grupo HC ( $P = 0,320$ ) e ILTB ( $P = 0,527$ ).

A PT é o teste recomendado e disponível no SUS como ferramenta para o diagnóstico de ILTB e como auxiliar no diagnóstico de TBP em crianças <sup>(3,141)</sup>. A PT foi positiva em quase 65% dos casos de TB que realizaram o teste, o que está dentro da faixa de sensibilidade descrita para a PT. A sensibilidade deste método varia de 50 a 70% nos pacientes com quadro clínico sugestivo de TB e de 75 a 85% naqueles com TB confirmada, sendo baixa (45%) em pacientes imunocomprometidos. A especificidade varia de 95 a 100% nas crianças não vacinadas e de 49 a 65% nas vacinadas <sup>(56,86,87)</sup>. Entretanto, a combinatória dos resultados da PT/IgG1/IgG3Rv3353 aumentou a positividade neste grupo para 70,4%.

Os testes bacteriológicos, como pesquisa do BAAR e cultura de escarro, têm baixo rendimento nos casos de TB pediátrica <sup>(3,6,16)</sup>. O mesmo ocorreu na população aqui estudada, onde a baciloscopia foi positiva em 40% e a cultura em 37% dos casos em que os testes foram realizados. O teste TRM (RT-PCR), cujos resultados são fornecidos mais rapidamente, contribuiu para o diagnóstico de TB ativa em 43% dos participantes (Tabela 2). A combinatória dos resultados dos testes BAAR ou TRM com a IgG1/IgG3-Rv3354 também aumentou a sensibilidade para 72,7 % e 56,8 %.

A investigação da história de contato é importante em crianças, especialmente nos menores de 5 anos <sup>(55)</sup>, porém só foi conhecida em 51,1% dos casos de TB, mas foi identificada em 100 % dos ILTB e HC.

Houve diferença significativa entre os gêneros masculino e feminino do grupo TB para a reatividade média de IgG3-Rv3353, com relação ao grupo ILTB ( $p = 0,0002$ ), o que não ocorreu para os outros biomarcadores. Quanto à sorologia HIV, somente descrita para o grupo TB, IgG4-Rv2034 foi significativamente mais elevada no grupo soronegativo ( $p = 0,021$ ).

É importante mencionar que no projeto inicial, onde amostras de soros e dados dos pacientes foram coletados <sup>(23)</sup>, as radiografias de tórax não foram utilizadas em análise, pois não foram revisadas pela equipe de pesquisa, à época do estudo. Também ressaltamos que, de acordo com o mesmo estudo, todos os participantes incluídos haviam sido vacinados, impossibilitando a avaliação da influência da vacinação BCG, nos níveis de subclasses de IgG, aos antígenos testados. Igualmente, não foi avaliada influência de possíveis infecções prévias por MNT.

Até o momento, não foram encontradas publicações relacionadas à TB em crianças, que tenham avaliado a imunorreatividade de IgG e seus subtipos para os Ag micobacterianos Rv2034 e Rv3353. Em estudo de 2017, realizado em adultos, os casos de TB ativa apresentavam perfil imunodominante de IgG1 para os Ag associados à latência ESAT6:CFP10, Rv2628, Rv2034 e Rv2029 e às proteínas quiméricas PstS1(285-374):CFP-10 e Rv3353, por ele estudados<sup>(72)</sup>; contrariamente, os autores observaram baixa produção de IgG2 para os Ag PstS1(285-374):CFP10, Rv3353 e de subclasse IgG3 para Rv2034 nos casos de TB, quando comparados aos controles, sugerindo uma possível função protetora nestes últimos<sup>(72)</sup>. Em nosso estudo, que contemplou amostras de pacientes em faixa etária pediátrica, a subclasse IgG2 não apresentou bons resultados na etapa de padronização e não foi utilizada para os nossos Ag, assim como a subclasse IgG3 não foi ensaiada para o Ag Rv2034.

Entretanto, em um estudo de 2016, Mattos e colaboradores <sup>(123)</sup> mostraram potencial diagnóstico para detecção de TB, na titulação de IgG1 contra um painel de antígenos micobacterianos (Rv0717, Rv0867, Rv1733, Rv1737, Rv2029, Rv2389, Rv3353, ESAT6 e CFP10), em adolescentes mais velhos e adultos, com grande

variação de sensibilidade e especificidade; todavia, não se investigou o perfil de imunorreatividade desses anticorpos na ILTB. Como em nosso estudo, os níveis de IgG1 foram mais elevados nas amostras TB ativa para o Ag Rv 3353; Rv 2024 não foi estudado no ensaio de 2016<sup>(123)</sup>. Já Araújo e colaboradores <sup>(81)</sup>, em ensaio de 2018, utilizaram amostras de sangue de ILTB e casos de TB ativa para avaliar o perfil de imunorreatividade das subclasses de IgG contra os antígenos associados a latência Rv2029c, Rv2031c, Rv2034, Rv2628, ESAT6:CFP10, e às proteínas quiméricas PstS1 (285-374):CFP10 e Rv3353. No grupo de TB ativa, os níveis de IgG1-Rv3353 foram mais elevados, seguidos dos níveis de IgG3-Rv3353, resultado este similar aos obtidos em nosso grupo de crianças. Entretanto, contrariamente, os resultados de IgG4-Rv2034, em nosso estudo, mostraram reatividade média que aumenta do grupo TB para o ILTB e HC, ao passo que, no estudo de 2018, esta subclasse de IgG não apresentou resultados descritórios entre os grupos e, portanto, não foi analisada. Entre os grupos testados por Araújo e col, em adultos, a IgG1-Rv3353 apresentou aumento significativo de reatividade média entre TB vs ILTB e HC, enquanto IgG2 mostrou-se em média significativamente diminuída na TB vs ILTB/HC e a IgG3 não mostrou diferença entre os grupos, embora reatividade média mais elevada entre os ILTB/HC vs TB <sup>(81)</sup>. De maneira similar, em nosso estudo, IgG1-Rv3353 apresentou reatividade média aumentada na TB vs ILTB/HC, embora sem diferença significativa e diferentemente dos adultos, as crianças apresentaram reatividade média mais elevada, com significância *borderline* para IgG3-Rv 3353, entre TB vs ILTB ( $p = 0,071$ ), mas não para HC. Portanto, em crianças, pode haver diferenças na produção de determinados subtipos de IgG, quando comparados ao adulto, enquanto outros subtipos são produzidos similarmente para o mesmo antígeno.

Mc Lean e colaboradores <sup>(135)</sup> (2019) descrevem que, à medida que a carga de *Mtb* aumenta, há aumento nas respostas de isotipos IgG específicos, com elevação de subclasses de IgG1 e IgG3.

Em nosso estudo, IgG1 e IgG3-Rv3353 apresentaram, no geral, positivities moderadas, mas é interessante observar que a positividade está direcionada em mais de 60 % para os grupos de crianças <10 e mais de 50% em < cinco anos, que são grupos com imaturidade imunológica, o que não ocorreu para IgG4-Rv2034 ( $\leq 14,3$  %). Vale lembrar que existe um perfil de risco distinto de TB entre as

crianças, sendo que as mais novas e adolescentes têm maior risco de progressão de infecção para doença, do que crianças entre 5 e 10 anos de idade <sup>(41)</sup>. O biomarcador IgG3-Rv3353 foi o que apresentou maior positividade nas diferentes formas clínicas extrapulmonares, porém nenhum biomarcador detectou a forma clínica miliar. Ainda que IgG1- e IgG3-Rv3353 tenham mostrado positividade similar ao TB, surpreendentemente, esta ocorreu no grupo HC, todavia, o número de amostras testadas foi muito baixo, o que compromete a análise. Senol e colaboradores <sup>(146)</sup> (2009) descrevem que os perfis de Ac diferem entre crianças e adultos, pois são o reflexo da imaturidade do sistema imune que está em desenvolvimento. Assim, as crianças com TB tendem a menores títulos de Ac, os quais aumentam com a idade, como resultado da maturação imunitária, bem como do aumento da frequência de exposição ao bacilo. Entretanto, em nosso estudo as faixas polares (< cinco anos e >10 anos) mostraram frequência de positivities mais elevadas e similares em resposta a IgG3-Rv3353, sugerindo estar associado ao biomarcador utilizado.

Achkar & Ziegenbald<sup>(32)</sup> (2012) revisaram 23 artigos sobre avaliação da sorologia como método complementar para o diagnóstico de TB na infância e encontraram variação na sensibilidade (14 a 85%) e especificidade (86% a 100%), o que deve ser estímulo para novas pesquisas, face às dificuldades encontradas no campo do diagnóstico de TB na faixa etária pediátrica. A alta variabilidade na acurácia dos testes sorológicos pode ocorrer por fatores como: genética do hospedeiro, exposição a micobactérias ambientais, heterogeneidade da resposta de reconhecimento de antígeno dos indivíduos infectados por *Mtb*, em virtude da gravidade da doença, de cepa do bacilo, da imunidade e estado de saúde do paciente, além da taxa de endemicidade da TB na região <sup>(147,148)</sup>.

A TB apresenta aspectos clínicos, laboratoriais e radiológicos diferentes nas crianças menores de 10 anos, quando em comparação com os adolescentes e adultos <sup>(61)</sup>. O mesmo se pode afirmar quanto ao desenvolvimento imunológico, que difere entre as idades <sup>(23)</sup>. Questiona-se o quanto essas características teriam influenciado o resultado das análises, pois, no presente estudo, os biomarcadores IgG1-Rv3353, IgG3-Rv3353 e IgG4-Rv2034 não se mostraram úteis para discriminar TB de ILTB, embora mostrassem algumas tendências. Para o biomarcador Rv2034 (Tabela 10), quando se avaliou a resposta sorológica de acordo com o score clínico

por pontuação, observou-se tendência à maior reatividade média no grupo “TB muito provável” (978,83±870,44), quando comparado ao grupo “TB pouco provável (70,500), mas como este grupo é composto de apenas uma amostra, não apresentou significância estatística ( $p = 0,100$ ) como a obtida para o grupo “possível” (95,00±19,4079) ( $p = 0,022$ ).

No grupo ILTB, embora todos os ensaios tenham apresentado baixa taxa de positividade comparada a TB, foram observados níveis de anticorpos elevados que aumentam em direção ao HC, para IgG3-Rv3353 e, principalmente, IgG4-Rv2034, onde ocorreu diferença significativa apenas entre TB vs HC, mas não entre ILTB vs HC (Tabela 5). Hoff e colaboradores <sup>(149)</sup> (2007) descrevem que respostas significativas de anticorpos não se restringem a pacientes com TB, particularmente em áreas endêmicas, com altos níveis de exposição ao bacilo. Subentende-se que indivíduos ILTB abrigam menor carga bacilar que aqueles com TB, gerando menor quantidade de anticorpos. Em nosso estudo, nenhum ensaio imunodiagnóstico isolado obteve desempenho satisfatório na discriminação desses grupos. Porém, considerando que os ILTB e HC não foram monitorados clínica e imunologicamente, não temos como saber a evolução destes casos. Estudos prospectivos são necessários para monitorar a modulação da resposta imune e clínica, visando melhor conhecimento do significado destes biomarcadores no espectro da TB.

A Tabela 12 analisou se as reatividades obtidas nos ensaios imunoenzimáticos são suficientes para alcançar o TPP ideal para testes de triagem em suspeitos de TB e notou-se que, apesar das sensibilidades se mostrarem de baixas a moderadas (11,4 – 42,3%), a especificidade mínima foi alcançada, ( $\geq 70\%$ ) e houve maiores tendências de modulação da resposta imune de IgG1 e IgG3 - Rv 3353 para o grupo TB. A AUROC mais elevada foi observada para a associação TB vs ILTB [0,662 (0,51-0,82)], tendo fornecido maiores positivities. Porém, tendo em vista que os grupos ILTB e HC foram ambos expostos a TB, optou-se por usar o *cut off* definido para TB vs ILTB/HC, para avaliar se a combinação dos resultados dos diferentes biomarcadores testados poderia aumentar a sensibilidade do teste. Assim, em análise global, a combinação dos resultados de IgG1/IgG3-Rv3353 aumentou a sensibilidade do teste para 55% e identificou 33,3% a 60% de amostras TB, quando associados com um ou mais testes diagnósticos negativos, utilizados na rotina. Portanto, a combinação destes biomarcadores tem potencial para agregar

positividade aos testes negativos na rotina. Considerando que a sorologia pode ser facilmente formatada para ferramenta diagnóstica simples, de uso no local de atendimento (POC), poderia ser útil na triagem inicial, juntamente com a PT, por exemplo. Poderíamos colocar uma objeção nesta sugestão, pelo fato de os testes agregarem positividade aos TB com resultado negativo para os testes PT e BAAR, porém com positividade também nos grupos não TB. Para tal objeção, faríamos a seguinte análise: as crianças com sorologia positiva e/ou score clínico de pontuação seriam encaminhados para tratamento de acordo com a decisão médica. Os outros casos soropositivos seriam monitorados e tratados, à medida que os resultados dos testes BAAR e/ou cultura e/ou TRM se positivassem também. Os casos restantes de sorologias positivas, porém sem confirmação por outros testes e sem clínica sugestiva, seriam monitorados sorologicamente, visando avaliar modulação da resposta imune e evolução clínica. Sem dúvidas, antes da aplicação prática destes biomarcadores, um estudo prospectivo deverá ser realizado para conhecer como eles são modulados ao longo do tratamento dos TB, entre os ILTB (na progressão ou não para TB) e nos HC.

Portanto, o nosso estudo possui limitações, como o tamanho amostral e a inexistência de amostras coletadas prospectivamente, fatos cruciais para impactar negativamente no potencial desses marcadores em auxiliar o controle da TB na criança. A sorologia, com certeza, tem sido muito explorada no diagnóstico da TB, entretanto, os sucessos são muito limitados e isto se deve, provavelmente, à falha em utilizar biomarcadores mais apropriados; para tal, uma maior variedade de antígenos deve ser explorada. O nosso estudo com crianças limitou-se a dois antígenos, que ainda não tinham sido ensaiados neste grupo populacional, contribuindo para um melhor conhecimento da resposta imune por subclasses de IgG a estes marcadores. Entretanto, novos antígenos de latência foram descritos e investigações adicionais são necessárias para selecionar outros marcadores com reatividade diferencial para as subclasses de IgG na TB/ILTB, na faixa etária pediátrica.

Embora os subtipos de IgG para os Ag estudados, não tenham atendido aos critérios de OMS para TPP, ainda que imperfeitamente, foram capazes de demonstrar perfis específicos de imunorreatividade entre os grupos TB, ILTB e HC e agregar positividade entre os testes de rotina que resultaram negativos. Assim, as

subclasses de IgG também podem ser consideradas na avaliação da acurácia de novos testes sorodiagnostics adjuvantes para investigação diagnóstica de infecção por *Mtb*.

## 6 LIMITAÇÕES

O estudo tem várias limitações, as quais abordaremos a seguir.

O reduzido tamanho de amostra pode explicar a falta de resultados estatisticamente significativos para a comparação de IgG1- e IgG3-Rv3353, e IgG4-Rv2034, entre os grupos HC, ILTB e TB.

O número reduzido de soros também limita a avaliação do potencial da sorologia em crianças estratificadas em idades mais jovens, tais como: menos de 1 ano, de 1 a 2 anos, de 2 a 5 anos, de 5 a 10 anos, e >10 anos. Tal análise de subgrupo deve ser privilegiada, uma vez que a resposta imune humoral não amadurece para níveis adultos até cerca de 5-6 anos de idade. Bebês com menos de 2 anos de idade têm respostas de IgG consideravelmente mais baixas para antígenos polissacarídeos, por exemplo, do que crianças com mais de 2 anos de idade. Por outro lado, durante o primeiro ano de vida, é provável que a IgG sérica reflita os Ac maternos transferidos *in utero*.

O número limitado de crianças imunossuprimidas limita a avaliação sorológica nesse grupo. Deve considerar também que a apresentação clínica da TB varia de acordo com a idade, com maiores taxas de disseminação na primeira infância e uma apresentação mais adulta em adolescentes.

Outra limitação importante é o deficiente histórico clínico-epidemiológico dos grupos aqui estudados, limitando a análise dos dados sorológicos. Entretanto, os resultados são representativos da população estudada, com a vantagem de apresentar os resultados da distribuição das DOs de Ac presente em cada um dos pacientes, portanto mostrando que a resposta de Ac não obedece a uma distribuição normal; tal observação fica limitada, quando os resultados somente são apresentados por média e DP dos grupos.

## **7 PERSPECTIVAS**

É de fundamental importância um estudo prospectivo, utilizando estes biomarcadores, bem como outros antígenos de latência.

Também se faz necessário utilizar número de amostras de pacientes e controles equitativamente estratificados por limites de idade mais restritos.

## 8 CONCLUSÕES

- ✓ Amostras TB apresentaram níveis mais elevados de anticorpos específicos IgG1-Rv3353 e IgG3-IgG3-Rv3353, em comparação com controles saudáveis, porém sem diferença significativa para ILTB.
- ✓ As análises de curva ROC mostraram sensibilidades entre 11,4 e 43,2%, fixando a especificidades >70%, o que os torna imperfeitos com base no perfil de produto-alvo, recomendado pela OMS para testes de triagem ( $S \geq 90\%$  e  $Sp \geq 70\%$ ).
- ✓ Entretanto, estes biomarcadores, ao detectarem os ILTB em frequência menor, comparado ao resultado da PT, precisam ser avaliados em estudo prospectivo, para elucidar se estariam em maior risco de progressão para TB ativa ou os níveis de Ac diminuiriam, sugerindo erradicação dos bacilos.
- ✓ A IgG3-Rv3353 detectou mais de 50% dos pacientes < cinco anos, enquanto a IgG1 foi mais reativa no grupo entre 5 e 10 anos (62,5 %),
- ✓ Os testes são limitadamente robustos, mas adicionaram positividade para triagem de suspeitos de TB, quando combinados a outros testes rápidos de rotina.
- ✓ Isto se reveste de importância, já que o ELISA pode ser facilmente formatado para POC e, portanto, com potencial para ferramenta rápida e de fácil execução no manejo da triagem dos suspeitos de TB, na prática clínica.
- ✓ Com certeza, este estudo contribui para lançar luz sobre um ponto ainda pouco claro no diferencial da resposta imune da TB na criança, uma vez que, pela primeira vez, subclasses de IgG foram avaliadas quanto à reatividade para dois antígenos micobacterianos, relacionados ou não a latência em TB.
- ✓ Conclui-se que, apesar das limitações deste estudo, os resultados apresentam imunorreatividades distintas em diferentes fases da TB, para a faixa pediátrica, sugerindo que a detecção de subclasses de anticorpos específicos pode representar uma ferramenta útil no diagnóstico da TB ativa.
- ✓ Devido aos desafios no diagnóstico da TB pediátrica, a sorologia continua sendo uma abordagem diagnóstica atraente. Estudos futuros com diferentes antígenos micobacterianos, que possam agregar positividade aos aqui

estudados, e avaliados prospectivamente, contribuiria para melhor conhecimento da resposta imune na TB da criança.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control Report. Geneva, WHO, 2019.
- 2 World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control Report. Geneva, WHO, 2020.
- 3 Brasil. 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
- 4 World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control Report. Geneva, WHO, 2022.
- 5 World Health Organization (WHO). Geneva: World Health Organization; The End TB Strategy. [Adobe Acrobat document, 20p.], 2015. [cited 2020 5 nov] Available from: [http://www.who.int/tb/End\\_TB\\_brochure.pdf?ua=1](http://www.who.int/tb/End_TB_brochure.pdf?ua=1)
- 6 Carvalho ACC, Cardoso CAA, Martire TM, Migliori GB, Sant'Anna. Aspectos epidemiológicos, manifestações clínicas e prevenção da tuberculose pediátrica sob perspectiva da Estratégia End TB. J Bras Pneumol. 2018;44(2):134-144.
- 7 Gonçalves, H. A tuberculose ao longo dos tempos. Hist cienc saude - Manguinhos, 2000; vol. 7(2): 303-25, jul.-out.
- 8 Paneque EP, Rojas LYR, Loyola MP. La Tuberculosis a través de la Historia: un enemigo de la humanidad. Rev. Haban. Cienc. Méd. 2018, Ju17(3): 353-

363. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2018000300353&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2018000300353&lng=es).

9 Silva, RJ. Avaliação de biomarcadores da resposta imune celular e humoral na tuberculose pleural. 2019. 204 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) -Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

10 World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control Report. Geneva, WHO, 2021.

11 Drain PK, Bajema KL, Dowdy D, Dheda K, Naidoo K, Schumacher SG, *et al*. Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31(4): e00021-18. Published 2018 Jul 18. doi:10.1128/CMR.00021-18. PMID: 30021818; PMCID: PMC6148193.

12 Khatami A, Britton PN, Marais BJ. Management of Children with Tuberculosis. *Clin Chest Med*. 2019 Dec;40(4):797-810. doi: 10.1016/j.ccm.2019.08.003. PMID: 31731985.

13 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Tuberculose/2020. Edição Especial, 2020.

14 Silva DR, Rabahi MF, Sant'Anna CC, Silva-Junior JLR, Capone D, Bombarda S, *et al*. Diagnosis of tuberculosis: a consensus statement from the Brazilian Thoracic Association. *J Bras Pneumol*. 2021;47(2): e20210054

15 Graham SM, Sismanidis C, Menzies HJ, Marais BJ, Detjen AK, Black RE. Importance of tuberculosis control to address child survival. *Lancet*. 2014;383(9928):1605-1607. doi:10.1016/S0140-6736(14)60420-7

16 Mandal N, Anand PK, Gautam S, Das S, Hussain T. Diagnosis and treatment of paediatric tuberculosis: An insight review. *Crit Rev Microbiol*. 2017

Aug;43(4):466-480. doi: 10.1080/1040841X.2016.1262813. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28502224.

17 Sandgren A, Cuevas LE, Dara M, *et al.* Childhood tuberculosis: progress requires an advocacy strategy now. *Eur Respir J.* 2012;40(2):294-297. doi:10.1183/09031936.00187711

18 World Health Organization (WHO). No more crying, no more dying: towards zero TB deaths in children. Geneva, World Health Organization, 2012. (Available from [http://www.stoptb.org/assets/documents/resources/publications/acsm/ChildhoodTB\\_report\\_singles.pdf](http://www.stoptb.org/assets/documents/resources/publications/acsm/ChildhoodTB_report_singles.pdf)).

19 World Health Organization (WHO). Roadmap for Childhood Tuberculosis: Towards Zero Deaths. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services, 2013.

20 Goletti D, Petruccioli E, Joosten SA, Ottenhoff TH. Tuberculosis Biomarkers: From Diagnosis to Protection. *Infect Dis Rep.* 2016;8(2):6568. Published 2016 Jun 24. doi:10.4081/idr.2016.6568.

21 Souza WM, Hermes DM. Biomarcadores da tuberculose: uma revisão da literatura. *R. Eletr. Cient. da Uergs [Internet].* 16º de abril de 2019 [citado 6º de setembro de 2020];5(1):28-7. Disponível em: <http://revista.uergs.edu.br/index.php/revuergs/article/view/1706>

22 Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:89- 95.

23 Schmidt CM. Biomarcadores séricos: ferramenta para o diagnóstico diferencial entre tuberculose latente e tuberculose pulmonar em crianças e adolescentes; 2019; Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade Federal Fluminense.

24 Nonyane BAS, Nicol MP, Andreas NJ, Rimmele S, Schneiderhan-Marra N, Workman LJ, Perkins MD, Joos T, Broger T, Ellner JJ, Alland D, Kampmann B, Dorman SE, Zar HJ. Serologic Responses in Childhood Pulmonary Tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2018 Jan;37(1):1-9. doi: 10.1097/INF.0000000000001683. PMID: 28719497; PMCID: PMC6261442.

25 Togun TO, MacLean E, Kampmann B, Pai M. Biomarkers for diagnosis of childhood tuberculosis: A systematic review. *PLoS One.* 2018 Sep 13;13(9):e0204029. doi: 10.1371/journal.pone.0204029. PMID: 30212540; PMCID: PMC6136789

26 Schmidt CM, Queiroz A, Cardoso CAA. Utilização de biomarcadores na tuberculose pediátrica. *Resid Pediatr.* 2017;7(0 Supl.1):32-37 DOI: 10.25060/residpediatr-2017.v7s1-08

27 Ávalos GGL, de Oca EPM. Classic and new diagnostic approaches to childhood tuberculosis. *J Trop Med.* 2012 (2012):818219. doi:10.1155/2012/818219

28 Sant'Anna CC, Fonseca, LS, Saad MHF. Relação entre o diagnóstico sorológico (ELISA) e a gravidade da tuberculose pulmonar na infância. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 34(6): 531-535.

29 WHO (WHO). Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis. Policy Statement. Geneva: World Health Organization; 2011

30 Chatterjee K, Mandal PK, Sen S. Status of enzyme-linked immunosorbent assay test for tuberculosis serology in low socioeconomic status and

undernourished children with suspected pulmonary tuberculosis *Int J Contemp Pediatr.* 2016 Nov;3(4):1348-1354.

31 Jacobs AJ, Mongkolsapaya J, Screatton GR, McShane H, Wilkinson RJ. Antibodies and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2016 Dec; 101:102-113. doi: 10.1016/j.tube.2016.08.001. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27865379; PMCID: PMC5120988.

32 Achkar JM, Ziegenbalg A. Antibody responses to mycobacterial antigens in children with tuberculosis: challenges and potential diagnostic value. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Dec;19(12):1898-906. doi: 10.1128/CVI.00501-12. Epub 2012 Oct 24. PMID: 23100476; PMCID: PMC3535867.

33 Graham SM, Cuevas LE, Jean-Philippe P, Browning R, Casenghi M, Detjen AK, *et al.* Clinical Case Definitions for Classification of Intrathoracic Tuberculosis in Children: An Update. *Clin Infect Dis.* 2015 Oct 15;61Suppl 3(Suppl 3): S179-87. doi: 10.1093/cid/civ581. PMID: 26409281; PMCID: PMC4583568.

34 Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862-1870. doi:10.1016/j.rmed.2006.08.006.

35 Massabni AC, Bonini EH. Tuberculose: história e evolução dos tratamentos da doença. *RBM [Internet].* 1º de maio de 2019 [citado 5º de julho de 2022];22(2):6-34. Disponível em: <https://www.revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/678>.

36 Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017 Mar;58(1):E9-E12. PMID: 28515626; PMCID: PMC5432783.

37 Carvalho I, Goletti D, Manga S, Silva DR, Manissero D, Migliori G. Managing latent tuberculosis infection and tuberculosis in children. *Pulmonology*. 2018; 24(2):106-114. doi:10.1016/j.rppnen.2017.10.007.

38 Cano APG, Romaneli MTN, Pereira RM, Tresoldi AT. Tuberculose em pacientes pediátricos: como tem sido feito o diagnóstico? *Rev. Paul. Pediatr*. 2017; 35 (20): 165-70.

39 Dodd PJ, Yuen CM, Sismanidis C, Seddon JA, Jenkins HE. The global burden of tuberculosis mortality in children: a mathematical modelling study. *Lancet Glob Health*. 2017;5(9):e898-e906.

40 Holmberg PJ, Temesgen Z, Banerjee R. Tuberculosis in Children. *Pediatr Rev*. 2019 Apr;40(4):168-178. doi: 10.1542/pir.2018-0093. Erratum in: *Pediatr Rev*. 2019 Jun;40(6):318. PMID: 30936398.

41 Lamb GS, Starke JR. Tuberculosis in Infants and Children. *Microbiol Spectr*. 2017 Apr;5(2). doi: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0037-2016. PMID: 28387193.

42 Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2:16076. Published 2016 Oct 27. doi:10.1038/nrdp.2016.76.

43 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Tuberculose/2022. Edição Especial, 2022.

44 Tahan TT, Gabardo BM, Rossoni, AM. Tuberculosis in childhood and adolescence: a view from diferente perspectives. *J Pediatr (Rio J)*. 2020; 96(S1):99-110.

45 Brasil. Ministério da Saúde. Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública: estratégias para 2021-2025 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

46 North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:599-623. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104635. PMID: 15032590.

47 Wildner, LM; Nogueira, CL; Souza, BS; Senna, SG; Silva, RM; Bazzo, ML. (2011). Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. *Revista de Patologia Tropical.* 40(3):207-230, jul.-set. 2011. Tab

48 Coura, JR. Fundamentos das doenças infecciosas e parasitárias / José Rodrigues Coura, Nelson Gonçalves Pereira. – 1. ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. p. 658-702.

49 Silva, MEN, Lima DS, Santos JE, Monteiro, ACF, Torquato CMM; Freire VA, Ribeiro DBC, Feitosa ACS, Teixeira AB. Aspectos gerais da tuberculose: uma atualização sobre o agente etiológico e o tratamento. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 2018; 50(3): 228-232.

50 Riojas MA, McGough KJ, Rider-Riojas CJ, Rastogi N, Hazbón MH. Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018 Jan;68(1):324-332. doi: 10.1099/ijsem.0.002507. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29205127.

51 Delogu G, Sali M, Fadda G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 2013, 5(1), e2013070. doi:10.4084/MJHID.2013.070

52 Cailleaux-Cezar M. Diagnóstico e tratamento da tuberculose latente. *Pulmão RJ*. 2012; 21:41-45.

53 Alves R, Saar SMA, Sant'Anna CC. Principais dúvidas dos pediatras sobre tuberculose em crianças e adolescentes. *Resid Pediatr*. 2018;8(1):27-37 DOI: 10.25060/residpediatr-2018.v8n1-04

54 Reuter A, Seddon JA, Marais BJ, Furin J. Preventing tuberculosis in children: A global health emergency. *Paediatr Respir Rev*. 2020 Nov; 36:44-51. doi: 10.1016/j.prrv.2020.02.004. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32253128.

55 Zombini EV, Almeida CHD, Silva FPCVS, Yamada ES, Komatsu NK, Figueiredo SM. et al. Perfil clínico-epidemiológico da tuberculose na infância e adolescência. *J. Hum. Growth Dev*. 2013; 23(1):52-7.

56 Perez-Velez CM, Roya-Pabon CL, Marais BJ. A systematic approach to diagnosing intra-thoracic tuberculosis in children. *J Infect*. 2017 Jun;74 Suppl 1:S74-S83. doi: 10.1016/S0163-4453(17)30195-0. PMID: 28646966.

57 Alves ACFPB, Prado AIF, Takenami I. Imunologia da tuberculose: uma revisão narrativa da literatura. *Arq Asma Alerg Imunol*. 2022;6(2):239-50

58 Moutinho, ILD. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença / Tuberculosis: immunological aspects in the infection and in the disease. *Ver. Méd. Minas Gerais*, 2011, jan-mar, 21(1): 42-48.

59 Marais BJ, Schaaf HS. Tuberculosis in children. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(9): a017855. Published 2014 Jul 18. doi:10.1101/cshperspect.a017855

60 Delgado BJ, Bajaj T. Ghon Complex. [Updated 2021 Sep 20]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551706/>

61 Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Hesselning AC, Obihara CC, Starke JJ. Et al. The natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int J Tuberculosis Lung Dis.* 2004; 8:392-402. PMID: 15141729.

62 Cardona PJ. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* 2018 Jan;36(1):38-46. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2017.10.015. Epub 2017 Dec 2. PMID: 29198784.

63 Scriba TJ, Coussens AK, Fletcher HA. Human Immunology of Tuberculosis. *Microbiol Spectr.* 2017 Jan;5(1). doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0016-2016. PMID: 28155806.

64 Sia JK, Rengarajan J. Immunology of Mycobacterium Tuberculosis Infections. *Microbiol Spectr.* 2019;7(4):10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018

65 Howard-Jones AR, Marais BJ. Tuberculosis in children: screening, diagnosis and management. *Curr Opin Pediatr.* 2020 Jun;32(3):395-404. doi: 10.1097/MOP.0000000000000897. PMID: 32374579.

66 Sant'anna CC, Schmidt CM, March MFP, Pereira SM, Barreto ML, Radiologic findings of pulmonary tuberculosis in adolescents. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15(1):40- 4. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702011000100008>.

67 Procópio, MJ. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 7ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, EAD/ENSP, 2014. 344 p. ISBN: 978-85-61445-92-8.

68 Kumar P. A Perspective on the Success and Failure of BCG. *Front Immunol.* 2021 Dec 14; 12:778028. doi: 10.3389/fimmu.2021.778028. Erratum in: *Front Immunol.* 2022 Feb 09; 13:850325. PMID: 34970263; PMCID: PMC8712472. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8712472/>

69 Simmons JD, Stein CM, Seshadri C, Campo M, Alter G, Fortune S, Schurr E, Wallis RS, Churchyard G, Mayanja-Kizza H, Boom WH, Hawn TR. Immunological mechanisms of human resistance to persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nat Rev Immunol.* 2018 Sep;18(9):575-589. doi: 10.1038/s41577-018-0025-3. PMID: 29895826; PMCID: PMC6278832.

70 Coppola M, Villar-Hernández R, van Meijgaarden KE, Latorre I, Muriel Moreno B, Garcia-Garcia E, et al. Cell-Mediated Immune Responses to in vivo-Expressed and Stage-Specific *Mycobacterium tuberculosis* Antigens in Latent and Active Tuberculosis Across Different Age Groups. *Front Immunol.* 2020 Feb 11;11:103. doi: 10.3389/fimmu.2020.00103. PMID: 32117257; PMCID: PMC7026259.

71 Choreño-Parra JA, Weinstein LI, Yunis EJ, Zúñiga J, Hernández-Pando R. Thinking Outside the Box: Innate- and B Cell-Memory Responses as Novel Protective Mechanisms Against Tuberculosis. *Front Immunol.* 2020 Feb 14;11:226. doi: 10.3389/fimmu.2020.00226. PMID: 32117325; PMCID: PMC7034257.

72 Lins, Nidai de Barbara Moreira da Silva. Resposta Imune por subclasses de IgG à diferentes proteínas micobacterianas. 2017. 85f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

73 Chan J, Mehta S, Bharrhan S, Chen Y, Achkar JM, Casadevall A, Flynn J. The role of B cells and humoral immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Semin Immunol.* 2014 Dec;26(6):588-600. doi: 10.1016/j.smim.2014.10.005. Epub 2014 Oct 28. PMID: 25458990; PMCID: PMC4314354.

74 du Plessis WJ, Walzl G, Loxton AG. B cells as multi-functional players during Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *Tuberculosis (Edinb).* 2016 Mar;97:118-25. doi: 10.1016/j.tube.2015.10.007. Epub 2015 Nov 3. PMID: 26611659.

75 Rijnink WF, Ottenhoff THM, Joosten SA. B-Cells and Antibodies as Contributors to Effector Immune Responses in Tuberculosis. *Front Immunol.* 2021 Feb 18;12:640168. doi: 10.3389/fimmu.2021.640168. PMID: 33679802; PMCID: PMC7930078.

76 Carpenter SM, Lu LL. Leveraging Antibody, B Cell and Fc Receptor Interactions to Understand Heterogeneous Immune Responses in Tuberculosis. *Front Immunol.* 2022 Mar 17;13:830482. doi: 10.3389/fimmu.2022.830482. PMID: 35371092; PMCID: PMC8968866.

77 Loxton AG. Bcells and their regulatory functions during Tuberculosis: Latency and active disease. *Mol Immunol.* 2019 Jul;111:145-151. doi: 10.1016/j.molimm.2019.04.012. Epub 2019 May 1. PMID: 31054408.

78 Achkar JM, Chan J, Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunol Rev.* 2015 Mar;264(1):167-81. doi: 10.1111/imr.12276. PMID: 25703559; PMCID: PMC4629253.

79 Li H, Javid B. Antibodies and tuberculosis: finally coming of age? *Nat Rev Immunol*. 2018 Sep;18(9):591-596. doi: 10.1038/s41577-018-0028-0. PMID: 29872140.

80 Dewi DNSS, Mertaniasih NM, Soedarsono OU, Artama WT, Fihiruddin NM, Tateishi Y, et al. Characteristic profile of antibody responses to PPD, ESAT-6, and CFP-10 of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis suspected cases in Surabaya, Indonesia. *Braz J Infect Dis*. 2019 Jul-Aug;23(4):246-253. doi: 10.1016/j.bjid.2019.07.001. Epub 2019 Aug 14. PMID: 31421107.

81 Araujo LS, da Silva NBM, Leung JAM, Mello FCQ, Saad MHF. IgG subclasses' response to a set of mycobacterial antigens in different stages of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2018 Jan; 108:70-76. doi: 10.1016/j.tube.2017.10.010. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29523330.

82 Davidow A, Kanaujia GV, Shi L, et al. Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state. *Infect Immun*. 2005;73(10):6846-6851. doi:10.1128/IAI.73.10.6846-6851.2005.

83 Soe PT, Hanthamrongwit J, Saelee C, Kyaw SP, Khaenam P, Warit S, Satproedprai N, Mahasirimongkol S, Yanai H, Chootong P, Leepiyasakulchai C. Circulating IgA/IgG memory B cells against *Mycobacterium tuberculosis* dormancy-associated antigens Rv2659c and Rv3128c in active and latent tuberculosis. *Int J Infect Dis*. 2021 Sep;110:75-82. doi: 10.1016/j.ijid.2021.07.033. Epub 2021 Jul 18. PMID: 34284090.

84 Marais BJ, Obihara CC, Gie RP, et al. The prevalence of symptoms associated with pulmonary tuberculosis in randomly selected children from a high burden community. *Arch Dis Child*. 2005;90(11):1166-1170. doi:10.1136/adc.2004.060640

85 Suárez I, Fünfer SM, Kröger S, Rademacher J, Fätkenheuer G, Rybniker J. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2019;116(43):729-735.

86 Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, Metcalfe JZ, Cattamanchi A, Dowdy DW, Dheda K, Banaei N. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jan;27(1):3-20. doi: 10.1128/CMR.00034-13. PMID: 24396134; PMCID: PMC3910908.

87 Starke JR; Committee on Infectious Diseases. Interferon- $\gamma$  release assays for diagnosis of tuberculosis infection and disease in children. *Pediatrics*. 2014 Dec;134(6):e1763-73. doi: 10.1542/peds.2014-2983. PMID: 25422024.

88 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis Coordenação Geral de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória de Condições Crônicas. Nota Informativa N° 5/2021-CGDR/.DCCI/SVS/MS. \_\_\_\_, Brasília, 6 de julho de 2021.

89 Fox GJ, Dobler CC, Marais BJ, Denholm JT. Preventive therapy for latent tuberculosis infection-the promise and the challenges. *Int J Infect Dis*. 2017 Mar; 56:68-76. doi: 10.1016/j.ijid.2016.11.006. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27872018.

90 Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Codecasa L, Cugnata F, *et al*. First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur Respir J*. 2016 May;47(5):1587-90. doi: 10.1183/13993003.02033-2015. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26869677.

91 Sudbury EL, Clifford V, Messina NL, Song R, Curtis N. Mycobacterium tuberculosis-specific cytokine biomarkers to differentiate active TB and LTBI: A systematic review. *J Infect.* 2020 Dec;81(6):873-881. doi: 10.1016/j.jinf.2020.09.032. Epub 2020 Sep 29. PMID: 33007340.

92 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis Coordenação Geral de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória de Condições Crônicas. Nota Informativa N° 2/2022-CGLAB/DAEVS/SVS/MS. \_\_\_\_, Brasília, 9 de fevereiro de 2022.

93 Meier NR, Jacobsen M, Ottenhoff THM, Ritz N. A Systematic Review on Novel Mycobacterium tuberculosis Antigens and Their Discriminatory Potential for the Diagnosis of Latent and Active Tuberculosis. *Front Immunol.* 2018; 9:2476. Published 2018 Nov 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02476

94 Lalvani A, Berrocal-Almanza LC, Halliday A. Predicting progression to active tuberculosis: A rate-limiting step on the path to elimination. *PLoS Med.* 2019 May 24;16(5):e1002814. doi: 10.1371/journal.pmed.1002814. PMID: 31125334; PMCID: PMC6534286.

95 Concepcion NDP, Laya BF, Andronikou S, et al. Standardized radiographic interpretation of thoracic tuberculosis in children. *Pediatr Radiol.* 2017;47(10):1237-1248. doi:10.1007/s00247-017-3868-z

96 Pai M, Nicol MP, Boehme CC. Tuberculosis Diagnostics: State of the Art and Future Directions. *Microbiol Spectr.* 2016 Oct;4(5). doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0019-2016. PMID: 27763258.

97 World Health Organization (WHO). Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and

rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. Geneva: WHO; 2013. 79 p

98 Nicol MP, Workman L, Prins M, Bateman L, Ghebrekristos Y, Mbhele S, et al. Accuracy of xpert MTB/RIF ultra for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J.* (2018) 37: e261–3. doi: 10.1097/INF.0000000000001960.

99 Sabi I, Rachow A, Mapamba D, Clowes P, Ntinginya NE, Sasamalo M, et al. Xpert MTB/RIF Ultra assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: a multicentre comparative accuracy study. *J Infect.* (2018) 77:321–7. doi: 10.1016/j.jinf.2018.07.002.

100 Satta G, Lipman M, Smith GP, Arnold C, Kon OM, McHugh TD. *Mycobacterium tuberculosis* and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential? *Clin Microbiol Infect.* 2018, Jun;24(6):604-609. doi: 10.1016/j.cmi.2017.10.030. Epub 2017 Nov 3. PMID: 29108952.

101 Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis (Edinb).* 2008 Nov;88(6):510-7. doi: 10.1016/j.tube.2008.05.002. Epub 2008 Jul 21. PMID: 18640874.

102 Sun J, Champion PA, Bigi F. Cellular and molecular mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* Virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2019 Oct 9; 9:331.

103 Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, et al. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology.* 2004 Jan;51(2):359-370. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03844.x. PMID: 14756778; PMCID: PMC1458497.

104 Hemmati M, Seghatoleslam A, Rasti M, et al. Expression and Purification of Recombinant Mycobacterium Tuberculosis (TB) Antigens, ESAT-6, CFP-10 and ESAT- 6/CFP-10 and Their Diagnosis Potential for Detection of TB Patients. Iran Red Crescent Med J. 2011;13(8):556-563.

105 Legesse M, Ameni G, Medhin G, Mamo G, Franken KL, Ottenhoff TH, Bjune G, Abebe F. IgA response to ESAT-6/CFP-10 and Rv2031 antigens varies in patients with culture-confirmed pulmonary tuberculosis, healthy Mycobacterium tuberculosis-infected and non-infected individuals in a tuberculosis endemic setting, Ethiopia. Scand J Immunol. 2013 Sep;78(3):266-74. doi: 10.1111/sji.12080. PMID: 23713613.

106 Guo S, Xue R, Li Y, Wang SM, Ren L, Xu JJ. The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection. Med Hypotheses. 2012 Mar;78(3):389-92. doi: 10.1016/j.mehy.2011.11.022. Epub 2011 Dec 21. PMID: 22192908.

107 Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology (Reading). 1998 Nov;144 (Pt 11):3195-3203. doi: 10.1099/00221287-144-11-3195. PMID: 9846755.

108 Mushtaq K, Sheikh JA, Amir M, Khan N, Singh B, Agrewala JN. Rv2031c of Mycobacterium tuberculosis: a master regulator of Rv2028-Rv2031 (HspX) operon. Front Microbiol. 2015 Apr 27; 6:351. doi: 10.3389/fmicb.2015.00351. PMID: 25964780; PMCID: PMC4410610.

109 Roupie V, Romano M, Zhang L, Korf H, Lin MY, Franken KL, et al. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of Mycobacterium

tuberculosis in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect Immun.* 2007;75(2):941-949. doi:10.1128/IAI.01137-06.

110 Taylor JL, Wieczorek A, Keyser AR, Grover A, Flinkstrom R, Karls RK, Bielefeldt-Ohmann H, Dobos KM, Izzo AA. HspX-mediated protection against tuberculosis depends on its chaperoning of a mycobacterial molecule. *Immunol Cell Biol.* 2012 Nov;90(10):945-54. doi: 10.1038/icb.2012.34. Epub 2012 Jul 17. PMID: 22801575; PMCID: PMC3511932.

111 Abebe F, Belay M, Legesse M, Mihret A, Franken KS. Association of ESAT-6/CFP-10-induced IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 with clinical tuberculosis: evidence from cohorts of pulmonary tuberculosis patients, household contacts and community controls in an endemic setting. *Clin Exp Immunol.* 2017 Aug;189(2):241-249. doi: 10.1111/cei.12972. Epub 2017 May 2. PMID: 28374535; PMCID: PMC5508323.

112 Peirs P, Lefèvre P, Boarbi S, et al. Mycobacterium tuberculosis with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced in vivo virulence. *Infect Immun.* 2005;73(3):1898-1902. doi:10.1128/IAI.73.3.1898-1902.2005.

113 Esparza M, Palomares B, García T, Espinosa P, Zenteno E, Mancilla R. PstS-1, the 38-kDa Mycobacterium tuberculosis glycoprotein, is an adhesin, which binds the macrophage mannose receptor and promotes phagocytosis. *Scandinavian journal of immunology*, 2015; 81(1), 46–55. <https://doi.org/10.1111/sji.12249>.

114 Tavares RC, Salgado J, Moreira VB, Ferreira MA, Mello FC, Leung JW, Fonseca Lde S, Spallek R, Singh M, Saad MH. Interferon gamma response to combinations 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/MPT-64 and ESAT-6/CFP-10, each related to a single recombinant protein of Mycobacterium tuberculosis in individuals from tuberculosis endemic areas. *Microbiol Immunol.* 2007;51(3):289-96. doi: 10.1111/j.1348-0421.2007.tb03910.x. PMID: 17380048.

115 Abebe, F, Belay, M, Legesse, M, Franken, KLMC, Ottenhoff, T. IgA and IgG against Mycobacterium tuberculosis Rv2031 discriminate between pulmonary tuberculosis patients, Mycobacterium tuberculosis-infected and non-infected individuals. PLoS one, 2018 13(1), e0190989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190989>.

116 Araujo LS, Lins NBMS, Leung JA, Mello FC, Saad MH. Close contact interferon-gamma response to the new PstS1(285-374):CPF10: a preliminary 1-year follow-up study. BMC Res Notes. 2017 Jan 23;10(1):59. doi: 10.1186/s13104-016-2360-4. PMID: 28114976; PMCID: PMC5259914

117 Goletti D, Butera O, Vanini V, Lauria FN, Lange C, Franken KL, et al. Response to Rv2628 latency antigen associates with cured tuberculosis and remote infection. European Respiratory Journal 2010; 36: 135-142; DOI: 10.1183/09031936.00140009.

118 Coppola M, Ottenhoff TH. Genome wide approaches discover novel Mycobacterium tuberculosis antigens as correlates of infection, disease, immunity and targets for vaccination. Semin Immunol. 2018 Oct; 39:88-101. doi: 10.1016/j.smim.2018.07.001. Epub 2018 Jul 7. PMID: 30327124.

119 Roberts DM, Liao RP, Wisedchaisri G, Hol WG, Sherman DR. Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. J Biol Chem. 2004, May 28;279(22):23082-7. doi: 10.1074/jbc.M401230200. Epub 2004 Mar 19. PMID: 15033981; PMCID: PMC1458500.

120 Taneja NK, Dhingra S, Mittal A, Naresh M, Tyagi JS. Mycobacterium tuberculosis transcriptional adaptation, growth arrest and dormancy phenotype development is triggered by vitamin C. PLoS One. 2010;5(5): e10860. Published 2010 May 27. doi:10.1371/journal.pone.0010860.

121 Minch K, Rustad T, Sherman DR. *Mycobacterium tuberculosis* growth following aerobic expression of the DosR regulon. *PLoS One*. 2012;7(4): e35935. doi:10.1371/journal.pone.0035935.

122 Bai XJ, Liang Y, Yang YR, Feng JD, Luo ZP, Zhang JX, Wu XQ. Potential novel markers to discriminate between active and latent tuberculosis infection in Chinese individuals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2016 Feb; 44:8-13. doi: 10.1016/j.cimid.2015.11.002. Epub 2015 Nov 12. PMID: 26851588.

123 Mattos AM, Chaves AS, Franken KL, Figueiredo BB, Ferreira AP, Ottenhoff TH, Teixeira HC. Detection of IgG1 antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* DosR and Rpf antigens in tuberculosis patients before and after chemotherapy. *Tuberculosis (Edinb)*; 2016, Jan;96:65-70. doi: 10.1016/j.tube.2015.11.001. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26786656.

124 Carranza C, Pedraza-Sanchez S, de Oyarzabal-Mendez E, Torres M. Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives. *Front Immunol*. 2020 Sep 10; 11:2006. doi: 10.3389/fimmu.2020.02006. PMID: 33013856; PMCID: PMC7511583.

125 Su H, Zhu S, Zhu L, Kong C, Huang Q, Zhang Z, Wang H, Xu Y. *Mycobacterium tuberculosis* Latent Antigen Rv2029c from the Multistage DNA Vaccine A39 Drives TH1 Responses via TLR-mediated Macrophage Activation. *Front Microbiol*. 2017 Nov 17; 8:2266. doi: 10.3389/fmicb.2017.02266. PMID: 29204139; PMCID: PMC5698697.

126 Leyten EM, Lin MY, Franken KL, Friggen AH, Prins C, van Meijgaarden KE, *et al*. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2006 Jul;8(8):2052-60. doi: 10.1016/j.micinf.2006.03.018. Epub 2006 Jun 13. PMID: 16931093.

127 Gao CH, Yang M, He ZG. Characterization of a novel ArsR-like regulator encoded by Rv2034 in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2012;7(4): e36255. doi: 10.1371/journal.pone.0036255. Epub 2012 Apr 27. PMID: 22558408; PMCID: PMC3338718.

128 Cortes T, Schubert OT, Rose G, Arnvig KB, Comas I, Aebbersold R, DB. Y. Genome-wide Mapping of Transcriptional Start Sites Defines an Extensive Leaderless Transcriptome in *Mycobacterium tuberculosis*. Cell Rep 2013; 5:1121-1131.

129 Commandeur S, van Meijgaarden KE, Prins C, Pichugin AV, Dijkman K, van den Eeden SJ et al. An unbiased genome-wide *Mycobacterium tuberculosis* gene expression approach to discover antigens targeted by human T cells expressed during pulmonary infection. J Immunol. 2013 Feb 15;190(4):1659-71. doi: 10.4049/jimmunol.1201593. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23319735.

130 Yerlikaya S, Broger T, MacLean E, Pai M, Denkinger CM. A tuberculosis biomarker database: the key to novel TB diagnostics. Int J Infect Dis. 2017 Mar; 56:253-257. doi: 10.1016/j.ijid.2017.01.025. Epub 2017 Jan 31. PMID: 28159577 Wallis RS, Doherty TM, Onyebujoh P, Vahedi M, Laang H, Olesen O et al. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. Lancet Infect Dis. 2009 Mar;9(3):162-72. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70042-8. PMID: 19246020.

131 García-Basteiro AL, DiNardo A, Saavedra B, Silva DR, Palmero D, Gegia M, et al. Point of care diagnostics for tuberculosis. Pulmonology. 2018 Mar-Apr;24(2):73-85. doi: 10.1016/j.rppnen.2017.12.002. Epub 2018 Feb 14. PMID: 29426581

132 Araujo LS, Vaas LA, Ribeiro-Alves M, Geffers R, Mello FC, de Almeida AS, et al. Transcriptomic Biomarkers for Tuberculosis: Evaluation of DOCK9, EPAA4, and NPC2 mRNA Expression in Peripheral Blood. Front Microbiol. 2016 Oct 25; 7:1586. doi: 10.3389/fmicb.2016.01586. PMID: 27826286; PMCID: PMC5078140

133 Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, Sapkota B. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Biol Rep*. 2020 May;47(5):4065-4075. doi: 10.1007/s11033-020-05413-7. Epub 2020 Apr 4. PMID: 32248381

134 Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2): S41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046. PMID: 20176268; PMCID: PMC3670108

135 Mc Lean MR, Lu LL, Kent SJ, Chung AW. An Inflammatory Story: Antibodies in Tuberculosis Comorbidities. *Front Immunol*. 2019 Dec 9; 10:2846. doi: 10.3389/fimmu.2019.02846. PMID: 31921122; PMCID: PMC6913197

136 Araujo LS, Mello FC, Silva Nde B, Leung JA, Machado SM, Sardella IG *et al*. Evaluation of gamma interferon immune response elicited by the newly constructed PstS-1(285-374):CFP10 fusion protein to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Apr;21(4):552-60. doi: 10.1128/CVI.00726-13. Epub 2014 Feb 12. Erratum in: *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Nov;21(11):1600. PMID: 24521785; PMCID: PMC3993111.

137 Schmidt CM, Lovero KL, Carvalho FR, *et al*. Serum anti-Mce1A immunoglobulin detection as a tool for differential diagnosis of tuberculosis and latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Tuberculosis (Edinb)*. 2020 Jan; 120:101893. doi: 10.1016/j.tube.2019.101893. Epub 2019 Dec 5. Erratum in: *Tuberculosis (Edinb)*. 2021 Mar; 127:101936. PMID: 32090854; PMCID: PMC7233603.

138 Mattos AM, Almeida CS, Franken KL, Alves CC, Abramo C, Souza MA, *et al*. Increased IgG1, IFN-gamma, TNF-alpha and IL-6 responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with tuberculosis are lower after chemotherapy. *Int*

Immunol. 2010 Sep; 22(9):775-82. doi: 10.1093/intimm/dxq429. Epub 2010 Jul 11. PMID: 20624776.

139 World Health Organization (WHO). High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics. Report of a consensus meeting. Geneva: World Health Organization; 2014.

140 World Health Organization (WHO). Geneva: World Health Organization; Health for the world's adolescents: a second chance in the second decade: summary. Geneva: WHO; 2014. 79 p.

141 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. 284 p.

142 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis Coordenação Geral de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória de Condições Crônicas. Ofício Circular nº 25 /CGPNCT/DEVIT/SVS/MS Brasília, 27 de junho de 2014.

143 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis Coordenação Geral de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória de Condições Crônicas. Nota Informativa Nº 08/2014 CGPNCT/DEVEP/SVS/MS Brasília, 10 de setembro de 2014.

144 Menon J, Hoepfner VH, Judd A, Power CA, Bretscher PA. A hypothesis for the existence of two types of tuberculosis, reflecting two distinct types of immune failure to control the pathogen, based upon prevalence of mycobacterium-specific IgG subclasses. Scand J Immunol. 2018 Jun;87(6): e12665. doi: 10.1111/sji.12665. Epub 2018 May 2. PMID: 29607526.

145 Sousa AO, Henry S, Marója FM, Lee FK, Brum L, Singh M, Lagrange PH, Aucouturier P. IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol*. 1998 Jan;111(1):48-55. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00452.x. PMID: 9472660; PMCID: PMC1904868.

146 Senol G, Ecevit C, Oztürk A. Humoral immune response against 38- and 16-kDa mycobacterial antigens in childhood tuberculosis. *Pediatr Pulmonol*. 2009 Sep;44(9):839-44. doi: 10.1002/ppul.20901. PMID: 19670400.

147 Wang S, Wu J, Chen J, Gao Y, Zhang S, Zhou Z, Huang H, Shao L, Jin J, Zhang Y, Zhang W. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific antibody responses for the discrimination of active and latent tuberculosis infection. *Int J Infect Dis*. 2018 May; 70:1-9. doi: 10.1016/j.ijid.2018.01.007. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29410147.

148 Broger T, Basu Roy R, Filomena A, Greef CH, Rimmele S, Havumaki J, *et al*. Diagnostic Performance of Tuberculosis-Specific IgG Antibody Profiles in Patients with Presumptive Tuberculosis from Two Continents. *Clin Infect Dis*. 2017 Apr 1;64(7):947-955. doi: 10.1093/cid/cix023. PMID: 28362937; PMCID: PMC5848306.

149 Hoff ST, Abebe M, Ravn P, Range N, Malenganisho W, Rodrigues DS, Kallas EG, Søborg C, Mark Doherty T, Andersen P, Weldingh K. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis*--specific antibody responses in populations with different levels of exposure from Tanzania, Ethiopia, Brazil, and Denmark. *Clin Infect Dis*. 2007 Sep 1;45(5):575-82. doi: 10.1086/520662. Epub 2007 Jul 16. PMID: 17682991.

## 10 APÊNDICES E/OU ANEXOS

### 10.1 ANEXO 1 – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
FLUMINENSE/ FM/ UFF/ HU



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Biomarcadores séricos: ferramenta para o diagnóstico diferencial entre tuberculose latente, tuberculose torácica e outras pneumopatias não tuberculosas em crianças e adolescentes.

**Pesquisador:** CLAUDETE APARECIDA ARAÚJO CARDOSO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 45470115.0.0000.5243

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.178.050

**Data da Relatoria:** 07/08/2015

##### Apresentação do Projeto:

A tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública, especialmente nos países emergentes e menos desenvolvidos. A prevalência da TB é maior em adultos, sendo estes os principais responsáveis pela transmissão. No entanto, as crianças, especialmente menores de cinco anos, quando acometidas, podem desenvolver formas graves, aumentando a morbimortalidade relacionada à doença. O diagnóstico de TB pulmonar é difícil em crianças, pois desenvolvem formas paucibacilíferas, ou seja, sem isolamento da bactéria, seja por baciloscopia e/ou cultura. Além disso, como as características clínicas e radiológicas são inespecíficas, a TB pulmonar pode ser confundida com outras pneumopatias nessa idade. Os adolescentes, como os adultos, mais frequentemente desenvolvem formas bacilíferas. No entanto, em alguns casos a baciloscopia e a cultura de escarro podem ser negativas, dificultando o diagnóstico. Atualmente, os métodos disponíveis para o diagnóstico de TB em crianças e adolescentes não bacilíferos, como teste tuberculínico e dosagem de interferon gama específico para antígenos do M. tuberculosis (IGRAs) apresentam limitações, sejam esses pacientes imunodeprimidos ou não. Esses testes também não diferenciam TB latente e TB doença. O presente estudo, longitudinal

**Endereço:** Rua Marquês de Paraná, 303 4º Andar  
**Bairro:** Centro **CEP:** 24.030-210  
**UF:** RJ **Município:** NITEROI  
**Telefone:** (21)2629-9189 **Fax:** (21)2629-9189 **E-mail:** etica@vm.uff.br

Continuação do Parecer: 1.178.090

produção de informações que podem vir a apoiar a clínica diagnóstica da TB em crianças e jovens.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Trata-se de análise de cumprimento de pendências.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Procedeu as adequações indicadas na lista pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

NITERÓI, 10 de Agosto de 2015

---

Assinado por:  
ROSANGELA ARRABAL THOMAZ  
(Coordenador)

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 4º Andar  
Bairro: Centro CEP: 24.030-210  
UF: RJ Município: NITERÓI  
Telefone: (21)2629-9189 Fax: (21)2629-9189 E-mail: etica@vm.uff.br