

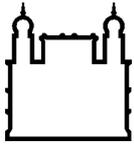
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Medicina Tropical

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DA RESPOSTA IMUNE CELULAR
E HUMORAL NA TUBERCULOSE PLEURAL

RENAN JEREMIAS DA SILVA

Rio de Janeiro
Março de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Medicina Tropical

RENAN JEREMIAS DA SILVA

Avaliação de biomarcadores da resposta imune celular e humoral na tuberculose pleural

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

Área de concentração: Diagnóstico, epidemiologia
e controle

Orientadora: Prof. Dra. Maria Helena Féres Saad
Pesquisadora Titular III
Laboratório de Microbiologia Celular
(IOC/FIOCRUZ)

RIO DE JANEIRO

Março de 2019

Silva, Renan Jeremias da.

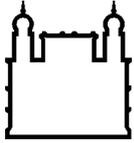
Avaliação de biomarcadores da resposta imune celular e humoral na tuberculose pleural / Renan Jeremias da Silva. - Rio de Janeiro, 2019.
xxv, 204f. f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientadora: Maria Helena Féres Saad.

Bibliografia: f. 116-156

1. *Mycobacterium tuberculosis* . 2. *tuberculose pleural*. 3. *citocinas*. 4. *ELISA*. 5. *IgA-IgG*. I. *Título*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Medicina Tropical

AUTOR: RENAN JEREMIAS DA SILVA

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL NA TUBERCULOSE PLEURAL

ORIENTADOR: Prof. Dra. Maria Helena Féres Saad

Aprovada em: 26 / 03 /2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alda Maria da Cruz - Presidente (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

Prof. Dr. Fernanda Carvalho de Queiroz Mello (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Prof. Dr. Maria da Glória Bonecini (INI/FioCruz)

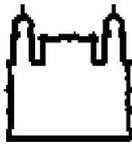
Prof. Dr. Leila de Souza Fonseca (Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ)

Prof. Dr. Isabela Gama Sardella (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ)

Prof. Dr. Luciana Silva Rodriguês (Universidade do Estado do Rio de Janeiro- UERJ)
(suplente)

Prof. Dr. Rafael Silva Duarte (Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ)
(suplente)

Rio de Janeiro, 26 de Março de 2019



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que **Renan Jeremias da Silva**, sob orientação da Dr^a. Maria Helena Feres Saad, foi aprovado em 26/03/2019, em sua defesa de tese de doutorado intitulada: **“Avaliação de biomarcadores da resposta imune celular e humoral na tuberculose extrapulmonar”**, área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Alda Maria da Cruz - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr^a. Fernanda Carvalho de Queiroz Mello - UFRJ/RJ, Dr^a. Leila de Souza Fonseca - UFRJ/RJ, Dr^a. Isabela Gama Sardella - IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Maria da Glória Bonecini de Almeida - INI/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Luciana Silva Rodrigues - UERJ/RJ e Dr. Rafael Silva Duarte - UFRJ/RJ.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria nº. 1740, de 20.12.94, do Ministro de Estado da Educação e do Desporto, e com a Portaria nº. 840, de 22.12.94, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 6 (seis) na última avaliação trienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, **a liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa espiral (1 cópia), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação/tese on line e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.**

Rio de Janeiro, 26 de março de 2019.


Martha Cecilia Suárez Mutis
Matrícula SIAPE 1556044

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob nº DCE-10023/19 no livro nº II, folha 59 em 26/03/2019.

Aos meus pais **Antonio Rodrigues da Silva** (*in memoriam*) e **Neide Jeremias da Silva**, que com muito amor, carinho e auxílio me educaram e ensinaram a escolher os melhores caminhos a serem trilhados, a importância de valores como ética, respeito, humildade e dignidade, e a sempre ter perseverança na conquista dos meus objetivos e na vida.

À minha amiga e fiel escudeira **Ana Carolina Moreira El-Bainy** que, pelo companheirismo, carinho, compreensão, cumplicidade, dedicação e apoio, sempre me motivou a vencer os desafios e nunca me deixou sem uma palavra no momento certo. Para você, toda a minha gratidão e carinho.

Ao meu amigo e irmão de coração **César Roberto Maillo**, pela amizade e incentivo de todas as horas.

Aos amigos que estiveram ao meu lado pelo apoio e incentivo incansáveis.

À todos meus familiares, irmão, avós, tios e primos que através da carinhosa convivência me proporcionaram tranquilidade e firmeza para realização deste trabalho.

À minha pequena linda sobrinha **Mariana**, cujo amor e alegria contagia nossas vidas e merece um grande futuro! Seja grande princesa!

Por fim, a todos os jovens cientistas que, nesse país de tantas dificuldades e poucos reconhecimentos, não medem esforços pelo progresso da ciência. Nunca desistam!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível porque recebi o apoio de muitas pessoas e instituições. A todos esses que me apoiaram e incentivaram, o meu sincero agradecimento, carinho e respeito.

Primordialmente, à Dr^a Maria Helena Féres Saad, do Laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ, minha orientadora, pela confiança, amizade, dedicação, compreensão, apoio nas horas difíceis e pela fundamental participação e colaboração para a realização deste trabalho. Sem ela nada disso seria possível. Muito obrigado por esses anos todos juntos! Você tem minha grande admiração!

À Dr^a Luciana Rodrigues, da Universidade do estado do Rio de Janeiro, pelo carinho, respeito, colaboração e apoio, que sempre se mostrando compreensiva, teve um papel importante para a realização desse trabalho. Muito obrigado pela parceria que nos proporcionou e por abrir as portas do Laboratório de Imunopatologia (LIP/UERJ) para que conseguíssemos concluir esse projeto.

À minha querida mãe por todo o incentivo, paciência, auxílio, amor e suas carinhosas palavras nos momentos mais delicados.

À equipe do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ e do LIP/UERJ, em especial a amiga Raquel Corrêa, ao Vinicius e a Isabelle que foram pessoas que me incentivaram e ajudaram muito nessa caminhada, trabalhando juntos direto, com quem tive o prazer de dividir bancadas e fluxos, meu muito obrigadão, vocês também foram fundamentais para esse trabalho acontecer.

À minha grande amiga Ana Carolina Moreira El-Bainy, pelo carinho, amizade, incentivo, apoio e grande colaboração em muitas horas de dificuldade, tendo uma significativa participação para que esse trabalho terminasse. Obrigado por estar ao meu lado em muitos momentos.

Às amigas e biólogas Dra. Isabella Gama Sardella e Silvia Maria Almeida Machado, do Laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ, pela confiança sempre depositada e paciência dedicada nos valiosos ensinamentos, além da grande colaboração e apoio para a confecção deste trabalho.

Aos amigos pesquisadores do laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ e aqueles que passaram por lá, em especial Marisa Signorelli, Dr. Adolfo Barreto, Carla Mulinari, Pedro Henrique e Carol Macaiba que me motivaram e contribuíram com conhecimentos teóricos fundamentais para o meu aprendizado.

Aos amigos que me acompanham desde o curso de graduação em Biologia, cujo convívio e carinho incentivaram a realização deste trabalho, em especial a: Carolina Vasconcelos, Edson Monteiro Jr., Rodolfo Gutterres, Paulo Vinicius Farias e Rafael Nunes.

Aos meus amigos de vida, em especial a Cristian Moltedo, Luciano Cerqueira, Maycon Irineu, Cesar Roberto Maillo, Fernanda Monducci, Igor Mattos, Roberta Pedrosa, Tandy Campos, Fabiano Abreu, João Batista, Gregory Lopes, Pedro Zaccur, Marise Lopes e Beto Lessa por todo incentivo e força.

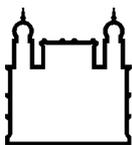
À Fundação Oswaldo Cruz, cujas estruturas possibilitaram a confecção deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro, contribuindo de forma significativa para a confecção deste trabalho.

A todos os amigos do Pavilhão de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, especialmente a Solange Quintela e Sr. Paulo Salles.

E, acima de tudo, agradeço a DEUS, por permitir a conquista de mais uma etapa importante de minha vida.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”
(Arthur Schopenhauer)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

AValiação de Biomarcadores da Resposta Imune Celular e Humoral na Tuberculose Pleural

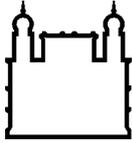
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Renan Jeremias da Silva

A TB pleural (TBpl) é a principal causa de derrame pleural em nosso meio. Os métodos microbiológicos tradicionais, a histopatologia, teste diagnóstico padrão, e a dosagem da adenosina deaminase (ADA) apresentam limitações. Assim, há uma forte demanda por métodos mais simples, rápidos e acurados, bem como a busca por novos marcadores de TB, que auxiliem o diagnóstico da doença. Assim, avaliamos a resposta imune celular e humoral a novos antígenos (Ag) específicos de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em pacientes com TBpl, investigando possíveis biomarcadores da doença que possam auxiliar no diagnóstico. Detectamos, por ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house*, anticorpos IgA e IgG aos antígenos de Mtb, MT10.3, MPT64, PPE59, fusão MPT64:MT10 e a quimera proteica F2, paralelamente, em soros e FP, e a produção citocinas Th1/Th2/Th17 por ensaio CBA, no sobrenadante de cultura de células do FP (PFMC) e sangue periférico (PBMC), estimulados com os antígenos ESAT-6/CFP-10 e PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP-10, em pacientes adultos com TBpl e com outras pleurisas não tuberculosas (OPL). Oferecemos prova de conceito da aplicabilidade do MT10.3:MPT64 na detecção de Ac por técnica rápida de imunodot. ELISA e dot-ELISA IgA e IgG foram avaliados em amostras pareadas de pacientes com TBpl (n=29) e com OPL (n=39). No ELISA, a imunodominância de IgA-MT10.3:MPT64 no FP foi confirmada em TBpl (86,2%), seguida por PPE59 (62%) e da F2 (51,7%). A IgG-MT10.3:MPT64 no FP e soro exibiu a sensibilidade de 65,5% e 51,7%, respectivamente. Ambos com especificidade de 95%. Os resultados dos testes combinados apresentaram sensibilidade para IgA-MT10.3:MPT64/PPE59 no FP (93,1%) e IgA/IgG-MT10.3:MPT64 (92,3%), seguido por IgA-MT10.3: MPT64/-MPT64 ou /-F2 (89,6%) com especificidade (94,9%). Os resultados combinados da ADA e IgA-MT10.3:MPT64/-F2 no FP demonstraram maior sensibilidade (96,6%), e especificidade de 92,3%. O teste rápido, simples e de baixo custo, baseado no dot-ELISA-MT10:MPT64 para detecção de IgA em FP e IgG em soro foi capaz de caracterizar a imunoreatividade dos antígenos em pacientes TBPL, podendo ser adaptado para um teste tipo “point-of-care” (POC). Na resposta imune celular, PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 apresentou performance comparável ao ESAT-6:CFP-10, porém com aumento significativo na produção de IFN- γ por PFMC em TBpl comparado aos OPL, bem como, em relação às PBMC. Produção de IL-10 por PFMC foi significativamente aumentada na TBpl para o ESAT-6:CFP-10 em relação às PBMC, mas não versus controle. As IL-2, IL-6, TNF e IL-17A apresentaram tendência ao aumento em culturas de PFMC, mas sem diferença significativa. O ELISA aqui desenvolvido para a detecção de IgA e IgG, utilizando diferentes marcadores, mostra o potencial desta ferramenta para auxiliar no diagnóstico da TBpl, bem como, pela primeira vez o desenvolvimento de um teste rápido e simples baseado no dot-ELISA-MT10.3:MPT-64. A proteína de fusão MT10:MPT64 se confirmou altamente promissora na detecção de biomarcador IgA em FP, e IgG sérica, que embora com menor sensibilidade tem potencial além dos testes microbiológicos. Combinando os resultados dos testes com a ADA há aumento no potencial diagnóstico. PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 mostrou performance similar ao ESAT-6:CFP-10, com aumento significativo na produção de IFN- γ em PFMC na TBpl, mais estudos são necessários para corroborar este dado.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose pleural, citocinas, IgA, IgG, ELISA.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF BIOMARKERS ON CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN PLEURAL TUBERCULOSIS

ABSTRACT

DOCTOR THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Renan Jeremias da Silva

Pleural TB (TBpl) is the most cause of pleural effusion in our country. Traditional microbiological methods, the standard diagnostic test and the dosage of adenosine deaminase (ADA) have limitations. Thus, there is a strong demand for a simpler, rapid and more accurate methods, as well as the search for new TB markers, which help diagnose the disease. To evaluate the cellular and humoral immune response to new *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) specific antigens (Ag) in TBpl patients, investigating possible biomarkers of the disease that may help in the diagnosis. IgA and IgG antibodies to Ag Mtb, MT10.3, MPT64, PPE59, MT10.3:MPT64 and the protein chimera F2 in parallel, in sera and FP, was measured for immunoenzymatic assay (ELISA). Cytokine production in vitro for peripheral fluids mononuclear cells (PFMC) and peripheral blood (PBMC) cells, stimulated with the Ag ESAT-6:CFP-10 and PstS1 (285-374)/CFP-10, in adult patients with TBpl and other non-tuberculous pleurisy (OPL). Provide proof of concept of the applicability of MT10.3: MPT64 in the detection of Ac by rapid immunodot technique. ELISA and dot-ELISA IgA and IgG were evaluated in paired samples of patients with TBpl (n = 29) and OPL (n = 39). In ELISA, immunodominance of PF IgA-MT10.3:MPT64 was confirmed in PLTB (86.2%) followed by PPE59 (62%), while serum IgA-F2 (51.7%). PF and serum IgG-MT10.3:MPT64 exhibited the sensitivity of 65.5% and 51.7% sensitivity, respectively. All results displayed 95% specificity. Combinatory results indicated 93.1% sensitivity for PF IgA-MT10.3:MPT64/PPE59 and IgA/IgG-MT10.3:MPT64 at 92.3% specificity, followed by IgA-MT10.3:MPT64/-F2 (89.6%) without jeopardizing specificity (94.9%). The combinatory results of the PF adenosine deaminase test (ADA) and IgA-MT10.3:MPT64/-F2 demonstrated the highest sensitivity (96.6%), with a specificity of 92.3%. Subsequently, a simple, low-cost, rapid test was demonstrated here based on format of a dot-ELISA-MT10.3:MPT64 for detection of IgA in FP and IgG in serum capable of characterizing antigen immunoreactivity in TBPL patients and could be adapted for a "point-of-care" (POC) test. In the cellular immune response, PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 presented performance comparable to ESAT-6:CFP-10, but with a significant increase in the production of IFN- γ by PFMC in TBpl compared to OPL, as well as, compared to PBMC culture. IL-10 production by PFMC significantly increased in TBpl, for ESAT-6:CFP-10 compared to PBMC, however not versus control. The IL-2, IL-6, TNF and IL-17A showed a tendency to increase in PFMC cultures, but without significant difference. The ELISA here developed for the detection of IgA and IgG, using different markers, shows the potential of this tool to aid in the diagnosis of TBpl, as well as for the first time the development of a quick and simple test based on a dot-ELISA MT10.3 MPT-64. The MT10: MPT64 fusion protein seems to be highly promising in the detection of IgA biomarker in FP, and serum IgG, although with less sensitivity has potential beyond microbiological testing. Combining test results with the ADA increases the diagnostic potential. PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 showed similar performance to ESAT-6: CFP-10, with a significant increase in the production of IFN- γ in PFMC in TBpl. Further studies to corroborate this data is deserved.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, pleural tuberculosis, cytokines, IgA, IgG, ELISA.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão bibliográfica	8
1.1.1 Breve histórico da tuberculose	8
1.1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : características gerais	10
1.1.3 Epidemiologia	12
1.1.4 Susceptibilidade, patogenia e Imunopatologia da tuberculose	14
1.1.5 Resposta imune na tuberculose	15
1.1.5.1 Células participantes	15
1.1.5.2 A resposta imune inata e a ativação da resposta imune adaptativa	17
1.1.5.3 A resposta imune celular na tuberculose	18
1.1.5.4 A resposta imune humoral na tuberculose	20
1.1.6 Tuberculose Pleural	23
1.1.7 Testes imunoenzimáticos como ferramenta de diagnóstico para tuberculose	25
1.1.8 Antígenos com relevância para o estudo no diagnóstico da tuberculose	26
1.1.9 Métodos diagnósticos	28
1.2 Justificativa	31
2 HIPÓTESE	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Deseho do Estudo	36
4.2 População estudada e seleção dos pacientes	37

4.3	Antígenos e estímulos utilizados nos ensaios imunológicos	38
4.4	Coleta do espécime clínico	39
4.5	Análise da imunoreatividade das proteínas fusionadas de Mtb por ensaio imunoenzimático (ELISA) “in house”	40
4.5.1	Padronização e otimização dos testes MT10:MPT64 IgA e IgG em soro e FP	40
4.5.2	Padronização dos testes com os Ags F2, PPE59-IgA e F2, PPE59, MT10.3 e MPT-64 IgG, em FP	41
4.5.3	Parametrização dos testes F2, PPE59, MT10.3 e MPT-64 IgA e IgG em soro e MT10:MPT64, MT10.3 e MPT64 IgA em FP	41
4.6	ELISA “in house” na detecção de IgG e IgA em soro e fluido pleural.....	42
4.7	Fluxograma dos ensaios imunológicos	43
4.8	Ensaio piloto de dot-ELISA Immunoblotting.....	44
4.9	Preparação das culturas de células mononucleadas do sangue periférico e do fluido pleural	44
4.10	Quantificação de citocinas por Citometria de Fluxo	45
4.11	Análise dos resultados	45
5	RESULTADOS	47
5.1	Avaliação da resposta humoral frente a antígenos de Mtb, MT10.3:MPT-64, F2, PPE59, MT10.3 e MPT-64 em pacientes com derrame pleural:	47
5.1.1	ELISA “in house”	47
5.1.2	Padronização e otimização do ELISA “in house” com a proteína de fusão MT10.3:MPT64 para IgA e IgG em soro e FP	47
5.1.3	Padronização do ELISA com a quimera proteica F2 para IgA e IgG em FP	49
5.1.4	Padronização do ELISA com a proteína PPE59 para IgA em FP	50
5.1.5	Padronização do ELISA com as proteínas MT10.3 e MPT64 para IgG em FP	51

5.1.6	Características da população do estudo da detecção de imunoglobulinas.....	52
5.1.7	ELISA “ <i>in house</i> ” para detecção de IgA-MT10.3:MPT-64 em FP e soro de pacientes TBpl e OPL.....	54
5.1.8	ELISA “ <i>in house</i> ” para detecção de IgG-MT10.3:MPT-64 em FP e soro de pacientes TBpl e OPL.....	56
5.1.9	ELISA “ <i>in house</i> ” na detecção de IgA e IgG reativas à quimera proteica F2 em FP e soro de pacientes TBpl e OPL.....	57
5.1.10	ELISA “ <i>in house</i> ” para a proteína PPE59 detectou diferenças significativas de médias de reatividade de IgA em FP e soro e IgG apenas no soro, entre pacientes TBpl e OP.....	60
5.1.11	Detecção de IgA por ELISA “ <i>in house</i> ” para a proteína MT10.3 nas diferentes diluições de soro e FP de pacientes TBpl e OPL.....	62
5.1.12	Diferença significativa nas medias de reatividade de IgA entre pacientes TBpl e OPL foi evidenciado no ELISA “ <i>in house</i> ” para MPT64 em todas as diluições de soro e no FP	63
5.1.13	ELISA “ <i>in house</i> ” para detecção de IgG mostrou diferença significativa nas médias de reatividade no soro entre pacientes TBpl e OPL para a proteína MT10.3, mas não para MPT64	65
5.1.14	Avaliação dos resultados do ELISA “ <i>in house</i> ” separados ou em combinação para os diferentes antígenos testados.....	66
5.1.15	Comparação de testes-padrão e ADA com as respostas imunes no diagnóstico de tuberculose pleural	69
5.2	dot-ELISA para a detecção de TB pleural	72
5.2.1	Padronização e otimização dot-ELISA com a proteína de fusão MT10.3:MPT64 para IgA e IgG em soro e FP.....	72
5.2.2	Resultados dot-ELISA com a proteína de fusão MT10.3:MPT64 para IgA e IgG em soro e FP	74

5.3	Validação do ELISA “in house” na detecção da resposta humoral para os Ags MT10.3:MPT-64 e F2 como teste promissor em pacientes com derrame pleural.....	80
5.3.1	Validação do ELISA IgG e IgA-MT10.3:MPT64 e F2 “in house” para o diagnóstico da TBpl	80
5.4	Avaliação da resposta imune celular em fluido pleural e sangue total em pacientes com derrame pleural.	84
5.4.1	Características da população do estudo da detecção de citocinas.....	84
5.4.2	Produção de citocinas Th1, Th2 e Th17 por PBMC e PFMC de pacientes com derrame pleural em resposta aos antígenos PstS1 ₍₂₈₅₋₃₇₄₎ :CFP10 e ESAT6:CFP10.....	86
6	DISCUSSÃO	95
7	CONCLUSÕES	114
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	115
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
10	APÊNDICE 1: ARTIGO SUBMETIDO	157
11	ANEXO 1: PARECER DO CEP	201

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência global de tuberculose em 2017 (adaptado de Global Tuberculosis Report, WHO, 2018).....	1
Figura 2 - Estrutura da parede celular das micobactérias. Os componentes incluem a (A) membrana plasmática, (B) peptidoglicano, (C) arabinogalactana (D) lipoarabinomanana coberta por manose, (E) proteínas associadas à membrana plasmática e à parede celular, (F) ácidos micólicos, (G) moléculas de glicolípídios de superfície associadas aos ácidos micólicos, (P) molécula de fosfato.	11
Figura 3 - Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil habitantes), Brasil, 2008 a 2017 (Brasil, 2018).....	12
Figura 4 - Coeficiente de mortalidade por tuberculose (por 100 mil habitantes), Brasil, 2007 a 2016 (Brasil, 2018).....	13
Figura 5 - Principais eventos da resposta imune inata e adquirida que ocorrem na infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> após sua inalação pelo hospedeiro.....	16
Figura 6 - Os mecanismos pelos quais as células B atuam na resposta imune ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
Figura 7 - Representação esquemática da efusão pleural transudativa e exudativa causada por diferentes patologias, inclusive por infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
Figura 8 - Fluxograma dos ensaios imunológicos realizados no estudo de biomarcadores da resposta imune celular e humoral na Tuberculose pleural (TBpl).....	43
Figura 9 - Otimização do ELISA com diluições seriadas de <i>pools</i> de fluidos pleurais e soro de pacientes com tuberculose pleural (pool ⁺) e outras pleurisas (pool ⁻), utilizando: A e B) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (0,05 µg/mL) com diluições seriadas de <i>pools</i> de soro, na detecção de IgA 1:2.500; C e D) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (0,5 µg/mL) com diluições seriadas de <i>pools</i> de FP, na detecção de IgA 1:5.000, fazendo uso de dois tampões diferentes de lavagem e dois de diluição das amostras clínicas e conjugado: PBST 0,01% e PBST 0,01%-BSA 1% (A e C) e; PBST 0,1% e PBST0,1%-NaCl 0,3M, (B e D).....	48
Figura 10 - Otimização do ELISA com diluições seriadas de <i>pools</i> de soros de pacientes com tuberculose pleural (pool ⁺) e outras pleurisas (pool ⁻), utilizando a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (1,0 µg/mL) na detecção de IgG (1:10.000),	

fazendo uso de dois tampões diferentes de lavagem e dois de diluição das amostras clínicas e conjugado: A) PBST 0,01% e PBST 0,01%-BSA 1%, respectivamente; B) PBST 0,1% e PBST0,1%-NaCl 0,3M, respectivamente.....49

Figura 11 - Padronização do ELISA com diluições seriadas de pools de fluido pleural de pacientes com tuberculose pleural (pool+) e outras pleurisas (pool-), utilizando a quimera proteica F2 (1,5 µg/mL) na detecção de IgG (1:10.000.....50

Figura 12 - Padronização do ELISA com diluições seriadas de pools de FP de pacientes com tuberculose pleural (pool+) e outras pleurisas (pool-), utilizando a quimera proteica PEE59 (0,5 µg/mL) na detecção de IgG (1:10.000).....51

Figura 13 - Padronização do ELISA com diluições seriadas de *pools* de fluido pleural de pacientes com tuberculose pleural (pool⁺) e outras pleurisas (pool⁻), utilizando: A) a proteína MT10.3 (1,0 µg/mL) na detecção de IgG (1:10.000) e B) a proteína MPT64 (0,5 µg/mL) na detecção de IgG (1:20.000).....51

Figura 14 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à proteína de fusão MT10.3:MPT64, de fluido pleural (FP) e soro de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL) ensaiados nas diluições seriadas 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800.....55

Figura 15 – Curvas ROC: IgA para o antígeno fusionado MT10.3:MPT64 nas diferentes diluições de fluido pleural (FP) e soro ensaiadas.....56

Figura 16 – Distribuição da resposta humoral na detecção de IgG, reativas à proteína de fusão MT10.3:MPT64, de soro (1:50) e líquido pleural (1:200) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL).....56

Figura 17 - Curvas ROC: IgG para o antígeno fusionado MT10.3:MPT64 nas diferentes diluições de soro e Fluido pleural (FP) ensaiadas.....57

Figura 18 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à quimera proteica F2, de líquido pleural (1:50) e soro (1:25, 1:50, 1:100 e 1:200) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL).....58

Figura 19 – Curvas ROC: IgA para a quimera proteica F2 nas diferentes diluições de soro e fluido pleural (FP) ensaiadas.....58

Figura 20 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgG, reativas à quimera proteica F2, de soro (1:200, 1:400 e 1:800 e 1:1.600) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL).....59

Figura 21 – Curvas ROC: IgG para a quimera proteica F2 nas diferentes diluições de soro ensaiadas.....	60
Figura 22 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à proteína PPE59, de soro (1:50 e 1:100) e fluido pleural (1:100) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL).....	60
Figura 23 – Curvas ROC: IgA para a proteína PPE59 nas diferentes diluições de soro e fluido pleural (FP) ensaiadas.....	61
Figura 24 – Distribuição da resposta humoral na detecção de IgG, reativas à proteína PPE59, de soro (1:50 e 1:100) de pacientes com TB pleural (TBpl) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL).....	61
Figura 25 – Curvas ROC: IgG para a proteína PPE59 nas diferentes diluições de soro ensaiadas.....	62
Figura 26 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à proteína de fusão MT10.3, de líquido pleural (1:50) e soro (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL).....	62
Figura 27 – Curvas ROC: IgA para a proteína MT10.3 nas diferentes diluições de soro e líquido pleural (FP) ensaiadas.....	63
Figura 28 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à proteína MPT64, de líquido pleural (1:50) e soro (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL).....	64
Figura 29 – Curvas ROC: IgA para a proteína MPT64 nas diferentes diluições de soro e fluido pleural (FP) ensaiadas.....	64
Figura 30 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgG, reativas as proteínas MT10.3 e MPT64 separadamente, de soro (1:400) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL).....	65
Figura 31 – Curvas ROC: IgG para as proteínas MT10.3 e MPT64 nas diferentes diluições de soro e fluido pleural (FP) ensaiadas.....	66
Figura 32 - Padronização do dot-ELISA com diluições seriadas de <i>pools</i> de fluidos pleurais e soro de pacientes com tuberculose pleural (<i>pool</i> ⁺) e outras pleurisas (<i>pool</i> ⁻), utilizando: A e B) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (0,05 µg/mL), F2 (0,5 µg/mL) e PPE59 (0,5 µg/mL) com diluições de <i>pools</i> de soro (1:50), na detecção de IgA 1:2.500 (Mt10.3:MPT64 e PPE59) e 1:5.000 (F2); C e D) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (0,5 µg/mL), F2 (1,5 µg/mL) e PPE59 (1,0 µg/mL) com	

diluições de *pools* de FP (1:50 (MT10.3:MPT64 e F2) e 1:100 (PPE59)), na detecção de IgA 1:5.000; E e F) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (1,0 µg/mL), F2 (1,5 µg/mL) e PPE59 (1,0 µg/mL) com diluições de *pools* de FP (1:50 (MT10.3:MPT64 e PPE59) e 1:200 (F2)), na detecção de IgG 1:10.000 (Mt10.3:MPT64 e PPE59) e 1:20.000 (F2).....73

Figura 33 – Resultados individuais do dot-ELISA IgA-MT10.3:MPT64 em FP de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e outras pleurisas não TB (OPL).....75

Figura 34 – Resultados individuais do dot-ELISA IgG-MT10.3:MPT64 em soro de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e outras pleurisas não TB (OPL).....77

Figura 35 – Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA e IgG, reativas à (A) proteína de fusão MT10.3:MPT64, de líquido pleural (1:50 e 1:200) e soro (1:50) e à (B) quimera proteica F2, de pacientes com suspeita de tuberculose pleural (TBpl).....81

Figura 36 - Produção *in vitro* de IFN-γ por células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles (C, n=6) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=10) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10. *diferença estatisticamente significativa de (p≤0,05).....87

Figura 37 - Resposta das citocinas IL-2 e IL-4 *in vitro*, de 10 pacientes com tuberculose pleural e 6 controles, produzidas pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) aos antígenos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10.....88

Figura 38 - Produção *in vitro* de IL-6 pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles (C, n=6) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=10) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10.....89

Figura 39 - Produção *in vitro* de IL-10 pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles (n=6) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl) (n=10) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10.....90

Figura 40 - Produção *in vitro* de TNF pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles (n=6) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl) (n=10) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-100.....91

Figura 41 - Produção *in vitro* de IL-17A pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles (n=6) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl) (n=10) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10.....92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Padronização e parametrização das concentrações de antígenos, amostras e diluições do anticorpo conjugado para detecção de IgA e IgG por ELISA em amostras de fluido pleural (FP) e soro de pacientes com tuberculose pleural (PLTB) e outras pleurites não TB (OPL).....	42
Tabela 2- Melhores parâmetros da padronização do teste de ELISA MT10.3:MPT64-IgA e IgG em soro e FP, respectivamente.....	47
Tabela 3- Melhores parâmetros da padronização do teste de ELISA F2-IgA.....	49
Tabela 4- Melhores parâmetros da padronização do teste de ELISA PPE59-IgA.....	50
Tabela 5 – Dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos dos participantes com tuberculose pleural (TBpl) e outras pleurites não TB (OPL).....	53
Tabela 6 – Parâmetros de validade do teste de ELISA para a detecção do anticorpo IgA e IgG contra diferentes Ag micobacterianos, MT10.3, MPT64, PPE59, a fusão MT10.3:MPT64 e a quimera proteica F2, nas diferentes diluições de FP e soro.....	67
Tabela 7 – Sensibilidade (S) e especificidade (Sp) dos resultados combinatórios de IgA e/ou IgG-MT10.3:MPT64 com PPE59, MT10.3, MPT64 e F2, no líquido pleural e no soro, em diferentes diluições, de pacientes com tuberculose pleural (PLTB) e outras pleuritis não TB (OPL).....	68
Tabela 8 - Os melhores resultados do ELISA comparados com os testes convencionais microbiológicos, histopatológicos e de adenosina deaminase (ADA) determinados em amostras de líquido pleural (FP) e / ou biópsia pleural (PB) para diagnóstico de infecção pleural tuberculosa (TBpl).....	71
Tabela 9 – Resultados individuais dos testes ELISA “ <i>in house</i> ” e dot-ELISA para o diagnóstico de TBpl nos pacientes com suspeita da doença, e seus respectivos diagnósticos reais finais definidos pelo HUPE.....	78
Tabela 10 – Resultados individuais dos testes ELISA “ <i>in house</i> ” para o diagnóstico de TBpl, nos pacientes com suspeita da doença sem diagnóstico confirmado.....	82
Tabela 11 – Resultados individuais e/ou combinados dos testes ELISA “ <i>in house</i> ” e ADA para o diagnóstico de TBpl nos pacientes com suspeita clínica de	

tuberculose pleural, e seus respectivos diagnósticos finais definidos pelo HUPE por testes convencionais.....83

Tabela 12 – Dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos dos participantes com tuberculose pleural (TBpl) e indivíduos não TB (controles).....85

Tabela 13 – Níveis de citocinas Th1/Th2/TH17 (pg/mL) determinados por ensaio CBA, produzidos por células mononucleares do fluido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) estimuladas com os Ags PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT6:CFP10, de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e indivíduos não TB (controles).....93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
38kDa	Lipoproteína ligante de fosfato de 38kDa
µm	Micrometros
µl	Microlitros
Ac	Anticorpo
ADA	Adenosina deaminase
Ag	Antígeno
Ag85	Complexo de Ags 85 contendo 3 proteínas de Mtb (FbpAm FbpB e FbPC2)
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AUC	Área sob a curva, do inglês <i>Area Under the Curve</i>
BAAR	Bacilo álcool ácido-resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BSA	Albumina sérica bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBA	Cytometric Bead Array
CFP-10	Proteína do filtrado de cultura de 10 kDa
CO ₂	Gás carbônico
CON-A	Concanavalina-A
Cut-off	pontos de corte
DC	Célula Dendrítica, do inglês <i>Dendritic Cell</i>
DcR	Receptor do fator de necrose tumoral
DO	Densidade óptica
DOTS	Tratamento diretamente observado
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ELISPOT	Ensaio imunoenzimático por detecção de pontos, do inglês <i>Enzyme-linked immunospot Assay</i>
ESAT-6	Alvo antigênico precocemente secretado de 6 kDa
ESAT-6:CFP10	Fusão de antígenos de Mtb, ESAT-6 e CFP-10
F2	Quimera proteica MT10.3 _(1M-40S) :MPT64M _(91L-205A) :MT10.3 _(41S-96)
FcR	Receptores Fc

FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FP	Fluido pleural
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófago
hab.	Habitantes
h	Horas
HIV/AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IGRA	Ensaio de produção de interferon-gama, do inglês <i>interferon-gamma release assays</i>
INH	Isoniazida
IL	Interleucina
IP-10	Proteína 10kDa induzida por interferon-gama
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kDa	KiloDalton
LAM	lipoarabinomanana
LAMICEL	Laboratório de Microbiologia Celular
LJ	Meio Lowenstein-Jensen
LES	Lupus eritematoso sistêmico
LIP	Laboratório de Imunopatologia
LTBI	Infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
Min	Minutos
ml	Mililitros
MPT-64	(Rv1980c) antígeno de Mtb (24kDa) codificado por genes da região de diferenciação 2
MT-10.3	(ES6.9, TB10.3, Rv3019c) antígeno de Mtb (10kDa) codificado por genes da região de diferenciação 2
MT10.3:MPT64	Fusão de antígenos de Mtb, MT10.3 e MPT64
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloreto de sódio
Nm	Nanômetros
NK	<i>Natural killer</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPL	Outras pleurisas não tuberculosas
p	<i>p</i> valor
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão, do inglês <i>pattern recognition receptors</i>
PAS	ácido p-aminosalicílico
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico
PFMC	Células mononucleadas do fluido pleural
PBSt	Tampão fosfato-salino com tween
POC	teste <i>point of care</i>
PPD	Derivado proteico purificado do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , do inglês <i>purified protein derivative</i>
PPE59	Antígeno de Mtb (19,8kDa) codificado por genes da RD11. Famílias PE (Pro-Glu) e PPE (Pro-Pro-Glu)
Prism6	Prism Graph-Pad Software
PstS ₍₂₈₅₋₃₇₄₎ :CFP10	Construção da proteína de fusão de Mtb com 267 pb da extremidade terminal (285-374) do gene Rv0934 e a sequência completa do gene Rv3874
QFT-GIT	QuantiFERON-TB Gold <i>In-Tube</i>
RIF	Rifampicina
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
R-X	Radiografia de tórax
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
SM	Streptomomicina
SPSS	Pacote Estatístico para Ciências Sociais, do inglês Statistical Package for Social Sciences software
T.A	Temperatura ambiente
TB	Tuberculose
TBpl	Tuberculose pleural
TBpul	Tuberculose pulmonar
TBS-T	Tampão tris-base salino 0,1% tween

TC	Tomografia de tórax
TCB	Tampão carbonato-bicarbonato
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCT	Teste cutâneo a tuberculina
TGF- β	Fator transformador de crescimento-beta
Th1	Células T auxiliar tipo 1 (perfil pró-inflamatório)
Th2	Células T auxiliar tipo 1 (perfil anti-inflamatório)
TMB	Solução substrato - 3,3 ,5,5-tetramethylbenzidine
TNF	Fator de necrose tumoral
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

1 INTRODUÇÃO

A grave e constante situação da tuberculose (TB) no mundo se reflete nos altos índices de mortalidade anuais. De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2017, a incidência global da doença foi de 10.0 milhões (variando entre 9.0–11.1 milhões) de novos casos (Figura 1), levando a identificação de 30 países com as maiores taxas de incidência mundial, ocupando o Brasil o 20º lugar (WHO, 2018).

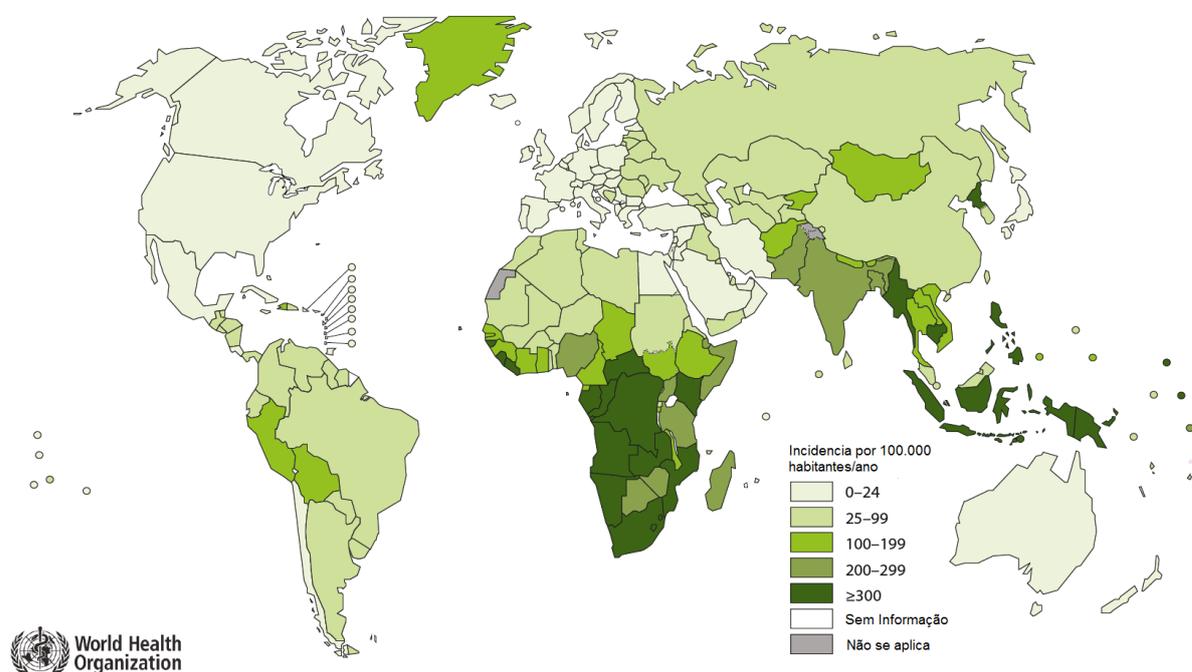


Figura 1 – Incidência global de tuberculose em 2017 (adaptado de Global Tuberculosis Report, WHO, 2018).

Embora a forma pulmonar seja a manifestação clínica mais comum da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), a doença pode também afetar outros órgãos, levando ao desenvolvimento de formas extrapulmonares que representaram 14 % dos 6.4 milhões de casos incidentes em 2017. Dentre estas a TB pleural (TBpl) é a mais frequente em vários países (HIJJAR; CAMPOS; FEITOSA; 2005; LIGHT, 2010; DONG; YANG, 2015; WHO, 2018), representado 15% do total dos casos mundiais incidentes notificados em 2016 (WHO, 2017). No Brasil, a taxa de prevalência da TB foi de 87 por 100.000 habitantes, e foram diagnosticados 9.807

novos casos de TB extrapulmonar em 2016 (WHO, 2017). Em geral, a incidência da TBpl está diretamente relacionada com a prevalência local da doença. O derrame pleural representa a manifestação mais frequente da TBpl, responsável por cerca de 50% de todos os diagnósticos notificados no Brasil (NEVES; DIAS; CUNHA, 2007; SALES *et al.*, 2009). A doença geralmente afeta jovens adultos imunocompetentes e, embora haja possibilidade do sistema imune controlar a infecção, há um risco de desenvolver TB ativa. Assim, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são necessários para evitar a evolução da TBpl para empiema tuberculoso ou fibrose pleural (CANDELA *et al.*, 2003; SONMEZOGLU *et al.*, 2008).

Em geral, a resposta imune inata é eficaz contra Mtb, eliminando os bacilos ou contendo a infecção, levando a um estado de latência. Quando essa resposta inicial não é eficaz, a multiplicação do bacilo induz a imunidade mediada por células (MORRISON, PAI, HOPEWEL, 2008; NATARAJAN *et al.*, 2011). A interação de células T com os macrófagos infectados é fundamental para a imunidade protetora contra a TB e depende diretamente da produção de citocinas por diferentes tipos celulares (MUNK, EMOTO, 1995). A resposta imune anti-TB depende, predominantemente das células do tipo Th1, com produção de interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina (IL) 12, citocinas essenciais nas fases reguladora e efetora da resposta imune ao Mtb (BOOM *et al.*, 2003). O IFN- γ ativa macrófagos, que produzem uma variedade de substâncias envolvidas na inibição do crescimento e morte dos bacilos. Os macrófagos secretam IL-12, (SCHLUGER; ROM, 1998.), importante na patogênese da doença, uma vez que, induz o desenvolvimento de células Th1 (TRINCHIERI, 1994.). Mtb também induz a secreção de TNF por macrófagos, células dendríticas e células T (RAJA, 2004). Essa citocina desempenha múltiplos papéis na resposta imunológica na TBpl, entretanto, variados e controversos são os estudos sobre as mudanças nos níveis sistêmicos de citocinas na TBpl. Deveci *et al.* (2005) demonstraram altos níveis séricos de IL-12p40, IL-10, TNF e IFN- γ em pacientes com TB. Os níveis de IFN- γ e IL-27 foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no soro e no fluido pleural (FP) de pacientes com pleurisia tuberculosa em outro estudo, sugerindo que a combinação dos resultados dessas citocinas pode fornecer melhor desempenho no diagnóstico da TBpl (ZHANG *et al.*, 2018a). Recentemente, Kashyap *et al.* (2018) demonstraram a relação IFN- γ /IL-2 no soro como o melhor biomarcador para o diagnóstico de TBpl, com altos níveis de IFN- γ em pacientes TB e revelando que baixos níveis séricos de IL-2 deixam o indivíduo mais susceptível à TB. Estimulação de células

mononucleadas de FP (PFMC) com *Bacilo de Calmette-Guérin* (BCG) induziu maior expressão de IFN- α e inibiu a produção de IL-1 β , em pacientes com TB (MA *et al.*, 2014). Maiores níveis de IFN- γ , adenosina deaminase (ADA), receptor do fator de necrose tumoral (DcR) 3, MCP-1, IP-10, granzyme A e perforina, foram relatados no FP de pacientes TBpl em comparação com aqueles que apresentavam outras etiologias, bem como TNF-sR1 foi um fator independente associado com TBpl, sugerindo o IFN- γ e a ADA como biomarcadores para o diagnóstico de TBpl e, detecção simultânea de DcR3 e TNF-sR1 podem melhorar a eficácia diagnóstica (SHU *et al.*, 2015). Em outro estudo, utilizando a técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), TNF no FP foi descrito como promissor biomarcador para o diagnóstico de TBpl mas a IL-10 não apresentou valor diagnóstico. No entanto, a sensibilidade e especificidade do TNF foram menores que as obtidas com a ADA (CILEDAG *et al.*, 2010). O nível de TNF no FP de pacientes com derrame pleural tuberculoso foi maior do que naqueles com derrames pleurais não tuberculosos, mas não houve diferença significativa entre os níveis séricos de TNF entre esses grupos (DAMAYANTI; YUDHAWATI, 2018). A supressão da função das células T com consequente diminuição da produção de citocinas Th1, frente a estímulos específicos, pode estar relacionada a um aumento na produção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β (HIRSCH *et al.*, 1996; GONG *et al.*, 1996; HIRSCH *et al.*, 1997; JANEWAY *et al.*, 2002; DE LA BARRERA *et al.*, 2004). Existem evidências que a micobactéria secreta proteínas capazes de induzir a expressão de IL-10, visando burlar os mecanismos de defesa do hospedeiro (LAPA E SILVA; BOÉCHAT, 2004), mas a produção excessiva destas citocinas pode resultar na incapacidade de controlar a infecção.

Os métodos tradicionais microbiológicos para o diagnóstico da TB dependem da presença de bacilos em amostras clínicas, apresentando, portanto, baixa sensibilidade nos casos extrapulmonares, além de ser moroso e laborioso, fazendo-se necessária a obtenção de novos testes e biomarcadores para auxiliar no diagnóstico rápido da TB. A combinação de cultura de FP e escarro na investigação diagnóstica da pleurite tuberculosa parece uma abordagem inicial razoável, com um rendimento diagnóstico combinado de quase 80%. Em um estudo recente, o rendimento diagnóstico foi de 63% para cultura de efusão pleural, 48% para cultura de escarro e 79% para a combinação de culturas de efusão e escarro, utilizando meios de cultura líquidos que, embora menos morosos requer mais de uma semana para o resultado (RUAN *et al.*, 2012). Entretanto, usualmente, as melhores series

diagnósticas apresentam frequência de positividade menores, onde a microscopia direta para a pesquisa de bacilos álcool ácido rersistente (BAAR) no FP é raramente positiva (menos de 10% dos casos) (UDWADIA; SEN, 2010) e a sensibilidade da cultura para Mtb, via de regra, não ultrapassa os 55% - 70%, além de fornecer o diagnóstico tardiamente (VORSTER *et al.*, 2015).

As técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas no diagnóstico das doenças infecciosas e são altamente promissoras. Os ensaios baseados nos ácidos nucleicos (NAA), para avaliação de pleurite TB em pacientes HIV-negativos, parecem ter alta especificidade, mas sensibilidade relativamente baixa. Em um estudo de meta-análise de pacientes HIV-negativos, os testes de NAA tiveram sensibilidade relativamente baixa (62%), mas alta especificidade (98%) para o diagnóstico de TB (PAI *et al.*, 2004). Em estudo mais recente em 20 casos confirmados de TB, em uma região com alta prevalência de TB, o teste rápido Xpert MTB/RIF contrastou em sensibilidade (92%) e especificidade (100%) (FRIEDRICH, VON GROOTE-BIDLINGMAIER, DIACON, 2011). Entretanto, o ensaio Xpert MTB/RIF aplicado em população de alta prevalência de HIV/TB, sensibilidade (28,7%), especificidade (96,6%), e valores preditivos positivos (96,1%) e negativos (31,1%) mais baixos foram descritos (LUSIBA *et al.*, 2014). O teste Xpert MTB RIF no FP não diagnostica com precisão a TB pleural e, portanto, não pode ser usado como teste de avaliação inicial em pacientes com suspeita de TB pleural. Em recente avaliação por meta-análise, 23 estudos foram incluídos, o potencial diagnóstico do Xpert MTB/RIF foi descrito com sensibilidade e especificidade de 30% (95% CI: 21–42%, $I^2 = 87.93\%$) e 99% (95% CI: 97–100%, $I^2 = 96.20\%$), respectivamente, com área sobre a curva de 0.86 (95% CI: 0.83–0.89), concluindo que o ensaio rápido molecular é de limitado valor como *screening*, mas tem alto potencial para confirmação diagnóstica e na identificação de pacientes TBpl, embora com baixa sensibilidade (HUO; PENG, 2018).

A presença de granulomas caseosos contendo bacilos álcool ácido-resistentes (BAAR) no exame histológico da biópsia pleural configura diagnóstico de pleurite tuberculosa (GOPI *et al.*, 2007). A demonstração de BAAR não é um requisito absoluto; mas a presença de granulomas, em pacientes de áreas endêmicas, é considerada adequada (DIACON *et al.*, 2003) e, portanto, o exame histopatológico das amostras de biópsia pleurais compreende o teste padrão de referência para TBpl. Entretanto, o exame histopatológico tem por desvantagem, a sensibilidade variável, é oneroso e moroso, requer pessoal especializado, além do

processo para obtenção de amostras ser muito invasivo (KATARIA; KHURSHID, 2001; MORISSON; NEVES, 2008).

Os métodos baseados na resposta imune celular, por determinação da concentração de IFN- γ no FP, não estimulado, por kits de ensaio de imunoabsorção enzimática disponíveis comercialmente, é considerado uma ferramenta diagnóstica útil na pleurisia tuberculosa (AOE *et al.*, 2003). Entretanto, há variabilidade de sensibilidade entre os estudos (VILLEGAS, LABRADA, SARAVIA, 2000; JIANG *et al.* 2007).

Os testes baseados em células mononucleadas do FP (FPMC) ou do sangue periférico (PBMC), com liberação de IFN- γ (“interferon gamma release assays”, IGRA) e outras citocinas após estímulo com os Ags ESAT-6:CFP10 (VAN PINXTEREN *et al.*, 2000; DOHERTY *et al.*, 2002; TAVARES *et al.*, 2007) são utilizados na detecção da TB pulmonar (TBpul) e de infecção latente por Mtb (LTBI), embora não discrimine uma da outra. Mais recentemente, a quimera fusionada PstS₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 (ARAUJO *et al.*, 2014) se mostrou um marcador alternativo atraente para detecção da TBpul e de LTBI, embora com maior reatividade para LTBI, entretanto não há informações quanto o potencial dessa nova quimera como um marcador alternativo para o diagnóstico da TBpl. Testes sorodiagnostics baseados nestes antígenos, mostraram sensibilidade e especificidade variando de 43-100% e de 44-100%, respectivamente (PARKASH *et al.*, 2009). Ren *et al.* (2010) observou sensibilidade e especificidade de 70% no teste sorológico com os Ags ESAT6:CFP10, com um bom valor diagnóstico para TBpul e TB extrapulmonar, sendo comparável ao descrito por Wu *et al.* (2010). Na TB ativa e LTBI, a resposta específica de subclasses de imunoglobulina G (IgG) ao ESAT6:CFP10 no soro, por ELISA, foi demonstrado com altas sensibilidades para IgG1 (93.3%), e sensibilidade de 53,3% para PstS₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, mantendo especificidades $\geq 90\%$ (ARAUJO *et al.*, 2018). Adicionalmente, foi relatado que o Ag ESAT6 induz maior produção de IFN γ e da quimiocina CXCL9, podendo ser utilizado para diferenciar TB de acordo com a severidade das infecções (HASAN *et al.*, 2009). Lee *et al.* (2003) demonstraram que a produção da quimiocina CCL2 não é exclusivamente elevada sistemicamente em pacientes com TB, estando aumentada no local da infecção na fase crônica da TB ou na infecção pleural. Liao *et al.* (2014) observaram aumento de IFN- γ no FP de pacientes com TBpl, sugerindo que o ELISPOT-IFN- γ para os Ags ESAT6 e ESAT6/CFP10 é capaz de proporcionar um diagnóstico rápido e acurado da doença. Recentemente, Gao *et al.* (2016) descreveram a IL-31 como um novo

biomarcador para o diagnóstico de TBpl, tanto no FP quanto no soro. Os níveis séricos da proteína quimioatractante de monócitos 1 (MCP-1) e IL-8 no ensaio comercial QuantiFERON-TB Gold In-Tube foram significativamente diferentes entre pacientes TB que possuíam resultado PPD (*purified protein derivative*) negativo ou positivo (XIN *et al.*, 2018). O nível de IL-27 no FP de pacientes com derrame pleural tuberculoso foi significativamente maior que naqueles com derrame pleural maligno e nos soros ($p < 0,05$), por ELISA, sendo descritas taxas de sensibilidade, especificidade e acurácia de 95%, 97,2% e 96,1%, respectivamente, sugerindo potencial no diagnóstico do derrame pleural tuberculoso (SUN *et al.*, 2014). Foi demonstrada, em dosagem de IFN- γ produzidos por células do FP estimuladas com os Ags ESAT6 e CFP10 pelo ensaio T-SPOT.TB, alta sensibilidade (100%) e especificidade de 89% no diagnóstico de TBpl em uma região de alta incidência da doença (ADILISTYA, ASTRAWINATA, NASIR, 2016). Musvosvi *et al.* (2018) sugeriram o uso do ensaio ELISPOT, avaliando a combinação da expressão dos diferentes biomarcadores HLA-DR, IFN- γ e IL-2 em resposta aos Ags ESAT6:CFP10, por técnica de citometria de fluxo, por mostrar alta sensibilidade (86%) e especificidade (100%) para o diagnóstico e/ou monitoramento do tratamento da TB.

Por outro lado, estudos envolvendo derrame pleural tuberculoso sugerem que os biomarcadores IFN- γ , TNF e a ADA podem contribuir para um diagnóstico mais eficiente e diferencial na TBpl (DHEDA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2014; SHU *et al.*, 2015). A ADA é um biomarcador enzimático de ativação linfocitária, e tem se mostrado um teste útil no diagnóstico da TBpl (LIGHT, 2010). A atividade da ADA é geralmente medida por método colorimétrico, que é rápido, de baixo custo, reproduzível e de fácil operacionalidade (MORISSON; NEVES, 2008). No entanto, apresenta limitações: o valor preditivo da atividade da ADA depende da prevalência local da TB; baixa sensibilidade em pacientes imunodeprimidos; pode ter resultados falso-negativo ou falso-positivo devido à reatividade cruzada com outras doenças envolvendo derrame pleural, como linfoma, doenças vasculares do colágeno e empiema bacteriano; apresenta ampla variação de resultados de região para região; e assim, deve ser utilizada com cuidado no diagnóstico da TB (TRAJMAN *et al.*, 2007; OGATA *et al.*, 2011; KASHIWABARA; OKAMOTO; YAMANE, 2012).

Os métodos diagnósticos baseados na resposta humoral, tais como os testes sorológicos com os antígenos (Ags) 38kDa, MPT-64 e Ag85, tem se mostrado promissores na TB. Estudos anteriores demonstraram a alta imunogenicidade do

MPT-64 (KAISERMANN *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008; SARDELLA *et al.*, 2008; SARDELLA *et al.*, 2014) em áreas endêmicas como o Brasil, entretanto, validação em novas coortes de pacientes com TBpl não foram realizadas por estes autores. O teste sorológico baseado na resposta de anticorpos (Ac) pode ser uma alternativa atraente para auxiliar no diagnóstico, pois é simples, rápido e de fácil operacionalidade, possibilitando sua aplicação no sistema público de saúde, onde a demanda diagnóstica é alta por testes tipo *point of care* (POC). Em estudo anterior, Araujo *et al.* (2010) demonstrou que o antígeno fusionado MT10.3:MPT64 é reconhecido pela imunoglobulina A (IgA) no FP de pacientes com TBpl, com alta sensibilidade (81.4%) e especificidade (95,5%). Entretanto, o soro seria um espécime clínico mais promissor para ser utilizado em testes imunoenzimático, sendo comparativamente menos invasivo de se obter que o FP e operacionalmente mais simples de obtenção. Dessa forma, avaliar imunoreatividade de IgA, e outras Igs do soro, é uma abordagem que poderia trazer benefícios para auxiliar o diagnóstico rápido da TBpl. Novas coortes para validação do teste não foi realizada, já que os estudos com antígenos únicos e com a proteína de fusão foram realizados com os mesmos espécimes clínicos de biorepositório.

Recentemente, a proteína de fusão baseada nos epitopos dos antígenos MPT64 e MT10.3, denominada F2 (MT10.3_(1M-40S):MPT64_{m(91L-205A)}:MT10.3_(41S-96)), foi descrita como sendo predominantemente reconhecida por IgA no soro de pacientes com TBpul (SARDELLA *et al.*, 2015).

Por outro lado, estudos anteriores sugeriram que proteínas micobacterianas pertencentes à família das PPE estão envolvidas em muitos aspectos da patogênese da TB, incluindo a ligação da bactéria às células do hospedeiro, imunomodulação, reconhecimento de Ac e capacidade de persistência de bacilos nos granulomas (AL-ATTIYAH, MUSTAFA, 2008; COLE, BARRELL, 1998b; KARBOUL *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; MULINARI, 2016). Maior reatividade de IgA-PPE59 e menor de IgG em pacientes com TB pulmonar foram demonstradas (MULINARI, 2016). No entanto, não há estudos sobre a reatividade desses Ags no FP e/ou no soro de pacientes com TBpl.

Portanto, a identificação de novos biomarcadores e, com potencial para o desenvolvimento de métodos diagnósticos que diferenciem a TBpl de outras patologias com derrame pleural exsudativo, pode impactar de maneira significativa na assistência primária e no diagnóstico dos pacientes com TB, permitindo acesso

rápido à terapia, diminuição do número de óbitos e contribuindo para a interrupção da cadeia de transmissão da doença.

Nesse contexto, o presente estudo propõe investigar possíveis biomarcadores da resposta imune celular e humoral a diferentes Ags recombinantes de *Mtb* com potencial para auxiliar no diagnóstico da TB extrapulmonar. Assim, propomos: **i)** validação e/ou avaliação da acurácia da dosagem de IgG e IgA contra os Ags micobacterianos MT10.3, MPT64, PPE59, a fusão MT10.3:MPT64, e nova quimera proteica F2 (MT10.3_(1M-40S):MPT64M_(91L-205A):MT10.3_(41S-96)), paralelamente no FP e no soro de pacientes com TBpl e outras pleurisias não tuberculosas, utilizando a técnica de ELISA “*in house*”; **ii)** avaliação da resposta imune celular por diferentes citocinas produzidas por células mononucleadas do FP (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) estimuladas com Ags específicos de *Mtb* (*in vitro*), PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎/CFP-10 e ESAT6:CFP-10, em pacientes com TBpl e controles; **iii)** estimar a reatividade de Ac por meio de ensaio *dot-ELISA* aos antígenos que se mostraram promissores no ELISA.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Breve histórico da tuberculose

A TB é uma doença infecto-contagiosa crônica, tem por agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*, conhecida desde a antiguidade, com o aparecimento das primeiras civilizações. Foram encontradas lesões causadas pela TB em amostras de tecidos humanos obtidos de múmias egípcias de cerca de 3.400 a.C. (BATES; STEAD, 1993). Estudos moleculares demonstram que todos os membros modernos do complexo *Mtb* descendem de um único ancestral comum africano e coexiste com a humanidade há mais de 15.000 anos, e sua presença entre os hominídeos do Neolítico foi sugerida em investigações arqueológicas. Em humanos, ossos da coluna vertebral datados de, aproximadamente, 8.000 a.C., cujas lesões evidenciam a TB, foram identificados como exemplares mais antigos da doença (KAPUR *et al.*, 1974; BATES; STEAD, 1993; KAPUR *et al.*, 1994; ERNST *et al.*, 2007; GUTIERREZ *et al.*, 2005; HERSHKOVIT, 2008).

Embora seja uma doença conhecida desde a antiguidade, houve uma evolução lenta do conhecimento da TB no decorrer da história. Desde a época de

Hipócrates (460-377 a.C.) até o século XIX, a natureza da infecção não era conhecida. Chegou a ser considerada uma doença hereditária, uma vez que, após o adoecimento de um integrante da família, as chances dos demais também adoecerem eram maiores (KAPUR *et al.*, 1974; FILHO, 2001; CAMINERO, 2004).

Na idade média os relatos de casos são mais escassos, mas é conhecido o fato de existir patologias de manifestações linfoganglionares fistulizadas, as escrófulas (ROSEMBERG, 1999). Entretanto, a partir da Revolução Francesa e Industrial no século XVIII, os trabalhadores, submetidos a baixas condições socioeconômicas, com más condições de moradia e qualidade de vida, levou a um aumento progressivo na disseminação da TB pela Europa (COSTA, 1985; HIJJAR; CAMPOS; FEITOSA, 2005). A TB, bem como outras doenças como a sífilis e o alcoolismo foram considerados problemas sociais no decorrer do século XIX (FILHO, 2001).

Um importante advento surgiu quando a natureza da infecção foi descrita, na metade século XIX, em estudos de Villemin (1865) e de Robert Koch (1882), sendo que este último apresentou, na Reunião da Sociedade de Fisiologia, em Berlim, seu estudo identificando e descrevendo o agente etiológico da TB por técnica de coloração. Assim, ficou conhecido até os tempos atuais como bacilo de Koch (BK), provocando mudanças consideráveis no conhecimento etiológico e de transmissão da TB (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008) e estabelecendo a relação científica entre o bacilo e a doença (CAMINERO, 2004; DANIEL, 2006).

A partir dos anos 40, em meados da Segunda Guerra Mundial, os antibióticos como a estreptomicina (SM) e quimioterápicos como isoniazida (INH), ácido p-aminosalicílico (PAS) e a rifampicina (RIF), na década de 1960, foram introduzidos no tratamento da TB, gerando um decréscimo do número de casos a partir dos anos 70 possibilitando o início do controle da doença e expectativa de erradicação para o final do século XX (ISEMAN 2002; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Porém, a partir da década de 80, principalmente nos países desenvolvidos, houve um aumento considerável do número de casos associados a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Nos países em desenvolvimento a TB nunca foi eficientemente controlada e assim, em 1993, a OMS decretou a doença em estado de emergência global (RAVIGLIONE, 2003) e, mais tarde, propôs o DOTS (Tratamento diretamente supervisionado) como estratégia para o controle (TERRA; BERTOLOZZI, 2008).

Em pleno século XXI, mesmo com o advento de quimioterapias atuais eficazes contra o Mtb, pela utilização de antibióticos isoniazida, rifampicina,

etambutol, etionamida, quinolonas, floxacinas entre outras drogas injetáveis, a situação da TB ainda é um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, onde a pobreza, desigualdade social e más condições sócio-econômica e sanitária da população, associados à emergência de cepas multirresistentes aos antituberculostáticos e a epidemia de HIV/AIDS, promovem um aumento dos casos de coinfeção TB-HIV, desafiando o controle da TB no mundo (ALVES; NATAL, 2002; VENDRAMINI *et al.*, 2007; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A TB atinge grupos de maior vulnerabilidade, como os moradores de rua, presidiários, pessoas acometidas com outras doenças imunodebilitantes, como é o caso do diabetes mellitus e lupus (GALDSTON, 1954; ALI, 2014).

O desenvolvimento da genômica e bioinformática contribuiu para o progresso no conhecimento da biologia do bacilo, sua relação com o hospedeiro e desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, para os estudos epidemiológicos e filogenéticos, bem como para novas terapias (COLE *et al.*, 1998a).

1.1.2 *Mycobacterium tuberculosis*: características gerais

Mtb é uma das espécies do gênero *Mycobacterium*, sendo este o único da família *Mycobacteriaceae* inserido na ordem *Actinomycetales* e subordem *Corynebacteriacea*. É caracterizado um patógeno intracelular facultativo, infectante de macrófagos, aeróbico obrigatório e de crescimento lento, apresenta imobilidade e não forma esporos, ausente de flagelos, e apresenta virulência variável (DOMENECH; BARRY; COLE, 2001). Atualmente, já foram definidas mais de 200 espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (BROOKS *et al.*, 2014).

O bacilo possui morfologia delgada, reto ou ligeiramente curva e fina, variando de 0,2 a 0,6 µm de diâmetro e 1,0 a 4,0 µm de comprimento, não produz toxinas e acomete preferencialmente o sistema pulmonar (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Apresenta taxa de crescimento lenta, de mais de 18 horas, dependendo da disponibilidade de oxigênio, pH e nutrientes do meio (BRENNAN, NAKAIDO, 1995; SOTIR *et al.*, 1999). Esses fatores também influenciam o comportamento do bacilo no hospedeiro, podendo se multiplicar ativamente ou se manter em latência (CARMINERO, 2007). O envelope celular desses bacilos, constituído de membrana plasmática e parede celular, tem importante participação no processo de interação patógeno-hospedeiro. Sua parede celular apresenta alta

quantidade de lipídeos, conferindo rigidez a parede e a característica de BAAR e de hidrofobicidade. Os lipídeos também conferem proteção e resistência natural a numerosos antibióticos e agentes antimicrobianos, bem como a muitos desinfetantes e corantes, entretanto, não confere proteção à ação de agentes físicos como a luz solar, calor e radiação ultravioleta. Assim, sua complexa parede celular é fundamental para a resistência e proteção do bacilo frente a muitos fatores do hospedeiro, como ação de enzimas e moléculas tóxicas, promovendo a persistência do Mtb em tecidos que apresentem condições adequadas a sua sobrevivência (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1997; GOODFELOW; MAGEE, 1998; ARANAZ *et al.*, 1999; COUSINS *et al.*, 2003; REIS *et al.* 2007; ANDRADE *et al.*, 2008; HETT; RUBIN, 2008).

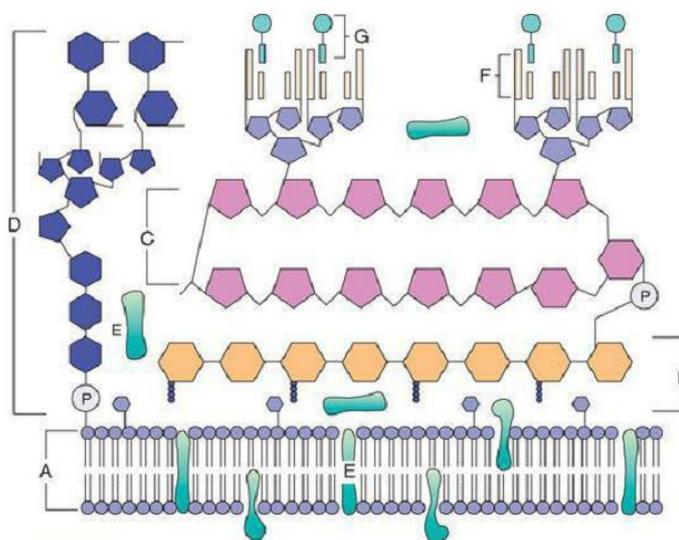


Figura 2 - Estrutura da parede celular das micobactérias. Os componentes incluem (A) membrana plasmática, (B) peptidoglicano, (C) arabinogalactana (D) lipoarabinomaniana coberta por manose, (E) proteínas associadas à membrana plasmática e à parede celular, (F) ácidos micólicos, (G) moléculas de glicolípídios de superfície associadas aos ácidos micólicos, (P) molécula de fosfato. Fonte: Karakousis *et al.*, 2004.

As estirpes *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* (raramente causa doença) são os principais agentes infecciosos da TB no homem. Essas espécies juntamente com *M. microti* (doença em roedores e humanos), *M. caprae* (doença em cabra), *M. pennipedii* (infectam leões marinhos), e mais recentemente *M. mungi* (isolado em mamífero do gênero Mungus) e *M. orygis* (isolados de *bovidae* e humanos na África e Ásia) (VIANA-NIERO *et al.* 2004; OCEPEK *et al.* 2005; ALEXANDER *et al.* 2010; INGEN *et al.* 2012), constituem o Complexo Mtb, pois apresentam 94 a 100% de similaridade em suas características e compartilham a

sequência do gene que o codifica o RNA ribossomal 16S. Entretanto, estas espécies possuem diferenças fisiológicas na sua virulência para o homem (COUSINS *et al.*, 2003; TORTOLI, 2006; ALMEIDA; ARAUJO, 2013; INCANDELA *et al.*, 2013).

1.1.3 Epidemiologia

A incidência de TB varia significativamente entre os países e isto está diretamente associado às suas condições socioeconômicas. Em 2017, países desenvolvidos economicamente apresentaram as menores taxas de TB (<10 novos casos por 100.000 habitantes), enquanto taxas de 150-400/100.000 habitantes foram encontradas nos 30 países de maior incidência de TB e acima de 500/100.000 hab. em alguns países, incluindo Moçambique, Filipinas e África do Sul (WHO,2018).

Em 2017, no Brasil foram notificados 69.569 casos novos de TB e um coeficiente de incidência de 33,5/100 mil habitantes. Esse coeficiente apresentou redução média anual de 1,6% entre 2008 e 2017. Foram registrados 4.426 óbitos por TB em 2016, resultando em um coeficiente de mortalidade de 2,1 óbitos/100 mil hab., que apresentou queda média anual de 2 % de 2007 a 2016 (Figuras 3 e 4) (BRASIL, 2018).

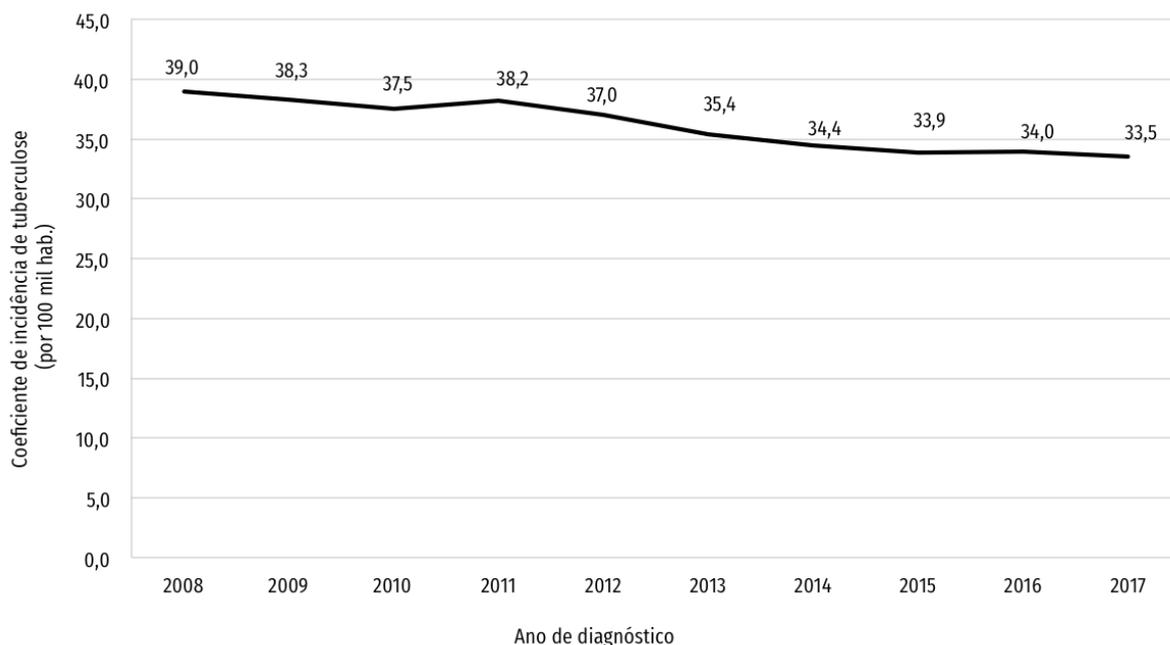


Figura 3 - Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil habitantes), Brasil, 2008 a 2017 (Brasil, 2018).

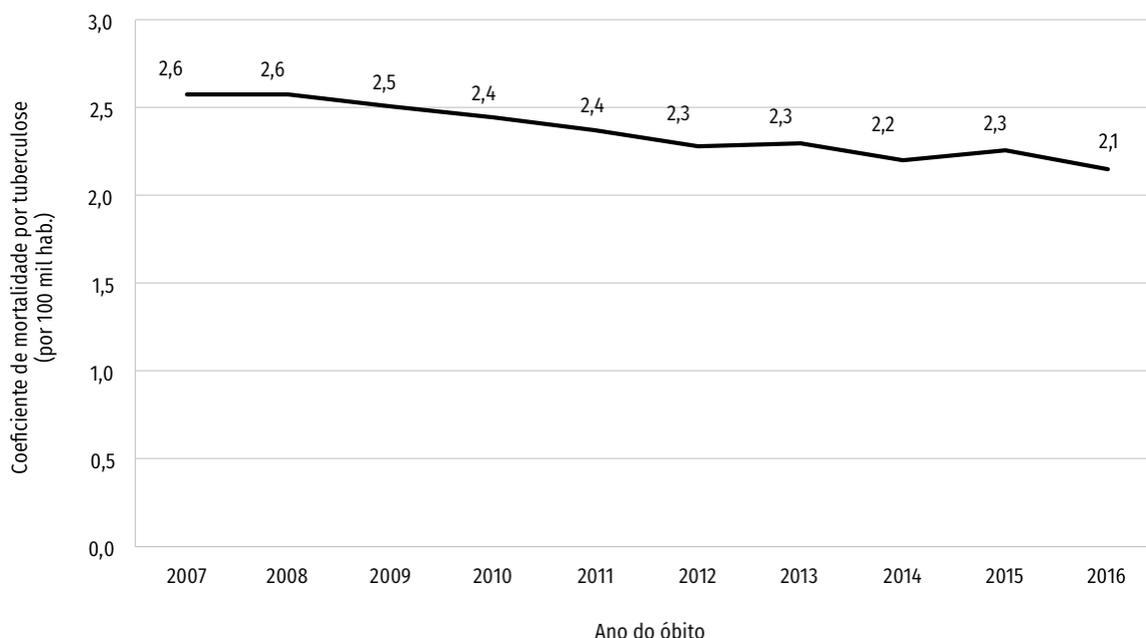


Figura 4 - Coeficiente de mortalidade por tuberculose (por 100 mil habitantes), Brasil, 2007 a 2016 (Brasil, 2018).

Dos casos novos de TB pulmonar notificados em 2016 no Brasil, 36,2% realizaram tratamento diretamente observado (DOTS). O percentual de cura nesse ano foi de 73%, maior que o valor encontrado no ano de 2015 e 2017. Os maiores percentuais de cura se concentraram nos estados do Acre (84,2%), São Paulo (81,6%) e Amapá (81,7%). Em relação as capitais, Macapá (86,1%) apresentou o maior percentual e Campo Grande (10,9%) o menor. Quanto ao abandono do tratamento, em 2016, o percentual foi 10,3%, acima da meta estipulada pela OMS (<5,0%). Acre (4,1%), Tocantins (4,3%) e Piauí (4,6%) foram os únicos estados que tiveram percentuais abaixo da meta. Por outro lado, capitais como Porto Velho, Porto Alegre e Florianópolis apresentaram taxas de abandono acima de 20%. A coinfeção HIV/TB foi identificada em 9,2% dos casos novos. Vale ressaltar que em 2017, 10,5% dos novos casos de TB registrados foram em pessoas privadas da liberdade, em quem se estima risco de adoecimento 28 vezes maior do que na população em geral (BRASIL, 2018).

O Rio de Janeiro possui alta taxa de incidência de TB (63,5/100 habitantes), com 10.609 novos casos notificados em 2017 (BRASIL, 2018). Esse alto número de casos está associado a grande aglomeração de pessoas nos centros urbanos, muitas vezes alocadas em regiões com infraestrutura deficitária, com condições precárias de sobrevivência. As taxas de coinfeção HIV/TB foram maiores em 2012

(10,6%) em relação a 2008 (8,8%), o que deixa claro uma evolução na detecção do HIV pelos testes sorológicos (BEVILAQUA *et al.* 2014).

1.1.4 Susceptibilidade, patogenicidade e imunopatologia da tuberculose

Em geral, a infecção por *Mtb* tem seu início por via respiratória a partir da inalação do agente patogênico, eliminados em aerossóis de fluidos biológicos, por pessoas que albergam TB ativa (BERMEJO *et al.*, 2007), e pode evoluir ou não para a abertura de um quadro de doença clínica. As partículas infectantes suspensas no ar ficam ressecadas ao serem expostas a fatores físicos como o vento e aos raios solares e adquirem tamanhos reduzidos contendo de um a dois bacilos, o que torna fácil sua inalação e sua possível chegada ao pulmão.

Antes de atingirem os alvéolos pulmonares, os bacilos inalados precisam ultrapassar os mecanismos inespecíficos naturais do trato respiratório, como os pelos nasais, refluxo da tosse, disposição angular das vias aéreas e o mecanismo de depuração mucociliar, bem como a resposta imune do hospedeiro (CAPONE 2006; ROCHA *et al.* 2008; GIDEON; FLYNN, 2013; STAM *et al.* 2015). Ultrapassando esses obstáculos se instalam no pulmão ou se disseminam, via hematogênica, podendo infectar outros órgãos e tecidos (HIJJAR; CAMPOS; FEITOSA, 2005). Assim, a partir de um foco pulmonar ou ganglionar, a infecção por *Mtb* pode evoluir para a doença conhecida como TB primária ou primo-infecção.

O que determina a progressão da doença micobacteriana é o confronto entre as características do patógeno como virulência, carga bacilar e, fatores que o habilitam a tentar superar as defesas e as propriedades imunológicas do hospedeiro, que garantem sua resistência a partir de uma resposta inflamatória. Assim que atinge o pulmão, o bacilo entra em contato com as células do sistema imunitário, como macrófagos alveolares ou células dendríticas, capazes de realizar fagocitose e desencadear o processo de inflamação, visando destruir o agente patogênico a partir de uma resposta imune inespecífica (HIJJAR; CAMPOS; FEITOSA, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, BEHLER *et al.*, 2012).

Cerca de 50% dos indivíduos infectados conseguem eliminar o bacilo diretamente pela resposta inata, entretanto, caso isso não ocorra, em parte a infecção pode ser controlada pelo segregamento da bactéria nos focos granulomatosos (SHALER *et al.*, 2013).

A TB secundária ou pós-primária se dá por reativação do foco primário (devido a uma imunossupressão) ou por re-infecção exógena (o paciente entra novamente em contato com Mtb). Com a evolução da infecção, há formação de novos granulomas que levar a formação de áreas necrosadas, gerando pontos de lesão no pulmão. Nos pacientes com melhores condições de saúde e imunitária, a lesão se cicatriza levando sua cura (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

1.1.5 Resposta imune na tuberculose

1.1.5.1. Células participantes

Por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs - pattern recognition receptors) que identificam de padrões moleculares associados a patógenos (*PAMPs* - *pathogen-associated molecular patterns*), macrófagos alveolares fagocitam Mtb ao entrar em contato com os pulmões após conseguir ultrapassar as barreiras naturais do trato respiratório do indivíduo, que age retendo alguma fração da carga bacilar. Esse evento leva ao recrutamento de células imunitárias para o sítio de infecção, sendo estas células dendríticas (DC), neutrófilos e monócitos. Posteriormente, a resposta adaptativa se inicia quando as células se dirigem aos gânglios linfáticos ativando linfócitos T antígenos-específicos que, por meio da corrente sanguínea retronam ao pulmão para auxiliar no controle do bacilo (HANEKOM et al., 2007; GIDEON; FLYNN, 2013; FOGEL, 2015; STAM *et al.*, 2015; KORB *et al.*, 2016) (figura 5).

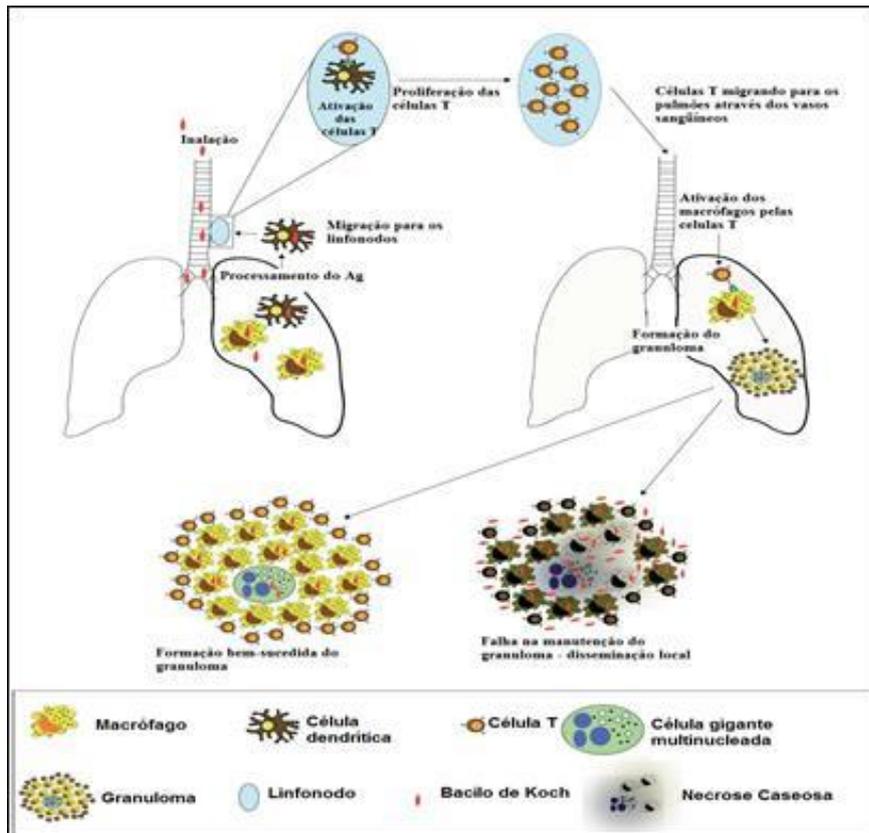


Figura 5 - Principais eventos da resposta imune inata e adquirida que ocorrem na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* após sua inalação pelo hospedeiro. Adaptado de Hanekom *et al.*, 2007.

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa ao Mtb, envolvendo outras células além das fagocíticas. As células *natural killer* (NK), capazes de combater patógenos intracelulares, tem capacidade de destruir o bacilo e os macrófagos infectados com os mesmos, bem como capacidade rápida de produzir a citocina IFN- γ , fundamental na resposta imune à TB (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002; RAJA, 2004; PERERA *et al.*, 2012).

A imunidade celular é fundamental para uma resposta imune eficaz contra Mtb, onde as células T tem um importante papel na imunidade específica ao bacilo (DUARTE *et al.*, 1997; LYDYARD, 1997; SARDELLA, 2014). A forma $\gamma\delta$ do receptor de antígenos de células T (TCR) é capaz de reconhecer Ags micobacterianos proteicos e não proteicos associados a moléculas CD1 (*Cluster of Differentiation*), células CD4CD8^{-/-} TCR $\alpha\beta$ CD1-restritas, o que já foi demonstrado em vários estudos *in vivo* e *in vitro* (JANIS *et al.*, 1989, PORCELLI; MORITA; BRENNER, 1992; CONSTANT *et al.*, 1994; TANAKA *et al.*, 1995; KAUFMANN, 1996). Comumente, moléculas CD1 apresentam Ags micobacterianos a células T, que existe em grande

quantidade em DC. Já foi relatado que Ags não-proteicos são reconhecidos por células T $\gamma\delta$, porém, sem apresentação (KAUFMANN *et al.*, 2007).

É fundamental no combate ao Mtb que os linfócitos T CD4+ atuem realizando a ativação de células através do contato celular ou pela produção de citocinas chaves para o controle da TB, como o IFN- γ . Apesar de não agirem diretamente na apresentação de Ags, mas tão importantes quanto, linfócitos T CD8+ são ativados por células T para eliminar os macrófagos infectados (NORTH; JUNG, 2004; RAJA *et al.*, 2004; COOPER, 2009; SAKAI *et al.*, 2016). Os linfócitos T reguladores (Treg) apresentam duas populações definidas, sendo elas os linfócitos T regulatórios induzíveis periféricamente (iTregs: CD4+CD25+), e os linfócitos T regulatórios naturais (Tregs: CD4+CD25+FoxP3+), ambos produzidos no timo (SAKAGUCHI *et al.*, 2008). Devido sua natureza estar ligada ao perfil Th1, linfócitos Treg estão relacionados à TB ativa (HANEKOM, 2005).

1.1.5.2. A resposta imune inata e a ativação da resposta imune adaptativa

A resposta imune inata é uma defesa inicial do organismo com capacidade de reconhecer patógenos e/ou identificar dano tecidual, objetivando apresentar a presença destes para as células da resposta imune adaptativa.

Entretanto, a restrita proteção à TB conferida pela resposta imune inata pode permitir a multiplicação do bacilo no interior do macrófago e sua disseminação através da corrente sanguínea. Dessa forma, é fundamental que a resposta imune inata e adquirida atuem em conjunto para o controle da TB (MOUTINHO, 2011), e a ligação entre essas duas respostas depende das células apresentadoras de Ags (APCs), tais como macrófagos e DC, que também desempenham um papel importante na diferenciação do perfil pró-inflamatório (Th1) ou antiinflamatório (Th2) de linfócitos T auxiliares (HICKMAN; CHAN; SALGAME, 2002).

A TB é uma infecção em que a imunidade protetora e a hipersensibilidade tardia patológica coexistem. Mtb não tem como característica produzir exotoxina ou endotoxina e, portanto, as lesões teciduais decorrentes da doença são, em grande parte, causadas pela resposta imune do hospedeiro (APPELBERG, 1992).

1.1.5.3. A resposta imune celular na tuberculose

Com o desenvolvimento da resposta imune adquirida após a migração dos linfonodos para o pulmão, que ocorre de 6 a 8 semanas após a infecção, linfócitos T CD4+ e T CD8+ são ativados e iniciam a produção de IFN- γ , principal citocina de perfil Th1 atuante na infecção por Mtb, uma vez que, tem capacidade de aumentar a ação citolítica dos macrófagos levando a liberação de óxido nítrico e consequentemente promovendo a acidificação e maturação do fagossomo (ORME; COOPER, 1999; TSENOVA *et al.*, 1999; EHLERS, 2003). Entretanto, Mtb apresenta mecanismos, na parede celular, de evasão da resposta imune do hospedeiro, com capacidade de bloquear a união dos lisossomos e fagossomas, contribuindo para a sobrevivência do bacilo no interior dos macrófagos (MOUTINHO, 2011). O TNF é outra citocina produzida por macrófagos e células T que, além de possuir propriedades imunoregulatórias, detém papel importante no sítio de infecção, atuando na ativação de macrófagos, formação e sustentação do granuloma. A imunidade contra o bacilo depende, também, de citocinas e quimiocinas, tais como IL-1, IL-6 e o fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófago (GM-CSF) (MOUTINHO, 2011; SILVA *et al.*, 2015; KORB *et al.*, 2016). A IL-12 é outra importante citocina, que é produzida após macrófagos e DC fagocitarem Mtb, que além de ser indutora da produção de IFN- γ , apresenta papel fundamental no controle da infecção (FLYNN; CHAN, 2001; FOGEL *et al.*, 2015). Outras citocinas pró-inflamatórias e quimioquinas, tais como IL-6, CCL2 e CXCL10 também são induzidas no local da infecção. As quimioquinas produzidas recrutam células NK, neutrófilos, Linfócitos T CD4, T CD8, T $\gamma\delta$ e B para a região infectada (DELOGU *et al.*, 2013; KORB *et al.*, 2016).

A IL-2 (fator de proliferação de linfócitos) promove a proliferação de linfócitos T e B específicos em resposta a um determinado antígeno, evidenciando um importante papel no desenvolvimento da resposta imune. A IL-2 produzida por células T CD4+ atua no curso da infecção por micobacterias induzindo uma resposta do tipo Th1 (BLANCHARD, 1989; RAJA, 2004).

A participação de citocinas do perfil Th2, como a IL-4, pode estar relacionado a evasão de Mtb do sistema imune do hospedeiro, entretanto, ainda não está totalmente elucidado se a presença dessa citocina é a principal causa de reativação da TB ou uma decorrência da progressão da doença ativa (SILVA *et al.* 2015). Sabe-se que a IL-4 está relacionada principalmente a reações alérgicas, nas parasitoses e

patógenos extracelulares, na TB tem capacidade de suprimir a produção de IFN- γ e ativação de macrófagos (APPELBERG *et al.*, 1992, POWRIE; COFFMAN, 1993). Já foi evidenciado aumento da produção de IL-4 em humanos com TB cavitária, porém, dados do mesmo grupo mostraram que os resultados são inconsistentes, não deixando claro se a IL-4 é causa ou reflexo da TB ativa em humanos (VAN CREVEL *et al.*, 2002). Pacientes com TB pulmonar severa demonstraram aumento da produção de IL-4 (FLYNN; CHAN 2001; KUTLU *et al.* 2007).

A IL-6 é uma citocina produzida no estágio inicial da infecção micobacteriana, apresenta caráter pirogênico, atuando sobre os macrófagos que a secretaram, bem como naqueles ao redor. Na infecção por Mtb tem ação múltipla, uma vez que pode assumir perfil pró e anti-inflamatório, inibindo a produção de citocinas tais como TNF e IL-1 β . Em associação com a produção deficiente de IFN- γ , antes do início da resposta imune celular, esta citocina pode favorecer a susceptibilidade à infecção por Mtb (LAW *et al.*, 1996; GEROSA *et al.*, 1999; SAUNDERS *et al.*, 2000).

A IL10 é produzida por macrófagos alveolares e células T durante a infecção e apresenta perfil anti-inflamatório (ABBAS, 2006). É capaz suprimir resposta Th1, inibindo a produção de IFN- γ , TNF e IL-12, bem como de induzir a produção de IL-4 pelos linfócitos (HIRSCH *et al.*, 1999). O aumento da produção de IL-10 foi, também, correlacionado com a ineficácia da vacinação BCG em humanos (FERRAZ *et al.*, 2006).

O papel da IL-17 na resposta inflamatória ainda é pouco elucidado, entretanto, tem sido correlacionado à proteção contra a TB, indicando ter uma participação importante na resposta antimicobacteriana em humanos. É uma citocina pró-inflamatória expressa por linfócitos T de memória, ativados. É produzida, principalmente, por células Th17, uma subpopulação de células T CD4 de perfil pró-inflamatório (KHADER *et al.*, 2007, KHADER; COOPER, 2008, SCRIBA *et al.*, 2008),

O IFN- γ é produzido por diferentes tipos celulares e desempenha uma ação protetora na TB muito bem definida. O principal papel dessa citocina é promover a ativação de macrófagos infectados para desempenhar sua função microbicida, com a produção de reativos de oxigênio e de nitrogênio, capazes de eliminar o bacilo (RAJA, 2004; HOUBEN; NGUYEN; PIETERS, 2006). Estimula a produção de TNF pelo macrófago, citocina fundamental para a formação do granuloma e para conter a infecção (FLYNN *et al.*, 1995; ROACH *et al.*, 2002). Principalmente no início da infecção por Mtb, macrófagos ativos, células T e células CD1-restritas também produzem IFN- γ (FLYNN; CHAN, 2001). Células NK também detém a capacidade de

secretar IFN- γ na resposta imune inata na TB, seja em resposta a IL-12 e IL-18 ou por contato direto com produtos micobacterianos (LHO *et al.*, 1999). A avaliação da produção *in vitro* de IFN- γ antígeno-específica tem sido apontado como promissora para auxiliar no diagnóstico da TB (VAN CREVEL *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2014; LIAO *et al.*, 2014), sendo utilizado inclusive em testes comerciais disponíveis atualmente e autorizados pela OMS para testar a infecção latente (WHO, 2017)

Uma das funções fisiológicas do TNF é participar do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local de infecção, ativando essas células visando destruir o patógeno. É produzido por diversos tipos celulares, tais como macrófagos, linfócitos T, células NK, mastócitos e fagócitos mononucleares ativos (ABBAS, 2006). Na TB, atua ativando macrófagos no local de infecção e na formação e sustentação do granuloma (MOUTINHO, 2011; SILVA *et al.*, 2015).

1.1.5.4. A resposta imune humoral na tuberculose

Embora, por muito tempo, a imunidade contra a TB tenha sido atribuída, principalmente, a uma resposta imune celular, essa visão tem sido alterada nos últimos anos. A resposta imune humoral ultimamente tem recuperado sua importância como um mecanismo significativo na proteção à TB (DUNLAP; BRILES, 1993; GLATMAN-FREEDMAN; CASADEVALL, 1998; GLATMAN-FREEDMAN, 2006). Estudos sugerem que linfócitos B e anticorpos para patógenos intracelulares podem atuar na proteção à TB por diversas vias, uma vez que atuam na opsonização do bacilo ativando o sistema complemento e favorecendo a fagocitose pelos macrófagos e contribuindo para a ação citotóxica dos linfócitos, bem como sinalização através dos receptores Fc (FcR) e modulação da resposta inflamatória do hospedeiro (ACHKAR *et al.*, 2015).

Durante a infecção latente, o sistema imunológico promove uma intensa resposta protetora mediada por células visando conter a disseminação bacilar. Conforme ocorre a evolução para a doença ativa, a resposta humoral predomina, uma vez que, *Mtb* pode ser encontrado no meio extracelular tecidual, favorecendo um possível contato com linfócitos B e Ac. Por outro lado, a resposta celular tende a diminuir (DAVIDOW *et al.*, 2005; CASADEVALL; PIROFSKI, 2006; DEMKOW *et al.*, 2006).

As células B podem atuar de várias maneiras durante a resposta imune ao bacilo e a modulação entre as respostas celular e humoral está fortemente associada ao aspecto clínico da doença (MAGLIONE; CHAN, 2009). Assim, essas células podem exercer a função de células apresentadoras de Ags e interagindo com células T, levando a proliferação e maturação de linfócitos B, troca de classe por afinidade e o desenvolvimento de células B de memória e células do plasma produtoras de Ac. A produção de citocinas pelas células B podem modular funções do sistema imunológico, principalmente de células T e APCs. A produção de Ac modula a inflamação e pode atuar tanto na resposta imune inata, como na resposta celular. A produção de Ac pode promover ou inibir a ativação de células T e APCs (Figura 6) (CHAN *et al.*, 2014).

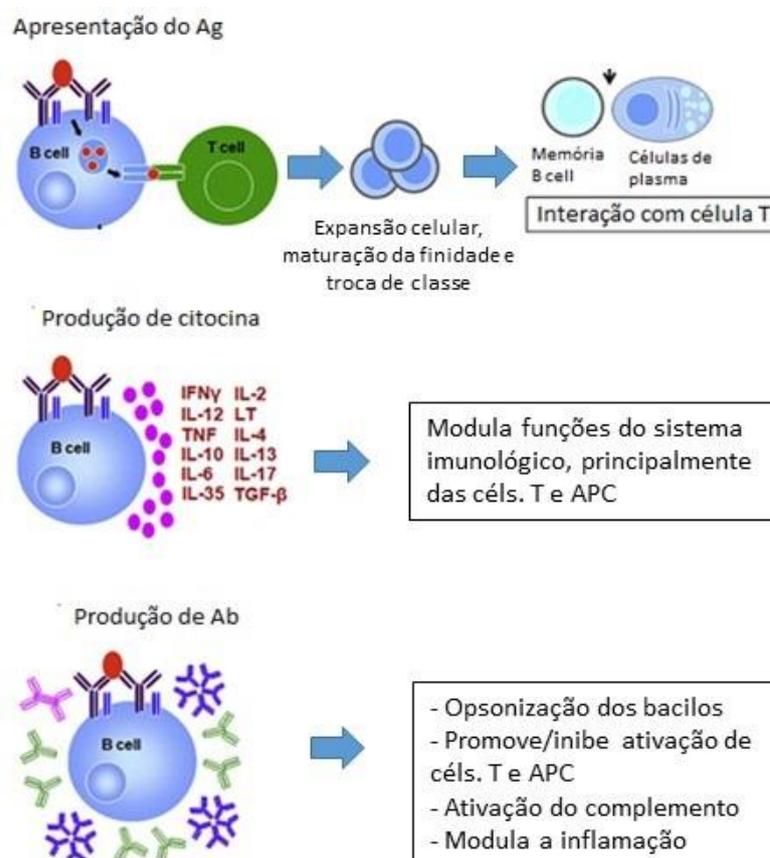


Figura 6 - Os mecanismos pelos quais as células B atuam na resposta imune ao *Mycobacterium tuberculosis*. IL: interleucina; TGF: fator de crescimento transformador; TNF: factor de necrose tumoral; APC: célula apresentadora de antígeno; Ab: anticorpos: ●: antígeno *Mtb*; Y: IgG; Duplo Y: IgA dimérica; Múltiplos Y: IgM pentamérica; Duplo Y: receptor de células B. Adaptado de Chan *et al.*, 2014.

Durante a forma crônica da TB, onde ocorre a contenção dos bacilos ainda existentes nos tecidos pulmonares, células B ativas persistem no sitio de infecção

promovendo a imunidade do hospedeiro contra as micobacterias ainda existentes naquele local, o que auxilia na proteção a uma reatividade endógena. É fato que as células B atuam como apresentadoras de Ags e já foi relatado associação entre células T e B no pulmão de humanos e murinos infectados com Mtb (ULRICHS *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2006; MAGLIONE *et al.*, 2007; MAGLIONE; CHAN, 2009).

Todas as funções que as células B podem efetuar faz com que essas células promovam efeito sobre linfócitos T, no entanto que, estudos revelaram a importante atuação de linfócitos B na evolução da resposta imune, bem como, na regulação dos linfócitos T de memória (MAGLIONE; CHAN, 2009; CHAN *et al.*, 2014). Há relatos sobre a regulação indireta das funções de células T por células B, processo na qual outros elementos da resposta celular atuam simultaneamente com Ac que combatem o Mtb. Ac atuantes na resposta inata e adaptativa foram observados em indivíduos que apresentavam vacinação com a BCG (ACHKAR *et al.*, 2015).

O conceito de que a estrutura do Ac, sua quantidade expressa e o status imunológico do indivíduo determinam a eficiência da imunoglobulina já está bem definido. Um dos Ac a serem liberados na fase inicial da TB é a imunoglobulina M (IgM) que tem sua produção diminuída parcialmente com o progresso da infecção (FENG *et al.*, 2014).

A IgA é uma grande promotora da resposta inflamatória e está relacionada à resposta protetora em mucosas, combatendo principalmente bactérias e vírus infectantes do trato respiratório, gastrointestinal e genitourinário (LEGESSE *et al.*, 2013). Estudos com modelos murinos infectados com Mtb evidenciaram que IgA específica promove diminuição da carga bacilar (CHIN *et al.*, 2015), bem como associação da resposta protetora anti micobacteriana e a produção de IgM, IgG, IgG1, IgG3 e IgA (ACHKAR *et al.*, 2015). Em um cenário onde ocorre contato do bacilo com a mucosa respiratória, a IgA se torna um componente importante, uma vez que, a forma de contágio da TB é pela via aérea.

Por outro lado, a imunoglobulina G (IgG) específica tem papel fundamental na resposta contra o microorganismo. Tem sua produção aumentada nas fases mais tardias da doença. Estudos envolvendo humanos sugerem as subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) como possíveis marcadores na detecção da TB (MATTOS *et al.*, 2016). Porém, não está totalmente claro o papel protetor dos Ac na infecção por Mtb, embora sejam amplamente estudados como biomarcadores específicos para o diagnóstico da TB, entre outras doenças infecciosas.

As alterações quanto ao estado fisiológico do hospedeiro infectado com *Mtb* já foram descritas por alguns autores. Essas mudanças conferem ao bacilo adaptar-se à imunidade do hospedeiro, que conta com a produção de Acs, onde cada um é produzido de forma particular e específica para os diferentes Ags de *Mtb* e para cada estágio da doença. Assim, é de grande importância a investigar a resposta imune humoral e sua possível utilização no diagnóstico da TB (TEITELBAUM *et al.*, 1998; DAVIDOW *et al.*, 2005; DEMKOW *et al.*, 2006).

1.1.6 Tuberculose Pleural

A tuberculose pleural é a mais frequente manifestação de TB extrapulmonar (LIU *et al.*, 2016), somando 42% desses casos (GOMES *et al.*, 2014). Como efeito do processo inflamatório de hipersensibilidade tardia decorrente da presença de Ags micobacterianos no espaço pleural, ocorre o derrame pleural (figura 7) que pode se apresentar com sintomatologia aguda de febre, dor torácica, tosse predominantemente seca e diferentes graus de dispneia, dependendo diretamente do volume do derrame pleural e de seu tempo de instalação. Após a ruptura de um pequeno foco caseoso pulmonar na região sub pleural, os bacilos podem entrar no espaço pleural por proximidade da lesão pulmonar, por ruptura do gânglio mediastinal ou por disseminação hematogênica/linfática, ocasionando uma reação de linfócitos T, com liberação de diferentes citocinas, facilitando o acúmulo de líquido no espaço pleural e a formação de granulomas. Assim, a ruptura de um granuloma pulmonar com liberação de bacilos próximo a pleura representa o início da patologia da TBpl (GOPI *et al.*, 2007; FANLO; TIBERIO, 2007; GETAHUN *et al.*, 2007; BETHLEM, 2012).

Os derrames pleurais são geralmente classificados como transudatos ou exsudatos, com base no mecanismo de formação de fluidos e na química dos fluidos pleurais. Os transudatos resultam de um desequilíbrio nas pressões oncótica e hidrostática, enquanto os exsudatos são o resultado da inflamação da pleura ou da diminuição da drenagem linfática, como ocorre nos casos da infecção por *Mtb* (SILVA, MACEDO, 2003) (Figura 7).

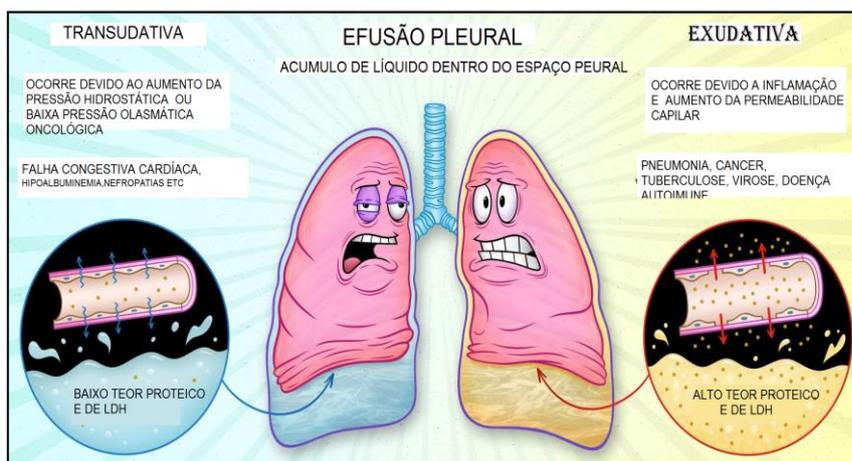


Figura 7 - Representação esquemática da efusão pleural transudativa e exudativa causada por diferentes patologias, inclusive por infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (adaptado de Muniz, J. em <https://medcomic.com/medcomic/pleural-effusions-transudate-vs-exudate/>)

O derrame pleural tuberculoso predomina em adultos jovens (20-40 anos). Entretanto, pode comprometer qualquer faixa etária e, à medida que se evidencia uma melhora epidemiológica das taxas de prevalência e de incidência da enfermidade, o derrame pleural tende a se exteriorizar nos pacientes mais idosos. Valdés *et al.* encontraram 62,2% de pacientes menores que 35 anos com derrame pleural tuberculoso (VALDES *et al.*, 1995).

Apesar de sua frequência, TBpl continua sendo um desafio para o diagnóstico devido à natureza paucibacilar dos espécimes biológicos dos pacientes, necessitando de procedimentos invasivos, que não são isentos de complicações, são relativamente dispendiosos e demandam tempo (TRAJMAN; PAI; DHEDA, 2008; LEE *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013; MELDAU *et al.*, 2014). Embora, os testes microbiológicos convencionais, como a microscopia e a cultura, sejam considerados padrão-ouro, na TBpl eles apresentam limitações como menos sensíveis e moroso, respectivamente (GILL *et al.*, 2013). A histopatologia da amostra de biópsia pleural também é usada algumas vezes para confirmar o diagnóstico de TBpl, no entanto, é invasivo e não consegue diferenciar entre Mtb e micobactérias não tuberculosas ou outras causas de granuloma (HASANEEN *et al.*, 2003).

A ADA é uma denominação genérica dada a um grupo de enzimas com pesos moleculares distintos, mas que possuem uma função química semelhante no metabolismo das purinas. A ADA cataliza, na presença de água, a conversão da adenosina e da desoxiadenosina em inosina e desoxinosina e nesta reação, libera amônia (STIEHM *et al.*, 1997). A atividade da ADA está aumentada em todas as situações em que linfócitos têm maior participação, como nas infecções causadas

por microorganismos intracelulares, em doenças inflamatórias e em neoplasias hematológicas. No entanto, foi demonstrado que a atividade da ADA está especialmente elevada no derrame pleural tuberculoso (OCAÑA *et al.*, 1983 STRAKINGA *et al.*, 1987; GAKIS *et al.*, 1994).

Com base na fisiopatologia da TBpl, que representa uma grande reação imunológica em que uma vasta categoria de citocinas e quimiocinas que estão fortemente envolvidas, a avaliação de biomarcadores no FP configura uma alternativa atraente para o diagnóstico de TBpl (SHIMOKATA *et al.*, 1991; NEMETH, 2009; SUTHERLAND *et al.*, 2012). Até o momento, a ADA no FP é considerada um marcador útil e de baixo custo para o diagnóstico de TBpl, sendo usado rotineiramente em regiões de alta prevalência da doença (GOPI *et al.*, 2007), embora não específica para a TBpl (LIGHT, 2010). A dosagem de IFN- γ também tem sido utilizada e tem potencial para auxiliar no diagnóstico da TBpl. Entretanto, seus resultados devem ser interpretados juntamente com os achados clínicos, microbiológicos e resultados da biópsia pleural e ADA (GRECO *et al.*, 2003).

1.1.7 Testes imunoenzimáticos como ferramenta de diagnóstico para tuberculose

Na década de 60, os testes imunoenzimáticos obtiveram destaque na imunohistoquímica. Em 1970, o ensaio de ELISA foi incorporado por grupos de pesquisa da Universidade de Estocolmo (Suécia) pelos pesquisadores Pedro Perlmann e Eva Engvall e na Holanda pelos pesquisadores Anton Schuurs e Van Bauke Weemen. É uma metodologia baseada na detecção de anticorpos específicos com potencial importância para o diagnóstico de diversas doenças (LEQUIN, 2005). É um ensaio rápido, simples, de baixo custo, fácil operacionalidade e que pode ser formatado em tipo *POC*, favorecendo de forma rápida o diagnóstico. Utilizam espécimes clínicos de fácil obtenção e menos invasivos, como soros, plasma e outros fluidos corporais. Devido à característica heterogênea da resposta promovida por Ac, não há ainda um teste comercial reconhecido pela OMS como potencial diagnóstico da TB, porém, esta metodologia já foi bem definida para o diagnóstico de diversas outras doenças (ACHKAR *et al.*, 2011). Outro problema se concentra na possível associação de divergências do reconhecimento antigênico em diversas

regiões do planeta, o que pode estar relacionada ao background genético dos indivíduos (LYASHCHENKO *et al.*, 1998, MULINARI, 2016).

Vários pesquisadores têm defendido a utilização do ELISA como um teste favorável para o diagnóstico da TB. Diversos estudos já investigaram o uso de Ags de Mtb em diferentes configurações, testados unicamente ou em conjunto, como por exemplo, antígenos proteicos purificados e recombinantes (CHAN *et al.*, 2000). O sequenciamento de todo o genoma micobacteriano trouxe novas esperanças de se obter marcadores acurados com potencial para compor novas metodologias diagnósticas e moléculas candidatas ao desenvolvimento de novas vacinas. Dessa forma, é fundamental que novos Ags sejam identificados, testados, validados e propostos ao diagnóstico em caso de satisfatória acurácia (MULINARI, 2016).

1.1.8 Antígenos com relevância para o estudo no diagnóstico da tuberculose

O Ag MPT-64 (Rv1980c) é uma proteína de 24kDa, secretada abundantemente durante o crescimento micobacteriano, e expressa pelas cepas virulentas do complexo Mtb (ANDERSEN *et al.*, 1991; LI *et al.*, 1993; OETTINGER, ANDERSEN, 1994; BAI *et al.*, 2008). A proteína MPT64 possui 687 pb, sintetiza 228 aminoácidos, é codificada por gene presente na região de diferença RD2, que está ausente na maioria das cepas BCG; é imunogênica e capaz de induzir forte hipersensibilidade do tipo tardia.

A proteína MT10.3 (ES6.9, TB10.3, Rv3019c), com cerca de 10.3 kDa, é codificada pelo gene EsxR e expressa durante a infecção e multiplicação do bacilo (SKJOT *et al.*, 2002; DAVIDOW *et al.*, 2005), induz resposta imune celular por IFN- γ em pacientes com TBpul (TAVARES *et al.*, 2006). KAISERMANN *et al.* (2005) identificaram reatividade de IgA ao MPT-64 e MT-10.3 em pacientes com TBpl, com sensibilidade de 72% e especificidade de 96%, sugerindo que estes Ags têm potencial imunodiagnóstico na TBpl.

Considerando a heterogeneidade da resposta imune na TB, a utilização de Ags fusionados em testes diagnósticos se constitui em uma estratégia interessante para aumentar a acurácia e simplicidade desses testes, embora ainda com aplicabilidade limitada. A fusão MT10.3:MPT64 de peso molecular 36 kDa, construída em nosso laboratório, utilizando as sequências gênicas Rv3019c (MT10.3) e Rv1980c (MPT64), mostrou-se promissora no auxílio do diagnóstico da

TBpl, apresentando alta acurácia (ARAUJO *et al.*, 2010), porem os espécimes estudados eram os mesmos do estudo anterior (KAISERMANN *et al.*, 2005), e não foi validada em nova coorte.

A fusão dos Ags ESAT-6:CFP10, demonstrou similar reatividade quando comparada aos mesmos Ags testados isoladamente (HOFF *et al.*, 2007) e são os Ags base para os ensaios de IGRA.

A quimera proteica F2 foi confeccionada em nosso laboratório, e é constituída de um fragmento de 348 nucleotídeos do gene Rv1980c (MPT64) inserido no meio da sequência do Ag MT-10.3 (MT10.3_(1M-40S): MPT64M_(91L-205A): MT10.3_(41S-96)), com peso molecular 24,7 kDa, forneceu resultados promissores por ELISA na detecção de IgA, discriminando os grupos TBpul e controle (SARDELLA, 2015).

Pouco se sabe sobre os antígenos codificados pela RD11, dentre os quais, a proteína PPE59 de 19,8 kDa, codificada pelo gene *rv3429*. As PE (Pro-Glu) e PPE (Pro-Pro-Glu) são duas famílias de genes responsáveis por cerca de 10% do genoma de Mtb, com 99 e 69 membros, respectivamente (COLE *et al.*, 1998b). A família PE e PPE têm um N-terminal conservado, com cerca de 110 e 180 resíduos de aminoácidos e um terminal C que varia de forma significativa em sequências e tamanhos (BOTTAL; BROSCHE, 2009; DENG; XIE, 2012). Genes PE/PPE têm sido fortemente associados a vários aspectos das interações patógeno-hospedeiro, como a variabilidade antigênica, virulência e persistência do bacilo (COLE *et al.*, 1998b, KARBOUL *et al.*, 2008). A variação antigênica foi associada a capacidade de certos agentes patogênicos microbianos de se evadir do sistema imune. (MEYER; GIBBS; HAAS, 1990; GILSDORF, 1998). Até o presente momento, não se sabe a real função da PPE59 no metabolismo ou seu papel na evolução clínica da infecção por Mtb, mas sabe-se que é capaz de induzir resposta mediada por células, por IFN- γ e interleucina-10, bem como imunodominância de IgA em soro de pacientes com TBpul (AL-ATTIYAH; MUSTAFA, 2008; CHEN *et al.*, 2009; MULINARI, 2016). Reatividade mais elevada de IgA-PPE59 e menor de IgG em pacientes com TBpul foram demonstradas (MULINARI, 2016).

O Ag 38 kDa (*phoS*, *phoS1*, Rv0934 ou PstS-1 e Ag 5) é uma lipoproteína secretada por Mtb, atuando também como receptor de transporte de fosfato na superfície celular. É secretado ativamente por micobactérias em meio com déficit de fosfato (HARBOE; WIKER, 1992). Recentemente foi caracterizada como uma adesina da parede celular de Mtb ligando-se especificamente a receptores de manose do macrófago, promovendo a fagocitose (ESPARZA *et al.*, 2015). É

altamente imunogênica, pois, contém epítomos específicos de Mtb e é antigênica para células T humanas. Abebe *et al.* (2017) descreve produção discriminatória de IFN- γ na TBpul x LTBI e este x indivíduos expostos ao Mtb, em ensaios de células do sangue periférico estimuladas com este antígeno. Estudos demonstraram que o 38 kDa combinado ao Ag CFP-10 induziu, significativa, diferencial resposta de INF- γ em TB e controle, com teste cutâneo tuberculínico (PPD)+ x PPD- (TAVARES *et al.*, 2007). A construção da proteína de fusão PstS-1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 foi realizada por Araujo *et al.* (2014) e consiste na sequência de 267 pb da extremidade terminal (285-374) do gene *Rv0934* (nº de acesso GenBank CCP43682.1) e a sequência completa do gene *Rv3874* (nº de acesso GenBank CCP46703.1), que codifica o antígeno CFP10 com 300 pb e demonstrou potencial na identificação de LTBI (ARAUJO *et al.*, 2014).

1.1.9 Métodos diagnósticos

A detecção precoce do indivíduo doente e seu rápido e completo tratamento são medidas eficientes que devem ser implementadas no sistema público de saúde para o controle da TB (GARG *et al.*, 2003; SCATENA *et al.*, 2009).

O diagnóstico da TB é basicamente realizado pelos aspectos clínicos apresentados pelo indivíduo infectado, mas este diagnóstico é complexo, uma vez que, a sintomatologia da doença é comum a outras enfermidades e a eficácia do diagnóstico radiológico se concentra nos quadros avançados da doença. Aproximadamente 26,7% dos pacientes adultos no Brasil são tratados sem confirmação laboratorial, com base apenas no quadro clínico-radiológico (HIJJAR; CAMPOS; FEITOSA, 2005; CONDE *et al.*, 2000; NAHID *et al.*, 2006). Tanto a radiografia de tórax (R-X) como a tomografia de tórax (TC) são métodos utilizados para o diagnóstico por imagem. Geralmente, a primeira avaliação de TB, bem como seu devido acompanhamento nos casos pulmonares é realizada pelo R-X, entretanto, casos sugestivos devem ser confirmados pelos métodos laboratoriais (SILVA Jr, 2004). A TC, por ser um método mais oneroso e restrito a unidades de saúde mais equipadas, só é utilizada em casos particulares, como na TB extrapulmonar e TB miliar (BOMBARDA *et al.*, 2001; CAPONE, 2006).

Ainda hoje, os métodos laboratoriais mais utilizados são os microbiológicos. A baciloscopia é simples, rápida, e pouco onerosa, porém apresenta menor

sensibilidade (60-70%) e especificidade em relação a cultura, bem como baixa sensibilidade nos casos paucibacilares ($\leq 50\%$). A técnica de Ziehl-Neelsen identifica bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR), mas não é capaz de diferenciar Mtb de outras micobactérias e outros microrganismos como *Nocardia*, o que confere a esse teste menor sensibilidade (GARG *et al.*, 2003; KALRA *et al.*, 2010; TERAN; WAARD, 2015).

A cultura para Mtb é um método mais complexo e sensível (80 %), porém laborioso e moroso (YEAGER *et al.*, 1967). É definido como o padrão-ouro para o diagnóstico da TB, por permitir o isolamento do bacilo e realização de teste de susceptibilidade as drogas utilizadas no tratamento, confirmando o diagnóstico. O meio de cultura sólido à base de ovo Lowenstein Jensen (LJ) é comumente empregado nesse método, embora hajam outros meios sólidos comercialmente acessíveis, como Middlebrook 7H10 e o 7H11. O grande problema da cultura é o longo tempo para a aquisição dos resultados, variando de 4 a 8 semanas. Embora apresentem maior taxa de contaminação, existem meios líquidos como Middlebrook 7H9 e 7H12 que diminuem esse tempo para até 14 dias, o que fez a OMS recomendar a utilização dos dois tipos de meios em conjunto, sólido e líquido, para o isolamento de Mtb (CASTELO FILHO *et al.*, 2004; TERAN; WAARD, 2015).

Desde o fim do século XIX quando foi desenvolvido por Robert Koch como “*old tuberculin*”, o teste cutâneo a tuberculina (TCT) ou teste do PPD ou teste de Mantoux é utilizado para detectar infecção por Mtb. O PPD é uma mistura de antígenos que são compartilhados por diversas micobactérias (SHINGADIA; NOVELLI, 2008; YANG *et al.*, 2012). O princípio do teste se baseia na técnica de Mantoux, na qual é realizado uma inoculação intradérmica de 2 unidades da tuberculina PPD RT23 (0,1 mL) na parte anterior do antebraço. O resultado é obtido após 48-72h por mensuração do diâmetro da induração, que é formado no local do antebraço onde foi inoculado. A reação ao PPD se dá por resposta de sensibilidade tardia por linfócitos T de memória e identifica uma exposição anterior ao bacilo. Entretanto, é um teste que não é capaz de diferenciar indivíduos infectados de TB ativa, devido à reação cruzada com outras micobactérias, o que leva a uma redução da especificidade do teste. O teste pode apresentar resultado falso-positivo em pessoas vacinadas recentemente com a BCG (ou vacinados três anos anteriores à realização do teste) ou infectadas com micobactérias atípicas. Pode apresentar ainda resultado falso-negativo em pessoas malnutridas, com coinfeção HIV/TB, com dermatoses, sarcoidose, que se encontram em tratamento com corticóides,

doenças linfoides, doença renal crônica, febre tifoide, mulheres grávidas, crianças com menos de 2 anos de vida e pessoas com idade avançada (HIJJAR; CAMPOS; FEITOSA, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; ARIAS GUILLÉN, 2011).

Novas ferramentas baseadas na resposta imune humoral e celular utilizando Ag recombinantes proteicos purificados espécie-específicos de Mtb, tais como os testes sorológicos com os antígenos 38kDa, MPT-64 e Ag85, entre outros, e os baseados na liberação de interferon-gama por células T (“interferon gamma release assays”, IGRA), estimuladas com os antígenos ESAT-6:CFP10 (VAN PINXTEREN *et al.*, 2000; DOHERTY *et al.*, 2002; TAVARES *et al.*, 2007) e, mais recentemente, o PstS₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 (ARAUJO *et al.*, 2014), são alternativas atraentes para o diagnóstico da TB. Vários testes sorológicos têm sido descritos na última década, porém poucos têm sido submetidos a um cuidadoso sistema de avaliação quanto o seu potencial em diferentes populações de área endêmica (PERKINS; KRITSKI, 2002; CHO, 2007). Já os IGRAs, são utilizados na detecção de infecção recente por Mtb em população de risco, inclusive identificando LTBI. Estão disponibilizados no mercado em duas versões: QuantiFERON-TB-Gold In Tube (Cellestis, Victoria, Australia) e T-SPOT.TB (Oxford Immunotec ®, Oxford, United Kingdom) (AMICOSANTE *et al.*, 2010; ARIAS GUILLÉN, 2011) ambos utilizando como principais antígenos o ESAT-6:CFP10. Esses antígenos estão ausentes nas cepas BCG, mas presentes em algumas espécies micobacterianas, *M. kansasii*, *Mycobacterium marinum* (causam doença em pessoas imunocompetente), e *Mycobacterium szulgai* (BELKNAP; DALEY, 2014).

O papel dos IGRAs adaptados ao FP para o diagnóstico de TBpl ainda não foi completamente avaliado. Vários estudos abordando essa linha de pesquisa foram publicados usando um ensaio *enzyme-linked immunospot* (ELISPOT) T-SPOT.TB (T-SPOT.TB, Oxford Immunotec Limited, Reino Unido) ou o ensaio imunoenzimático (ELISA) QuantiFERON-TB Gold *In-Tube* (QFT-GIT; Cellestis Limited, Austrália), ambos são aprovados pela Organização Mundial de Saúde para ser usado apenas para o diagnóstico da TB latente (WHO, 2018), entretanto, existem resultados conflitantes (LEE *et al.*, 2009; LOSI *et al.*, 2007; DHEDA *et al.*, 2009; AGGARWAL *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015a; PANG *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018). Embora seja encontrado uma extensa literatura (SHIMOKATA *et al.*, 1991; NEMETH *et al.*, 2009; OKAMOTO *et al.*, 2005; EL FENNIRI *et al.*, 2011), em relação à avaliação de biomarcadores de TB em FP, já foi demonstrado que linfócitos em derrame pleural por TB apresenta uma expressão aumentada de IFN- γ e isso induz quimiocinas,

como o IP-10 (OKAMOTO *et al.*, 2005; EL FENNIRI *et al.*, 2011; KABEER *et al.*, 2012). Sugere-se que a aplicação de IGRA poderia ser promissora e mostrar valor adjuvante significativo no diagnóstico de pacientes paucibacilares.

Estão disponíveis comercialmente métodos de cultura automatizados que utilizam meios líquidos para detectar Mtb por marcadores de fluorescência, tais como, o MGIT (BD Diagnostic Systems, USA), SeptiChek AFB (BD, USA) e MB Redox (Biotest Diagnostis, USA); sistema semi-automatizado (BACTEC 460TB) e sistema totalmente automatizado (BACTEC 9000 MB e BACTEC MGIT 960) (BD, USA), ESP Culture System II (Trek Diagnostics, USA) e MB/BacT ALERT 3D System (BioMérieux, NC), apresentando maior sensibilidade em relação aos meios sólidos (CASTELO FILHO *et al.*, 2004; TERAN; WAARD, 2015; CUDAHY; SHENOI, 2016).

Recentemente, o ensaio automatizado baseado na amplificação de ácido nucleico, GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA), foi introduzido na identificação simultânea de Mtb e de resistência a rifampicina, associada à mutação no gene *rpoB*, diretamente do espécime clínico. Este método é rápido, mas ainda oneroso e pode fornecer resultado de falsa resistência a droga (VAN RIE *et al.*, 2012). Atualmente foi aprovado para o diagnóstico da TB pulmonar e resistência a rifampicina, inclusive para pacientes TB/HIV. A nova versão do teste molecular rápido, Xpert MTB/RIF Ultra (Ultra), é descrito como mais sensível, particularmente para casos com espécimes clínicos BAAR-/cultura+, espécimes extrapulmonares, principalmente líquido e amostras de crianças (WHO, 2018)

O pulmão é porta de entrada para Mtb, pois esse órgão é o mais acometido, entretanto, a manifestação extrapulmonar da doença também compõe um importante problema de saúde pública, afetando principalmente os linfonodos e a pleura (PORCEL, 2009; BETHLEM, 2012). A TB extrapulmonar constituiu 15% do total de 6,3 milhões de novos casos de TB notificados à OMS em 2016 (WHO, 2017), podendo atingir porcentagens maiores principalmente em populações com imunodeficiência acentuada, como, por exemplo, na coinfeção tuberculose/HIV (SHARMA; MOHAN, 2004; FANLO; TIBERIO, 2007).

1.2 Justificativa

A grave situação da TB no mundo se reflete nas altas taxas anuais de mortalidade. O controle da TB depende do diagnóstico rápido e do tratamento imediato do paciente. Entre as formas extrapulmonares, a TBpl é a mais frequente,

porém seu diagnóstico ainda é restrito, baseando-se em suspeita clínica inicial e contando com testes diagnóstico com baixa precisão e acurácia. Esses fatos retardam o diagnóstico da doença, e o manejo do paciente (CHAN *et al.*, 2000; WHO 2018). O uso de adenosina desaminase (ADA) pode contribuir para um diagnóstico mais eficiente e diferencial da TBpl, embora apresente limitações. Assim, investigações sobre novos marcadores e biomarcadores para auxiliar no diagnóstico rápido da TB são necessárias. Embora ainda não seja recomendada pela OMS, os testes de ELISA para o diagnóstico da TB vêm recuperando seu espaço nos últimos anos e estudos já mostraram um papel importante da resposta imune humoral na TB, destacando a relevância das diferentes classes de imunoglobulinas atuantes na resposta imune humoral.

A resposta de IgG se apresenta significativa a antígenos micobacteriano como ESAT-6 e CFP-10. IgA em resposta ao antígeno 16kDa protegeu camundongos após exposição ao *Mtb*, diminuindo o número de bactérias, demonstrando também papel importante na imunoprevenção de TB (ALVAREZ *et al.*, 2013). Esses achados apontam que os anticorpos são parte fundamental do sistema imune e podem ser usados no melhoramento de vacinas, tratamento, prevenção de diagnóstico da TB.

Mulinari (2016) mostrou que a reatividade de IgA-PPE59 foi maior que IgG em soro de pacientes com TBpul. Considerando que a reatividade combinada dos resultados obtidos com os antígenos MPT64 e MT10.3, em testes imunoenzimático na detecção de IgA de LP de pacientes TBpl, mostraram um aumento da sensibilidade, quando comparados com os resultados dos Ags individualmente (ARAUJO *et al.*, 2010), o diagnóstico da TBpl tem potencial para ser auxiliado por teste simples baseado no ELISA. Portanto se justifica a avaliação de novos candidatos a marcadores nesta patologia. A proteína fusionada MT10.3:MPT-64 foi sensível e específica, porém nunca foi validada em nova coorte de TBpl. Já a quimera proteica F2, bem como a proteína PPE59, embora reativa na TB pulmonar nunca foram avaliadas na TBpl. Para nenhum dos antígenos aqui propostos foi realizada avaliação na detecção de biomarcadores por Ac em soro e líquido pleural. Sendo o soro de mais fácil obtenção e menos invasiva seria uma alternativa para o diagnóstico da TBpl desde que mostrasse adequada acurácia.

Até o momento, embora diferentes kits baseados na resposta imune estejam disponíveis no mercado, nenhum é capaz de diagnosticar precisamente a TB em diferentes áreas endêmicas. Sabe-se que o controle da TB depende de uma

resposta imune celular, com produção de citocinas, principalmente de perfil Th1. Araujo *et al.* (2014) demonstrou que a fusão PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 apresentou potencial similar ao ESA6:CFP10 na detecção da TBpul e LTBI, contudo, não há informações na literatura quanto ao potencial dessa fusão no diagnóstico alternativo da TBpl, bem como, sobre a avaliação de diferentes citocinas na busca de biomarcadores para essa doença. Assim, se justifica avaliar a resposta imune celular por diferentes citocinas produzidas por células mononucleadas do FP (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) estimuladas *in vitro* com PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎/CFP-10 e ESAT6:CFP-10, em pacientes com TBpl e controles.

2 HIPÓTESE

Pacientes adultos com tuberculose pleural e pacientes com outras pleurisas não tuberculosas apresentam diferentes reatividades em distintos testes baseados na resposta imune celular e humoral, pela produção, *in vitro*, de citocinas e de anticorpos contra diversos antígenos recombinantes de Mtb, em espécimes clínicos distintos, revelando potencial diagnóstico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o reconhecimento de antígenos específicos de *Mycobacterium tuberculosis* (MT10.3, MPT64, PPE59, fusão MPT10:MPT64, e nova quimera proteica F2, e ESAT6:CFP-10 e PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎/CFP-10) em pacientes com TBpl, pela detecção de imunoglobulinas e produção de citocinas “*in vitro*” em testes baseados, respectivamente, na resposta imune humoral e celular, investigando possíveis biomarcadores com potencial uso para auxiliar no diagnóstico.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar a imunoreatividade de IgG e IgA em FP e soro de TBpl;
- Validar a proteína de fusão MT10.3:MPT64 para o diagnóstico da TBpl na detecção de IgA.
- Estimar o padrão de reatividade de Ac por técnica dot-ELISA para os antígenos que se mostraram promissores no teste de ELISA convencional.
- Estimar a produção de IFN- γ e outras citocinas produzidas, *in vitro*, por PFMC e PBMC estimuladas com os Ags ESAT6:CFP-10 e PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎/CFP-10.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Deseho do Estudo

Estudo observacional, transversal para avaliação da detecção de imunoglobulinas e produção de citocinas “*in vitro*” em testes baseados na resposta imune humoral e celular, a diferentes antígenos micobacterianos, em fluidos corporais de pacientes com derrame pleural, atendidos na demanda espontânea do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE, Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ). Os experimentos imunológicos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ. Todos os procedimentos seguiram as normas internacionais de biossegurança. Este estudo foi realizado em colaboração com a Dra. Luciana S. Rodrigues, professora adjunta (Patologia Geral) e coordenadora do Laboratório de Imunopatologia (LIP), Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, RJ.

O HUPE oferece 525 leitos e mais de 60 especialidades e subespecialidades. Está localizado no bairro Vila Isabel, Rio de Janeiro, é considerado um dos maiores complexos docentes-assistenciais na área da saúde, é referência numa série de especialidades e importante núcleo nacional de formação de profissionais na área médica. Oferece atendimentos ambulatoriais de referência em diversas áreas da saúde, mantém programas permanentes de atualização e modernização através de recursos captados com projetos desenvolvidos por seus profissionais (HUPE, 2016).

No período de março de 2015 a março de 2017 os pacientes internados para investigação de derrame pleural foram submetidos à coleta de sangue, toracocentese e biópsias da pleura parietal. Os espécimes clínicos FP e soro dos pacientes em investigação para TBpl e outras pleurisas não tuberculosas no HUPE foram aliquotados, estocados a -70°C e posteriormente encaminhados ao LAMICEL onde foram estocados até a utilização para análise de imunoreatividade por IgG e IgA pela técnica de ELISA “*in house*”, para diferentes Ags recombinantes micobacterianos, MT10.3, MPT64, PPE59, a fusão MPT64:MT10, e nova quimera proteica F2. Foram também utilizados para na técnica de Dot-ELISA para IgG- e IgA-MPT64:MT10 e a quimera F2.

No período de Agosto de 2017 até novembro de 2018, pacientes apresentando derrame pleural sob investigação foram submetidos à coleta de

sangue total e FP, cujas PBMC e PFMC foram processadas imediatamente após a coleta e utilizadas em ensaios de estimulação, *in vitro*, com Ags recombinantes de Mtb, ESAT-6:CFP-10, PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎/CFP10 e PPE59. Os sobrenadantes das culturas foram estocados para posterior dosagem de citocinas por Citometria de Fluxo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ, sob o número CAAE: 45780115.6.0000.5259, Número do Parecer: 1.100.772.

4.2 População estudada e seleção dos pacientes

O critério de inclusão foi a presença de derrame pleural com indicação clínica de toracocentese.

Foram incluídas amostras de soro e FP de 75 pacientes com derrame pleural e atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), entretanto, foram utilizadas nos ensaios imunoenzimáticos amostras de 68 pacientes, uma vez que, 7 pacientes foram excluídos por não possuírem diagnóstico confirmado, assim, não podendo ser incluídos em nenhum grupo do estudo.

Pacientes TB pleural (TBpl): 29 adultos (≥ 18 anos) com diagnóstico para tuberculose pleural baseado na presença de manifestações clínicas infecciosas acompanhadas de positividade para ADA (>40 U/L) e/ou positividade para BAAR, visualizados por microscopia ótica dos bacilos corados pela técnica de Zielh Nielsen, e/ou cultura positiva de Mtb em FP ou biópsia de fragmento pleural; e/ou por identificação de granuloma com ou sem necrose caseosa no exame histopatológico das amostras de fragmentos pleurais; e/ou investigações citopatológicas de FP indicando exsudato linfocitário sem malignidade; e/ou nos casos em que todos os procedimentos realizados foram inconclusivos, diagnóstico foi baseado em achados clínicos, como febre vespertina e sudorese noturna por pelo menos três semanas, associado a um derrame pleural exsudativo, com predomínio linfocitário com biópsia pleural e que respondem satisfatoriamente às drogas específicas ao tratamento de TB.

Outras pleurisas não tuberculose (OPL): 39 adultos (≥ 18 anos) com diagnóstico de OPL, baseado na presença de quadro clínico infeccioso, porém com bacterioscopia para BAAR e cultura negativas e exames histopatológico da pleura e

citopatológico do FP compatíveis com outras pleurisas não tuberculosa: neoplasia, insuficiência cardíaca ou renal, empiema, quilotórax, hepatopatias e doenças autoimunes como lúpus.

Em todos os grupos foram aplicados os seguintes critérios de exclusão: mulheres grávidas e/ou não apresentarem diagnóstico confirmado.

As informações clínicas, laboratoriais e demográficas foram coletadas de um banco de dados constantemente atualizado dos pacientes a partir de registros médicos. A maioria dos pacientes apresentou informações sobre as vacinações com BCG (62/68). As amostras de FP foram submetidas ao teste ADA com base no método de Giusti (GIUSTI; GALANTI, 1984), no laboratório Hermes Pardini, um centro de referência em medicina diagnóstica de serviços terceirizados. O estado da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi determinado usando um método colorimétrico imuno-histoquímico (Cobas®, Roche Molecular Systems Inc, CA, EUA). O tecido pleural extraído por biópsia e amostras de FP foi submetido a coloração para BAAR e a cultura em meio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ), de acordo com métodos laboratoriais de rotina. Fragmentos de biópsia pleural foram retirados para exames histopatológicos, e FP para investigações citopatológicas.

A doação da amostra foi obtida somente após o consentimento informado por escrito de todos os participantes. Dados clínicos, laboratoriais e demográficos foram obtidos de prontuários médicos. Todos os exames de rotina diagnóstica foram realizados no HUPE.

4.3 Antígenos e estímulos utilizados nos ensaios imunológicos

O antígeno recombinante fusionado PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 foi construído em nosso laboratório (ARAUJO *et al.*, 2014), bem como os Ags MPT10.34:MPT64 (ARAÚJO *et al.*, 2010), PPE59 (MULINARI, 2016) e o F2 (SARDELLA, 2015). O antígeno fusionado ESAT-6:CFP-10 foi doado por Dr. Tom Ottenhoff da Leids Universitair Medisch Centrum (Leiden, The Netherlands). Os Ags MT10.3 e MPT64 foram doados por Dr Marhavir Singh, LIONEX Diagnostics & Therapeutics GmbH (Braunschweig, Germany). O mitógeno concanavalina A (Con-A, Sigma-Aldrich, USA) foi utilizado como controle positivo da resposta imune e viabilidade celular na concentração previamente padronizada de 5µg/mL (TAVARES *et al.*, 2007).

4.4 Coleta do espécime clínico

Os pacientes foram indicados para a realização de toracocentese e biópsia pleural ao Ambulatório de doenças pleurais do Serviço de Pneumologia e Tisiologia HUPE/UERJ, por demanda espontânea ou encaminhados pelo Sistema de Regulação de Vagas (SISREG). A toracocentese é um procedimento cirúrgico realizado por um médico pneumologista treinado que visa a coleta de amostras de FP que são encaminhadas para investigação clínico-laboratorial. Geralmente é um procedimento onde se tem o monitoramento dos sinais vitais do paciente, sendo o médico orientado por ultrassonografia de tórax, que serve como guia para procedimentos invasivos, em tempo real a beira do leito. Nos casos de possibilidade ou indefinição diagnóstica, é decidido pelo médico realizar também a biópsia pleural com agulha de Cope, a fim de coletar fragmentos da pleura para diagnóstico histopatológico. Após a equipe médica fornecer as informações sobre o estudo em andamento e oferecer participação, caso o paciente aceite e assine o TCLE, são coletadas as informações sociodemográficas, clínicas e laboratórias por meio de questionário padronizado, bem como as amostras clínicas. Para o diagnóstico laboratorial, os médicos solicitam exames bioquímicos e laboratoriais do FP, que são realizados no laboratório do HUPE. FP dos pacientes foram coletados por toracocentese e processados dentro de uma e no máximo 3 horas após a coleta. Na toracocentese foram coletados 50 mL de FP em um tubo de polipropileno sem aditivos. Além disso, são coletados 10 mL de sangue venoso em tubos vacutainer para soro (BD), bem como em tubos vacutainer com heparina (BD) para a obtenção das células do sangue periférico. As amostras foram processadas imediatamente. O sangue obtido é centrifugado a 931 g, 25°C, freio baixo por 10 min. Posteriormente, o soro é aliquoteado em microtubos e/ou tubos criogênicos para serem armazenados a -70°C. Parte do sangue é destinado ao estudo celular, para obtenção de PBMC. O FP coletado é homogeneizado vagarosamente por inversão e destinado a obtenção de células. Parte do LP é centrifugado a 931 g, 4°C, freio baixo por 10 min. Posteriormente o FP é aliquoteado e armazenado a -70°C. Um volume de 250 µl de soro ou FP foram encaminhados ao LAMCEL/ FIOCRUZ, onde foram estocados a -70°C até o uso.

4.5 Análise da imunoreatividade das proteínas fusionadas de Mtb por ensaio imunoenzimático (ELISA) “in house”

4.5.1. Padronização e otimização dos testes MT10:MPT64 IgA e IgG em soro e FP

Foram utilizadas microplacas para ELISA Nunc, flat Botton immunoplate C96 Maxisorp (Thomas Sci, USA). Nos respectivos poços das placas foram adicionados 50µL do antígeno fusionado nas concentrações de 0,05, 0,5 1,0 e 1,5 µg/mL diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH=9,6 (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 15mM). As placas foram incubadas em câmara úmida por 2 horas à 37°C. Para a etapa de lavagem das placas, foram utilizados dois tampões, visando obter melhor desempenho no teste:

A) Três lavagens com 200µL de tampão fosfato-salino com 0,01% tween (PBSt 0,01%) pH = 7,4 (Na₂HPO₄ 90mM; NaH₂PO₄ 18,98mM; NaCl 9,92mM; 0,01% Tween 20) (tampão usual no ELISA);

B) Três lavagens com o tampão usual do ELISA (descrito no item **A**) contendo maior concentração de Tween 20, PBST 0,1% ao invés de 0,01 % (ARAUJO *et al.*, 2010).

Em seguida, as placas foram bloqueadas com 100 µL da solução de bloqueio PBSt-BSA 5% (albumina sérica bovina, BSA, Fraction V), e incubadas a 37°C por 2 horas. Após lavagem descrita anteriormente, foram adicionados 50µL do *pool* de soros e FPs pareados nos respectivos poços nas diluições de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 para FP e 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 para soro, feitas com dois diferentes tampões:

C) PBST 0,01-BSA 1% (tampão usual no ELISA, descrito no item **A**);

D) PBST 0,1% adicionado de 0,3M NaCl (Araujo *et al.*, 2010).

As placas foram incubadas à 37°C por 1 hora. Após nova lavagem descrita anteriormente, foram adicionados 50µL do anticorpo anti-humano IgA conjugado a enzima peroxidase (PIERCE, Rockford, USA), diluídos a 1:2.500 e 1:5.000 ou 50µL do anticorpo anti-humano IgG conjugado a enzima peroxidase (PIERCE, Rockford, USA), diluído a 1:10.000, 1:15.000, 1:20.000 e 1:25.000, nos tampões C ou D, respectivamente. Posteriormente, as placas foram novamente incubadas por 1 hora à 37°C. Foram adicionados 50µL da solução de substrato (solução TMB [3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine], Pierce, Rockford, IL USA), e realizado nova incubação por 20

minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi parada com 50µL de ácido sulfúrico 2,5M (H₂SO₄). As placas foram lidas numa absorbância de 450nm no leitor de placas *ELx800 Absorbance Microplate Reader* (Biotek, Vermont, USA). Todos os testes foram realizados em duplicatas e, em todas as placas foram adicionados *pools* positivos e negativos em quatro diluições para servir como controle das placas nos testes realizados no mesmo dia ou em dias distintos. Os melhores parâmetros adotados foram baseados na maior diferença de reatividade entre os pontos de *pools* de amostras de pacientes com TB e aqueles com diagnóstico negativo para TB e na melhor linearidade das curvas resultante da padronização.

4.5.2. Padronização dos testes com os Ags F2, PPE59-IgA e F2, PPE59, MT10.3 e MPT-64 IgG, em FP

Foram utilizadas microplacas para ELISA Nunc, flat botton immunoplate C96 Maxisorp (Thomas Sci, USA) de acordo com Araújo *et al* (2010) com pequenas modificações. Os seguintes Ags foram avaliados: antígenos PPE59, MT10.3 e MPT-64 e a quimera proteica F2. Os tampões de lavagens e diluição, respectivamente, tiveram a seguinte composição: tampão fosfato-salino com 0,01% tween (PBSt 0,01%) pH = 7,4 (Na₂HPO₄ 90mM; NaH₂PO₄ 18,98mM; NaCl 9,92mM; 0,01% Tween 20) e PBST 0,01-BSA 1%. Os melhores parâmetros adotados foram baseados na maior diferença de reatividade entre os pontos de *pools* de amostras de pacientes com TB e aqueles com diagnóstico negativo para TB e na melhor linearidade das curvas resultante da padronização.

4.5.3. Parametrização dos testes F2, PPE59, MT10.3 e MPT-64 IgA e IgG em soro e MT10:MPT64, MT10.3 e MPT64 IgA em FP

Os tampões de lavagem e diluição das amostras e Ac para os testes a seguir foram aqueles comumente utilizados no ELISA “*in house*”, ou seja, tiveram sempre a seguinte composição, respectivamente: tampão fosfato-salino com 0,01% tween (PBSt 0,01%) pH = 7,4 (Na₂HPO₄ 90mM; NaH₂PO₄ 18,98mM; NaCl 9,92mM; 0,01% Tween 20) e PBSt 0,01-BSA 1%. Os parâmetros de diluição das amostras, Ags e Acs adotados podem ser observados na Tabela 1 (página 42).

Tabela 1 - Padronização e parametrização das concentrações de antígenos, amostras e diluições do anticorpo conjugado para detecção de IgA e IgG por ELISA em amostras de fluido pleural (FP) e soro de pacientes com tuberculose pleural (PLTB) e outras pleurites não TB (OPL).

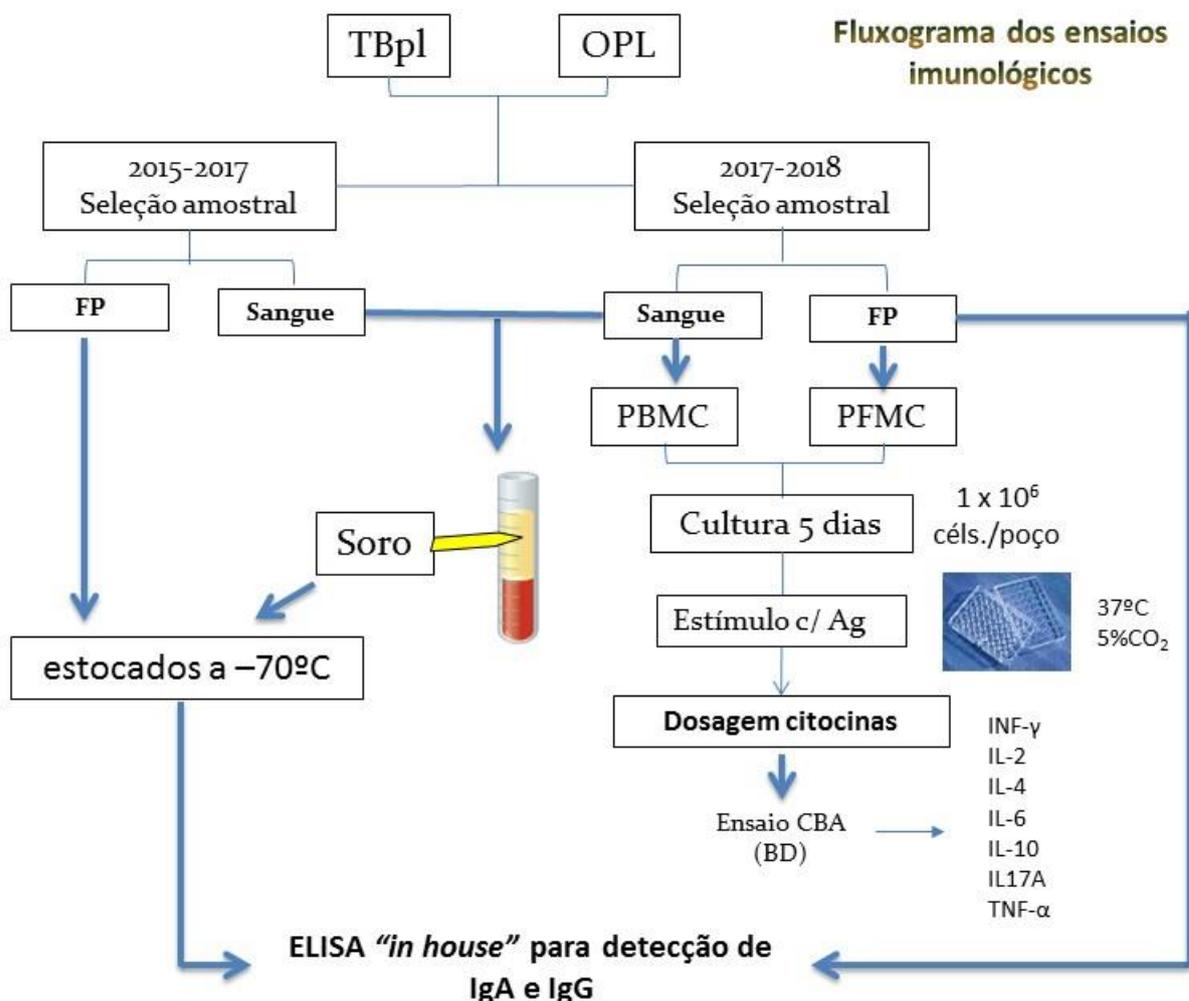
	IgA	IgG	Padronização
PPE59 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Soro (diluição) Anticorpo Secundário	0,5 1:50 e 1:100 1:2.500	1,0 1:50 e 1:100 1:10.000	Mulinari, 2016
PPE59 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) FP (diluição) Anticorpo Secundário	1,0 1:100 1:5.000	X	Presente estudo
F2 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Soro (diluição) Anticorpo Secundário	0,5 1:25 a 1:200 1:5.000	1,5 1:200 a 1:1600 1:20.000	Sardella <i>et al.</i> , 2014
F2 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) FP (diluição) Anticorpo Secundário	1,5 1:50 1:5.000	X	Presente estudo
MT10.3:MPT64 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Soro (diluição) Anticorpo Secundário	0,05 1:50 1:2.500	1,0 1:50 1:10.000	Presente estudo
MT10.3:MPT64 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) FP (diluição) Anticorpo Secundário	0,5 1:50 a 1:800 1:5.000	1,0 1:200 1:10.000	Araújo <i>et al.</i> , 2010 (IgA); Presente estudo (IgG)
MT10.3 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Soro (diluição) Anticorpo Secundário	1,0 1:50 a 1:400 1:1.500	1,0 1:400 1:2.000	Silva <i>et al.</i> 2008
MT10.3 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) FP (diluição) Anticorpo Secundário	1,0 1:100 1:5.000	X	Kaisermann <i>et al.</i> , 2005
MPT64 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Soro (diluição) Anticorpo Secundário	0,5 1:50 a 1:400 1:2.500	1,0 1:400 1:2.000	Silva <i>et al.</i> 2008
MPT64 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) FP (diluição) Anticorpo Secundário	1,0 1:100 1:5.000	X	Kaisermann <i>et al.</i> , 2005

X: representa parâmetros de padronização e parametrização não possíveis para ELISA

4.6 ELISA “in house” na detecção de IgG e IgA em soro e fluido pleural

Foram utilizadas placas para ELISA Nunc, *flat botton imunoplate* C96 Maxisorp (Thomas Sci USA) para os ensaios realizados no FP e no soro. Nos respectivos poços da placa foram adicionados 50 μL dos Ags diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) $\text{pH}=9.6$ (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 15 mM), nas concentrações previamente determinadas para os diferentes antígenos. Após incubação à 37°C por duas horas, as placas são lavadas 3 vezes com 200 μL PBSt 0,01% $\text{pH}=7.4$ (Na_2HPO_4 15mM, NaH_2PO_4 18,98mM, NaCl 9,92mM, 0,01% Tween 20). 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 repetidos. Estimar a imunoreatividade IgG-MT10:MPT64 usou-se o mesmo procedimento descrito acima, e os lavagens e diluições como descrito no item 4.5.1.

4.7 Fluxograma dos ensaios imunológicos



Dot-ELISA Immunoblotting para o diagnóstico da TBpl

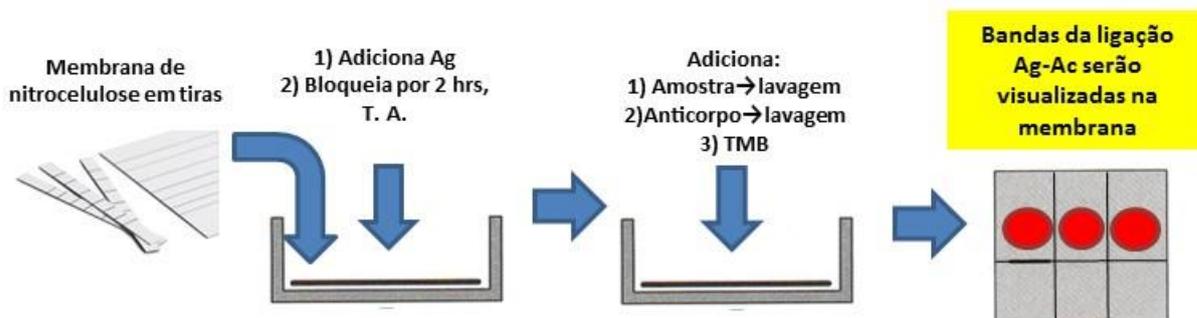


Figura 8 - Fluxograma dos ensaios imunológicos realizados no estudo de biomarcadores da resposta imune celular e humoral na Tuberculose pleural (TBpl). OPL: outras pleurisas não TB. PFMC: células mononucleadas do fluido pleural. PBMC: células mononucleadas do sangue periférico. FP: Fluido pleural; ILs: interleucinas. Ag: antígenos.

4.8 Ensaio piloto de dot-ELISA Immunoblotting

Quarenta microlitros dos antígenos de interesse diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH=9,6 (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 15mM) (tampão de diluição dos Ags utilizado na técnica de ELISA nas concentrações previamente definidas), foram utilizados para adsorver as membranas de nitrocelulose (Trans-Blot®, BioRad) cortadas em tiras. O bloqueio da membrana foi realizado por 2 horas com 50 mL de tampão tris-base salino 0,1% tween (TBS-T) contendo leite desnatado 5% (tampão de bloqueio). Posteriormente, foi realizada lavagem da membrana com 50 mL TBS-T (20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1mL Tween 20), por 10 min e colocado para secar por 10 minutos à temperatura ambiente. Em sequência, foi adicionado 40 μL das amostras diluídos em tampão PBSt 0,01%-BSA 1% (tampão de diluição de amostra utilizado na técnica de ELISA (nas concentrações previamente definidas no ELISA para cada espécime clínico), nos espaços previamente estabelecidos e colocado para secar por 10 min à T.A. Após nova etapa de lavagem e secagem da membrana, foi adicionado 40 μL de anti-human IgG ou IgA ligado a fosfatase alcalina, diluído em tampão PBSt 0,01%-BSA 1% (nas concentrações do ELISA aqui proposto) e colocado para secar por 10 min à T.A. Realizado novamente o processo de lavagem e secagem da membrana. A reação imune será revelada adicionando-se 5 mL de solução reveladora TMB membrane peroxidase substrate system (3-C) (KPL, Gaithersburg, USA).

4.9 Preparação das culturas de células mononucleadas do sangue periférico e do fluido pleural

O FP e o sangue venoso coletados foram adicionados ao Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Science AB, USA) e centrifugado a 2.000 rpm/30min (centrifuga Beckman – CS-6R) à temperatura ambiente para separação de leucócitos mononucleares (PBMC ou PFMC). A camada linfocitária foi coletada e ressuspensa em meio GIBCO AIM V™ (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA). As células são ressuspensas em solução corante Azul de Tripán (HyClone®, South HyClone Road Logan, Utah) e as viáveis foram contabilizadas em câmara de Neubauer (Assistent, Germany). Após quantificação foram ajustadas para 1×10^6 por grupo experimental e primadas com os antígenos selecionados em placas de cultura de tecido MICROTEST™ (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA),

estéril, de 96 poços, com fundo chato, no volume final de 300 µL por poço. O mitógeno Concanavalina-A, (2 µL) é utilizado de uma solução mãe previamente diluída a 2,5 µg/mL e as proteínas serão usadas na concentração de 5 µg/ml. Todos os testes foram realizados em duplicata (TAVARES *et al.*, 2007).

4.10 Quantificação de citocinas por Citometria de Fluxo

A produção de IFN-γ e outras seis citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A e TNF) foi avaliada nos sobrenadantes das culturas estimuladas com os diferentes antígenos ESAT6:CFP10 e PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 utilizando o kit comercial BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA Human) Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), conforme instruções do fabricante. Esse método baseia-se em um ensaio utilizando esferas (*beads*) para detectar, simultaneamente, múltiplas citocinas em um mesmo espécime clínico. Resumidamente, adicionou-se 50 µL de amostras ou padrões, nas concentrações definidas pelo fabricante, a uma mistura (*mix*) de 50 µL de esferas revestidas com Ac de captura (primário) específico aos análitos de interesse. Após, adicionou-se 50 µL de mix contendo Ac de detecção (secundário) conjugada com ficoeritrina durante 3 horas, à temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, realizou-se processo de lavagem para remover qualquer os Ac que não se ligaram. Cada esfera tem uma intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de analito ligado. Os resultados foram adquiridos em citômetro BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) da plataforma multiusuário da FIOCRUZ. O software de análise BD FCAP Array (version 3.0, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) foi utilizado para identificar cada população de esferas, gerar uma curva padrão e calcular a concentração das amostras conforme manual do fabricante. O kit BD CBA Human Th1/Th2/Th17 apresenta os seguintes limites de detecção para as citocinas: IL-2 (2,6 pg/mL), IL-4 (4,9 pg/mL), IL-6 (2,4 pg/mL), IL-10 (4,5 pg/mL), TNF (3,8 pg/mL), IFN-γ (3,7 pg/mL) e IL-17 (18,9 pg/mL), bem como um limite máximo de detecção de 5000 pg/mL.

4.11 Análise dos resultados

Os dados coletados foram utilizados para confecção de banco de dados em software Excel e as características da população foram analisadas utilizando o teste

de Chi quadrado, $p < 0,05$ foi considerado significativo. Análises estatísticas foram efetuadas usando os programas SPSS versão 20.0 e Graphpad Prism versão 6.0 para Windows. Para os ensaios de padronização, os resultados foram avaliados em média \pm desvio padrão e para escolha de melhor resultado a ser utilizado no estudo foi realizado o teste de Mann-Whitney para comparar as distribuições entre os pools de TBpl e controles, $p < 0,05$ foi considerado significativo. A imunorreatividade das proteínas de Mtb testadas foram expressas em DO. Comparação entre os resultados das DO obtidos no teste de ELISA foram realizadas através de testes não pareados, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Para as análises com as variáveis demográficas e clínicas, a imunorreatividade através de densidade óptica foi analisada em médias \pm desvio padrão e a comparação entre estas variáveis de estudo utilizou-se testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. As positivities de IgA e IgG para as diferentes proteínas de Mtb foram calculadas através da Curva ROC (receiver operating characteristic) 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 combinação dos resultados de diferentes diluições das amostras favorece a sensibilidade sem alterar a especificidade do teste. Os ensaios de imunidade celular e humoral tiveram os resultados analisados usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar mais de dois grupos, seguido do teste Mann Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da resposta humoral frente a antígenos de Mtb, MT10.3:MPT-64, F2, PPE59, MT10.3 e MPT-64 em pacientes com derrame pleural

5.1.1 ELISA “in house”

Foram utilizadas amostras de soro e FP de 68 pacientes com derrame pleural, dos quais 29 (42,6%) foram diagnosticados com TBpl e 39 (57,4%) com OPL. Estes foram utilizados para validação do reconhecimento do antígeno fusionado MT10.3:MPT-64 por IgA, bem como reatividade a este e aos outros alvos propostos na detecção de IgA and IgG. Este estudo encontra-se submetido à revista BMC Immunology indexada com vistas à publicação (anexo). Adicionalmente, foram coletados dos 16 pacientes descritos acima soro e FP de pacientes com suspeita de TBpl que usaremos para estimar o valor preditivo do teste de ELISA.

5.1.2 Padronização e otimização do ELISA “in house” com a proteína de fusão MT10.3:MPT64 para IgA e IgG em soro e FP

Foram utilizadas diluições de 1:20 a 1:200 para os *pools* de amostras positivas (+) e negativas (-) de soro e de 1:50 a 1:800 para *pools* de FP. A tabela 2 mostra os melhores parâmetros baseados na maior diferença de reatividade entre os pontos de *pools* de amostras de pacientes com TBpl e aqueles com diagnóstico negativo para TB (OPL), bem como na melhor linearidade das curvas resultante da padronização.

Tabela 2- Melhores parâmetros da padronização do teste de ELISA MT10.3:MPT64-IgA e IgG em soro e FP, respectivamente.

Concentrações	IgG	IgA	Concentrações	IgG
MT10.3:MPT64 (µg/mL)	1,0	0,05	MT10.3:MPT64 (µg/mL)	1,0
SORO (diluição)	1:50	1:50	FP (diluição)	1:200
Anticorpo secundário	1:10.000	1:2.500	Anticorpo secundário	1:10.000

Os resultados globais da padronização estão mostrados na figura 9 e 10. Diferenças significativas de reatividade entre *pools* de pacientes com TBpl e OPL de soro e FP, foram obtidas utilizando tampão de lavagem PBST 0,01% (tampão A) e tampão de diluição PBST 0,01%-BSA1% (tampão C) para o conjugado IgA (figuras 9A e 9C, página 48). Menores diferenças de reatividade de IgA entre os *pools* foram observadas utilizando os tampões propostos por Araujo *et al.* (2010), PBST 0,1% e PBST0,1%-NaCl 0,3M (figuras 9B e 9D, página 48). Por outro lado, o uso do tampão PBST 0,1% (tampão B), e tampão de diluição PBST 0,01%, adicionado de 0,3M NaCl (tampão D) mostraram maiores diferenças de reatividade entre os entre $pool^+$ e $pool^-$ em soro na detecção da IgG (figura 10B, página 49), o que não foi evidenciado utilizando os tampões comumente empregados no ELISA “*in house*” (figura 10A, página 49).

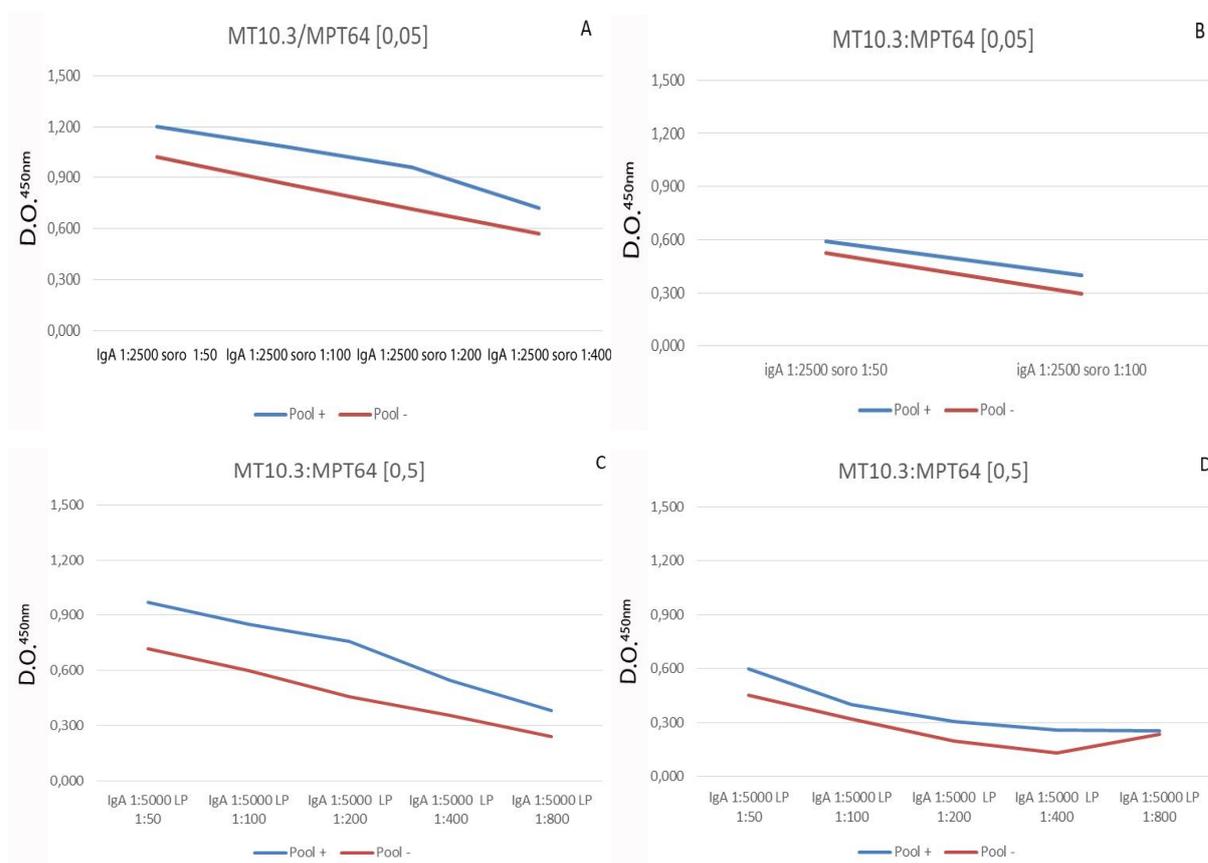


Figura 9 - Otimização do ELISA com diluições seriadas de *pools* de fluidos pleurais e soro de pacientes com tuberculose pleural ($pool^+$) e outras pleurisas ($pool^-$), utilizando: A e B) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com diluições seriadas de *pools* de soro, na detecção de IgA 1:2.500; C e D) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com diluições seriadas de *pools* de FP, na detecção de IgA 1:5.000, fazendo uso de dois tampões diferentes de lavagem e dois de diluição das amostras clínicas e conjugado: PBST 0,01% e PBST 0,01%-BSA 1% (A e C) e; PBST 0,1% e PBST0,1%-NaCl 0,3M, (B e D). As curvas A, B, C e D demonstram a diferença de reatividade entre C^+ e C^- . Linhas azuis representam os *pools* de amostras de pacientes com tuberculose pleural ($pool^+$) e linhas vermelhas representam os *pools* de amostras de pacientes outras pleurisas ($pool^-$).

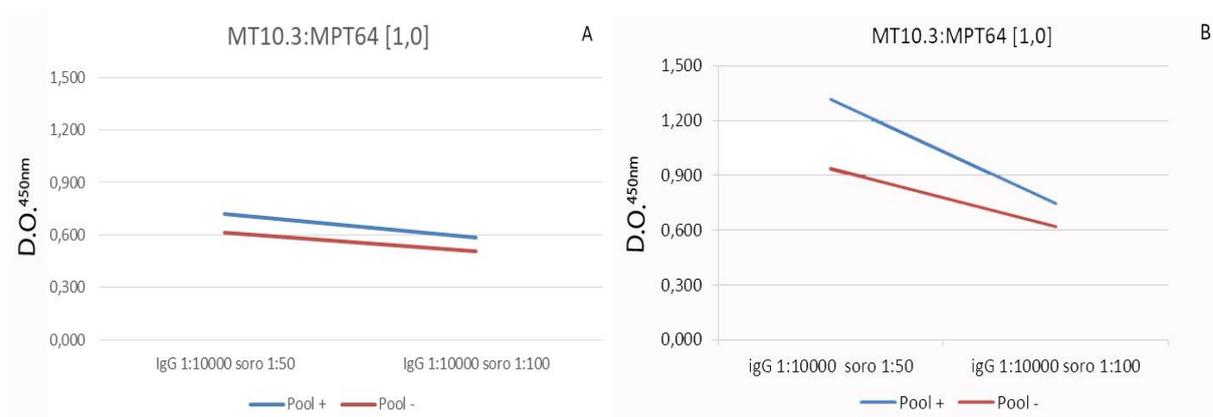


Figura 10 - Otimização do ELISA com diluições seriadas de *pools* de soros de pacientes com tuberculose pleural ($pool^+$) e outras pleurisas ($pool^-$), utilizando a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na detecção de IgG (1:10.000), fazendo uso de dois tampões diferentes de lavagem e dois de diluição das amostras clínicas e conjugado: **A)** PBST 0,01% e PBST 0,01%-BSA 1%, respectivamente; **B)** PBST 0,1% e PBST 0,1%-NaCl 0,3M, respectivamente. As curvas A e B demonstram a diferença de reatividade entre $pool^+$ e $pool^-$. Linhas azuis representam os *pools* de amostras de pacientes com tuberculose pleural ($pool^+$) e linhas vermelhas representam os *pools* de amostras de pacientes outras pleurisas ($pool^-$).

5.1.3 Padronização do ELISA com a quimera proteica F2 para IgA e IgG em FP

A tabela 3 mostra os melhores parâmetros da padronização ELISA-F2-IgA, baseado na maior diferença de reatividade entre os pontos de *pools* de amostras de pacientes com TBpl e aqueles com diagnóstico negativo para TB (OPL), bem como na melhor linearidade das curvas resultante da padronização.

Tabela 3- Melhores parâmetros da padronização do teste de ELISA F2-IgA.

Concentrações	IgA
F2 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1,5
FP (diluição)	1:50
Anticorpo secundário	1:5.000

Não foram obtidas diferenças de reatividade na padronização de ELISA em FP IgG-F2 entre os *pools* de amostras de pacientes com TBpl x OPL (figura 11, página 50).

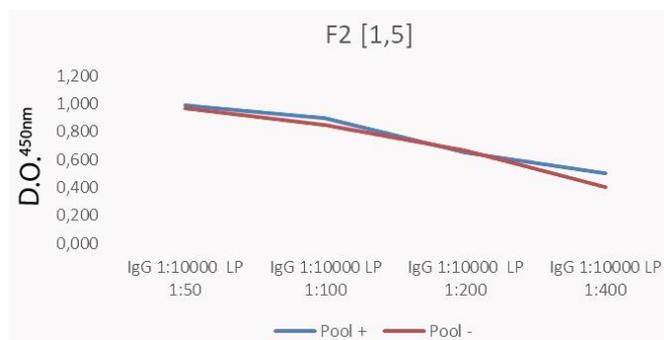


Figura 11 - Padronização do ELISA com diluições seriadas de pools de fluido pleural de pacientes com tuberculose pleural (pool+) e outras pleurisas (pool-), utilizando a quimera proteica F2 (1,5 µg/mL) na detecção de IgG (1:10.000). Linhas azuis representam os pools de amostras de pacientes com tuberculose pleural (pool⁺) e linhas vermelhas representam os pools de amostras de pacientes outras pleurisas (pool⁻).

5.1.4 Padronização do ELISA com a proteína PPE59 para IgA em FP

A tabela 4 mostra os melhores parâmetros da padronização ELISA-PPE59-IgA, baseado na maior diferença de reatividade entre os pontos de pools de amostras de pacientes com TBpl e aqueles com diagnóstico negativo para TB (OPL), bem como na melhor linearidade das curvas resultante da padronização

Tabela 4- Melhores parâmetros da padronização do teste de ELISA PPE59-IgA.

Concentrações	IgA
PPE59 (µg/mL)	1,0
FP (diluição)	1:100
Anticorpo secundário	1:5.000

Não foram obtidas diferenças significativas de reatividade e linearidade regular na padronização de ELISA FP IgG-PPE59 entre os pools de amostras de pacientes com TBpl x OPL (figura 12, página 51).

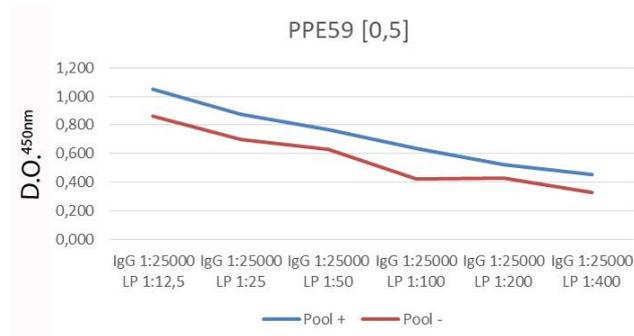


Figura 12 - Padronização do ELISA com diluições seriadas de pools de FP de pacientes com tuberculose pleural (pool+) e outras pleurisas (pool-), utilizando a quimera proteica PEE59 (0,5 µg/mL) na detecção de IgG (1:10.000). Linhas azuis representam os pools de amostras de pacientes com tuberculose pleural (pool⁺) e linhas vermelhas representam os pools de amostras de pacientes outras pleurisas (pool⁻).

5.1.5 Padronização do ELISA com as proteínas MT10.3 e MPT64 para IgG em FP.

Não foram obtidos bons parâmetros com significativa diferença de reatividade e linearidade regular na padronização de ELISA FP IgG-MPT64 e -MT10 entre os pools de amostras de pacientes com TBpl x OPL (figura 13, página 51).

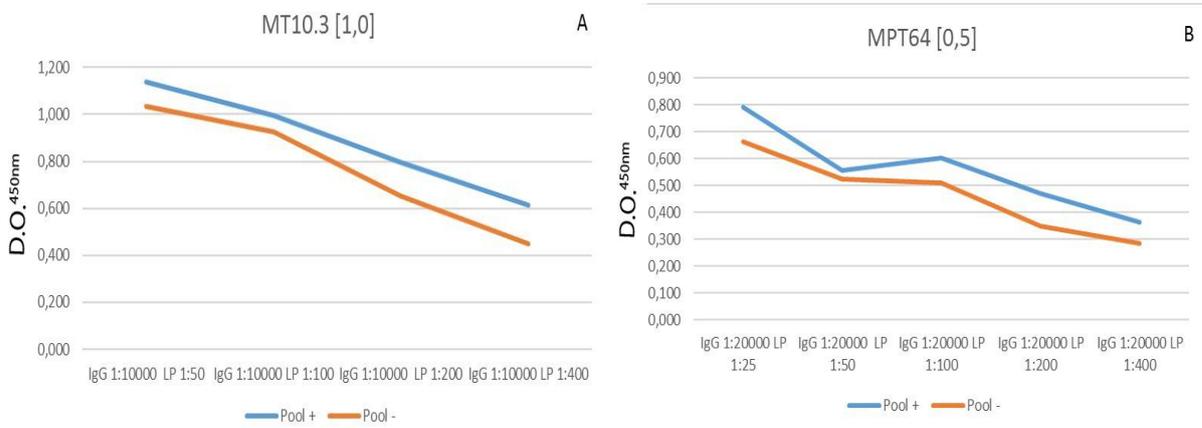


Figura 13 - Padronização do ELISA com diluições seriadas de pools de fluido pleural de pacientes com tuberculose pleural (pool⁺) e outras pleurisas (pool⁻), utilizando: A) a proteína MT10.3 (1,0 µg/mL) na detecção de IgG (1:10.000) e B) a proteína MPT64 (0,5 µg/mL) na detecção de IgG (1:20.000). Linhas azuis representam os pools de amostras de pacientes com tuberculose pleural (pool⁺) e linhas vermelhas representam os pools de amostras de pacientes outras pleurisas (pool⁻).

5.1.6 Características da população do estudo da detecção de imunoglobulinas.

A maioria dos pacientes TBpl eram de etnia parda (17/29, 58,6%), eram não tratados (28/29, 96,6%), sem histórico prévio de TB (27/29, 93,1%) e HIV negativos (23/29, 79,3%). Entre os 39 pacientes com OPL, os seguintes diagnósticos foram encontrados: câncer (25 pacientes), insuficiência cardíaca (5 pacientes), insuficiência renal (4 pacientes), lúpus eritematoso sistêmico (LES; 2 pacientes), empiema, doenças do fígado (hepatite) e quilotórax (1 paciente, cada).

Os principais dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos dos grupos arrolados no estudo estão descritos na tabela 5 (página 53 e 54). Os indivíduos apresentaram diferença significativa entre a média de idade, onde os pacientes com OPL eram mais idosos ($p < 0,001$). O câncer foi a patologia dominante (64,1%) e a maioria dos TBpl eram do sexo masculino (72,5%), embora não tenha sido observada diferença significativa em relação ao OPL ($p = 0,12$). Poucos participantes relataram histórico prévio de TB (4/68, 5,8%), incluindo dois pacientes com OPL. Diferenças significativas também foram observadas entre os níveis de ADA de pacientes TBpl comparados ao OPL ($p < 0,0001$), onde os pacientes TBpl apresentaram níveis significativamente mais elevados de ADA que os participantes do grupo OPL (61.15 ± 32.71 vs 19.54 ± 31.29 , respectivamente). Resultado de ADA falso-positivo foi identificado em apenas 2/39 (5,1%) indivíduos com OPL. Assim, a pesquisa de ADA no FP mostrou sensibilidade e alta especificidade (79,3%, 23/29 e 94,9%, 37/39), seguida de histopatologia de fragmento pleural sugestiva de TB (47,3%, 9/19 e 76,2%, 16/21), respectivamente. Menor sensibilidade e alta especificidade foram obtidas para os resultados de cultura de FP (14,3%, 4/28 e 100%, 36/36) e na pesquisa BAAR (0%, 0/28 e 100%, 35/35), respectivamente.

Tabela 5 – Dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos dos participantes com tuberculose pleural (TBpl) e outras pleurites não TB (OPL).

Variáveis	TBpl n=29 (42.6%)	OPL n=39 (57.4%)
<i>Idade (média ± DP)</i>	43.07±16.59	62.5±18.63 *
< 50 anos	22 (75.9)	10 (25.6)
> 50 anos	7 (24.1)	29 (74.4)
Sexo		
Feminino	8 (27.5)	18 (46.2)
Masculino	21 (72.5)	21 (53.8)
Etnia		
Branco	6 (20.7)	18 (46.2)
Negro	6 (20.7)	10 (25.6)
Pardo	17 (58.6)	11 (28.2)
Vacinação BCG:		
Positivo (cicatriz)	20 (69)	20 (51.3)
Negativo	8 (27.6)	14 (35.9)
Sem informação	1 (3.4)	5 (12.8)
Uso de bebida alcoólica:		
Positivo	8 (27.6)	6 (15.4)
Negativo	20 (69)	30 (76.9)
Sem informação	1 (3.4)	3 (7.7)
Fumante atual:		
Positivo	8 (27.6)	3 (7.7)
Negativo	20 (69)	35 (89.7)
Sem informação	1 (3.4)	1 (2.6)
ADA (média ± DP) ¹	61.15±32.71 *	19.54±31.29
Positivo	23 (79.3)	2 (5.1)
Negativo	6 (20.7)	37 (94.9)
BAAR (FP)		
Positivo	0	0
Negativo	28 (96.6)	35 (89.7)
Sem informação	1 (3.4)	4 (10.3)
BAAR fragmento de pleura)		
Positivo	0	0
Negativo	6 (20.7)	4 (10,3)
Sem informação	23 (79.3)	35 (89.7)
Cultura (FP) para Mtb		
Positivo	4 (13.8)	0
Negativo	24 (82.8)	36 (92.3)
Sem informação	1 (3.4)	3 (7.7)
Cultura (fragmento de pleura) para Mtb		
Positivo	1 (3.4)	0
Negativo	4 (13.8)	3 (7.7)
Sem informação	24 (82.8)	36 (92.3)
Exame citopatológico (FP)		
Sugestivo de TB	17 (58.6)	3 (7.7)
Não específico	0	0
Sem informação	4 (13.8)	6 (15.4)

<i>Exame histopatológico (fragmento de pleura)</i>		
Sugestivo de TB	9 (31)	0
Negativo	2 (6.9)	16 (41)
Não específico	2 (6.9)	5 (12.8)
Sem informação	16 (55.2)	18 (46.2)
<i>Histórico prévio de TB</i>		
Positivo	2 (6.9)	2 (5.1)
Negativo	27 (93.1)	35 (89.7)
Sem informação	0	2 (5.1)
<i>Outras morbidades</i>		
Câncer	0	25 (64.1)
Insuficiência cardíaca	0	5 (12.8)
Insuficiência renal	0	4 (10.3)
Lúpus eritematoso sistêmico (LES)	0	2 (5.1)
Hepatite, Empiema, quilotórax	0	3 (7.7)
<i>Tratamento prévio para TB</i>		
Livre de tratamento	28 (96.6)	37 (94.9)
>1 mês de tratamento	1 (3.4)	2 (5.1)
<i>Sorologia anti-HIV</i>		
Positivo	1 (3.4)	2 (5.1)
Negativo	23 (79.3)	23 (59)
Sem informação	5 (17.3)	14 (35.9)
<i>Ocupação/Profissão</i>		
Serviços gerais	10 (34.5)	10 (25.6)
Estudantes e outras profissões	7 (24.1)	10 (25.6)
Negócios	6 (20.7)	3 (7.7)
Profissional liberal	3 (10.35)	6 (15.4)
Aposentado	3 (10.35)	10 (25.6)

* $p < 0,05$. DP - Desvio Padrão.¹ ADA - *cutoff* da adenosina desaminase: > 40 U/L, TBpl: pacientes com tuberculose pleural; OPL: pacientes que apresentam outras doenças pleurais não relacionadas à TB. LES: lúpus eritematoso sistêmico. Nota: No Brasil, pardo significa uma mistura de etnicidades européias, negras e ameríndias. HIV: vírus da imunodeficiência humana. TB: tuberculose.

5.1.7 ELISA “in house” para detecção de IgA-MT10.3:MPT-64 em FP e soro de pacientes TBpl e OPL.

Os testes de ELISA realizados nos espécimes de soro e FP individualmente foram feitos com os tampões PBST 0,01% e PBST 0,01%-BSA 1%, e na diluição seriada de 1:50 a 1:800. Diferença significativa de reatividades média foram obtidas entre TBpl vs OPL ($p \leq 0,0001$) na detecção de IgA em FP e, pela primeira vez, no soro (figura 14 e tabela 6, páginas 55 e 67, respectivamente).

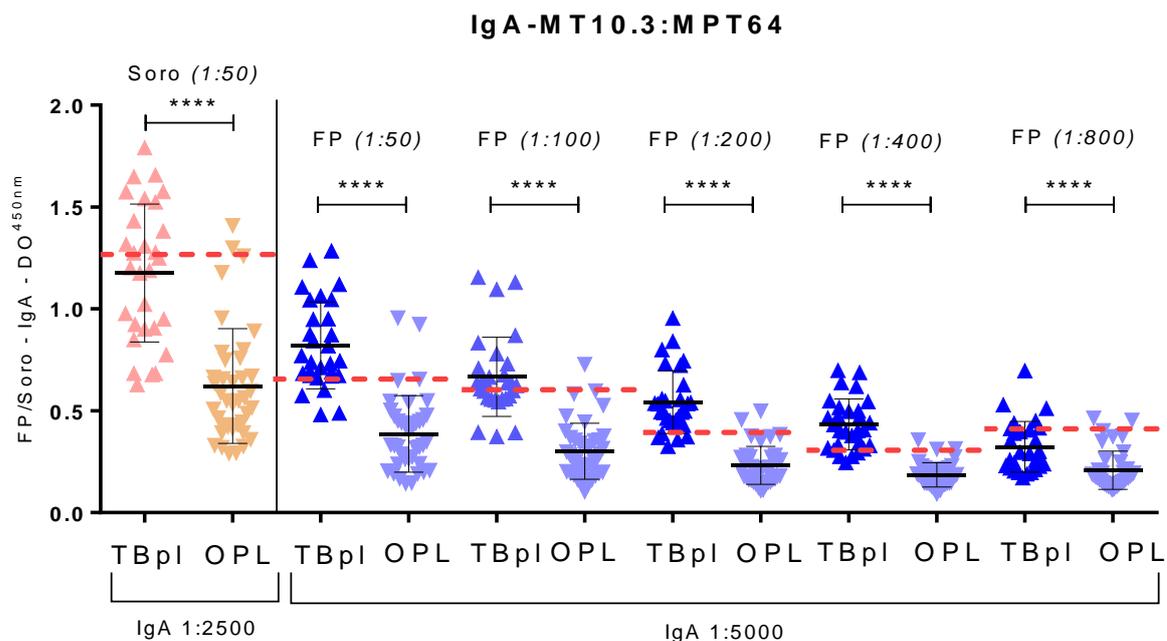


Figura 14 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à proteína de fusão MT10.3:MPT64, de fluido pleural (FP) e soro de pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=29) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL, n=39) ensaiados nas diluições seriadas 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. ----- Linha vermelha pontilhada representa o *cut off* do teste estabelecido.

A figura 15 (página 56) apresenta as curvas ROC obtidas nas diferentes diluições de FP e soro IgA- MT10.3:MPT64. As curvas obtidas com o FP diluído a 1:50 a 1:800 apresentaram os valores de área sob a curva (AUC – *Area Under the Curve*) de 0.949, 0.950, 0.968, 0.980, 0.823 ($p \leq 0,0001$), respectivamente. As curvas obtidas com o soro diluído a 1:50, apresentaram os valores de área sob a curva de 0.905 ($p \leq 0,0001$). Para a detecção de IgA, com excessão do ELISA utilizando FP diluído a 1:800, todos os demais testes para o reconhecimento da fusão MT10.3:MPT64 apresentaram áreas sob a curva acima de 0,9 e, portanto, próximas de 1,0, o que é considerado estatisticamente um teste ideal para discriminar indivíduos doentes e saudáveis.

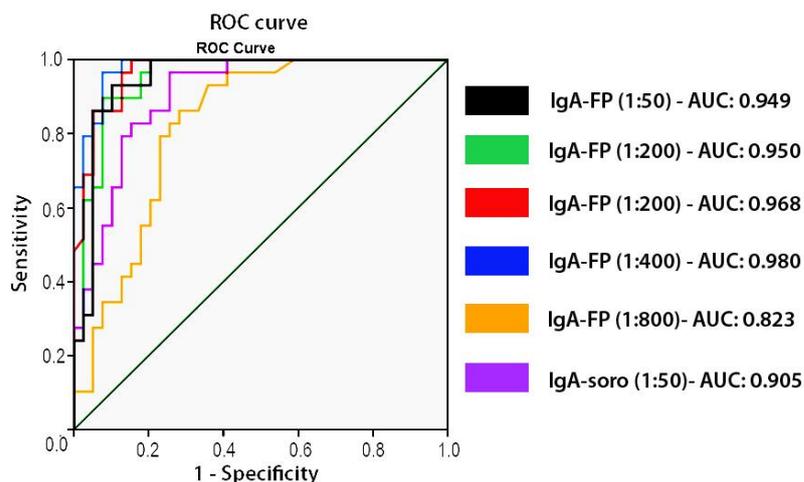


Figura 15 – Curvas ROC: IgA para o antígeno fusionado MT10.3:MPT64 nas diferentes diluições de fluido pleural (FP) e soro ensaiadas. AUC: área sob a curva (*Area Under the Curve*)..

5.1.8 ELISA “in house” para detecção de IgG-MT10.3:MPT-64 em FP e soro de pacientes TBpl e OPL .

Posteriormente, foram realizados ELISAs utilizando soro (1:50) e FP (1:200) individualmente utilizando os tampões B (PBSt 0,1%) e D (PBST 0,1%-NaCl 0,3M) para detecção de IgG-MT10.3:MPT-64. Médias de reatividades significativamente maiores foram obtidas em TBpl vs OPL ($p \leq 0,0001$) na detecção de IgG em soro e em FP (figura 16 e tabela 6, páginas 56 e 67, respectivamente).

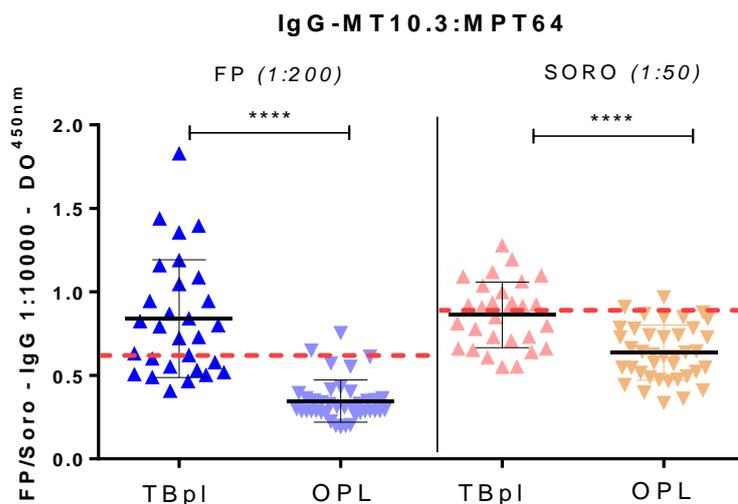


Figura 16 – Distribuição da resposta humoral na detecção de IgG, reativas à proteína de fusão MT10.3:MPT64, de soro (1:50) e líquido pleural (1:200) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=29) e com outras pleurisas não tuberculosas (OPL, n=39). ----- Linha vermelha pontilhada representa o *cut off* do teste estabelecido.

A figura 17 apresenta as curvas ROC de IgG-MT10.3:MPT64 de FP e soro diluídos respectivamente a 1:200 (AUC: 0,952; $p \leq 0,0001$), e soro a 1:50 (AUC: 0,809; $p \leq 0,0001$). Portanto, é possível a detecção de IgG-MT10.3:MPT64 no soro de pacientes TBpl por ELISA, entretanto, a utilização do FP nesse teste se mostrou mais promissor que o soro na diferenciação de pacientes TBpl e OPL, uma vez que, apresentou maior área sob a curva ROC. (figura 17, página 57).

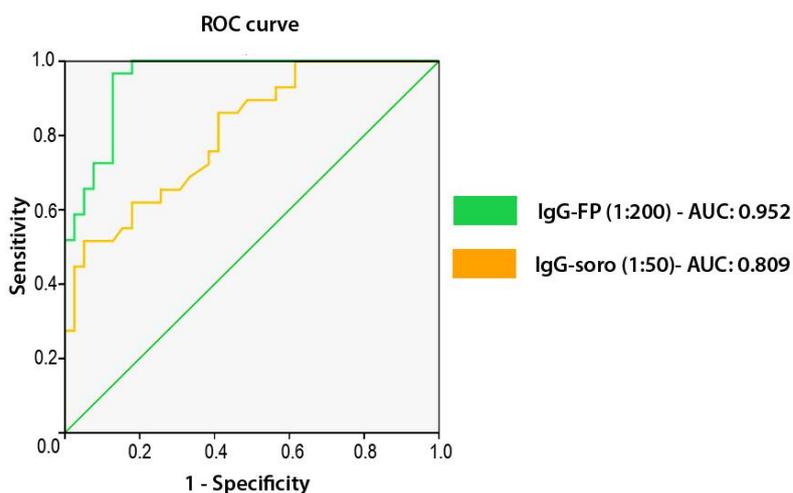


Figura 17 - Curvas ROC: IgG para o antígeno fusionado MT10.3:MPT64 nas diferentes diluições de soro e Fluido pleural (FP) ensaiadas. AUC: área sob a curva (*Area Under the Curve*).

5.1.9 ELISA “in house” na detecção de IgA e IgG reativas à quimera proteica F2 em FP e soro de pacientes TBpl e OPL.

Os testes de ELISA IgA-F2 em soro (1:25 a 1:200) e FP (1:50) foram, realizados com os tampões PBSt 0,01% e PBST 0,01-BSA 1%. Médias de imunoreatividade significativamente aumentadas em TBpl vs OPL foram obtidas na detecção de IgA em FP ($p \leq 0,0001$) e nas diferentes diluições do soro (1:25 a 1:200) ($p \leq 0,0006$) (figura 18 e tabela 6, páginas 58 e 67, respectivamente).

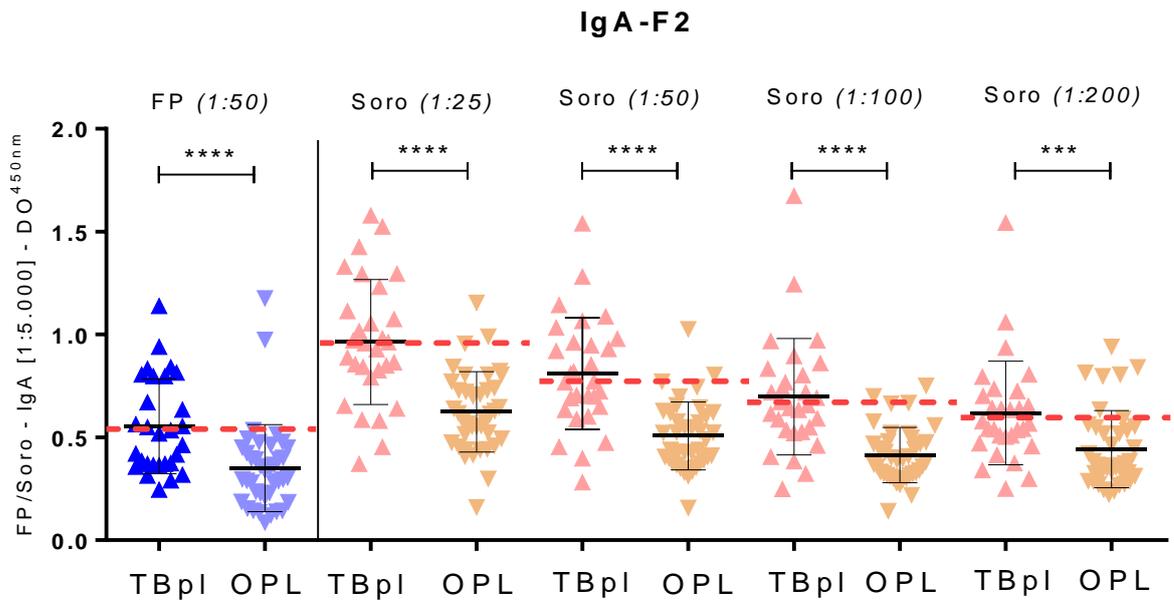


Figura 18 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à quimera proteica F2, de líquido pleural (1:50) e soro (1:25, 1:50, 1:100 e 1:200) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=29) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL, n=39). ----- Linha vermelha pontilhada representa o *cut off* do teste estabelecido.

A figura 19 (página 58) apresenta as curvas ROC de IgA-F2 em FP e soro diluídos respectivamente a 1:50 (AUC: 0.774; $p \leq 0,0001$), e de 1:25 a 1:200 AUC de 0.837, 0.844, 0.847 e 0.879 ($p \leq 0,0006$). Apesar de apresentar diferença significativa entre os grupos testados nos diferentes ensaios aqui propostos, nenhum ELISA para detecção de IgA-F2 mostrou AUC próxima de 1,0.

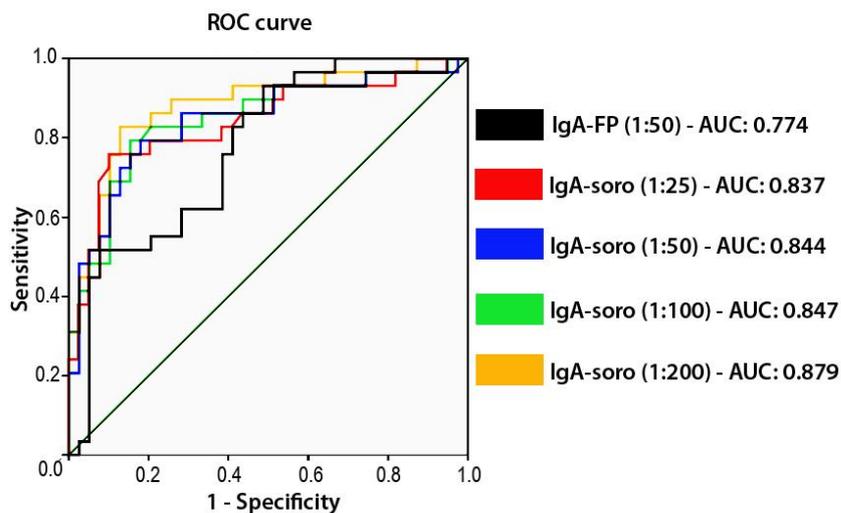


Figura 19 – Curvas ROC: IgA para a quimera proteica F2 nas diferentes diluições de soro e fluido pleural (FP) ensaiadas. AUC: área sob a curva (*Area Under the Curve*).

O ELISA IgG-F2 em soro, individualmente, foram feitos com os tampões PBSt 0,01% e PBST 0,01-BSA 1%, e na diluição seriada de 1:200 a 1:1.600. Reatividades média com diferenças significativas entre TBpl vs OPL ($p < 0.031$) foi obtida apenas para as diluições de soro 1:800 e 1:1.600 (figura 20 e tabela 6, páginas 59 e 67, respectivamente).

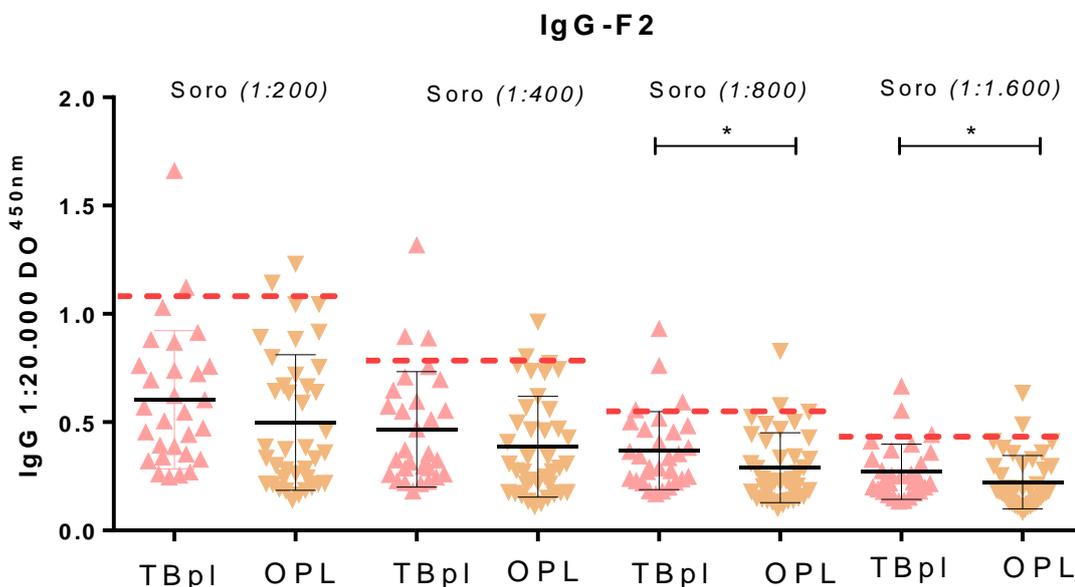


Figura 20 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgG, reativas à quimera proteica F2, de soro (1:200, 1:400 e 1:800 e 1:1.600) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=39) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL, n=29). ----- Linha vermelha pontilhada representa o *cut off* do teste estabelecido.

Curvas ROC nos soros diluídos de 1:200 a 1:1600 para a detecção de IgG-F2 mostram AUC de 0.622, 0.609, 0.660, 0.663 ($p > 0.031$), respectivamente (figura 21, página 60). Os ensaios para detecção de IgA-F2 mostraram baixos valores de AUC, bem inferiores ao ideal 1,0, conferindo menor poder descritório entre TBpl e OPL nesses testes.

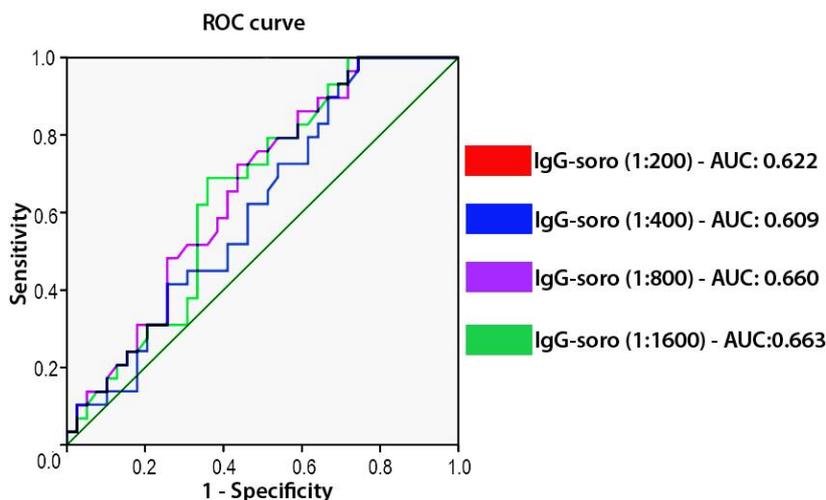


Figura 21 – Curvas ROC: IgG para a quimera proteica F2 nas diferentes diluições de soro ensaiadas. AUC: área sob a curva (*Area Under the Curve*).

5.1.10 ELISA “in house” para a proteína PPE59 detectou diferenças significativas de médias de reatividade de IgA em FP e soro e IgG apenas no soro, entre pacientes TBpl e OPL.

No ELISA IgA-PPE59 de soros (1:50 e 1:100) e FP (1:100), individualmente, foram usados os mesmos tampões especificados na tabela 1. Foi obtido detecção média de IgA significativamente aumentada em TBpl x OPL em FP ($p \leq 0,0001$) e nas diluições do soro (1:50, $p = 0,0007$ e 1:100, $p \leq 0,0001$) (figura 22 e tabela 6, páginas 60 e 67, respectivamente).

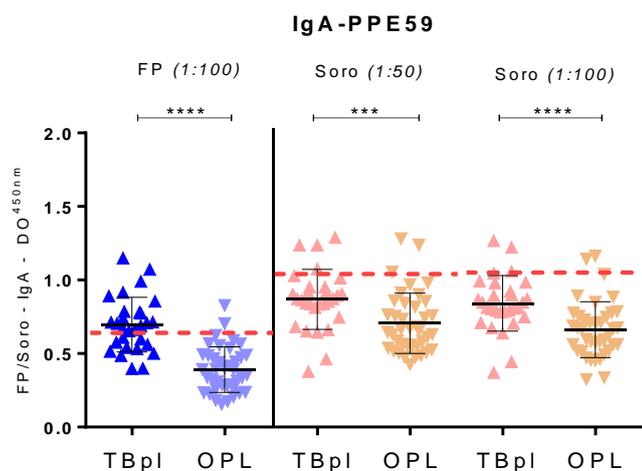


Figura 22 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à proteína PPE59, de soro (1:50 e 1:100) e fluido pleural (1:100) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=30) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL, n=29). ----- Linha vermelha pontilhada representa o *cut off* do teste estabelecido.

A figura 23 (página 61) apresenta as curvas ROC de IgA-PPE59 de FP e soros diluídos, respectivamente a 1:100 (AUC: 0,904; $p \leq 0,0001$), e 1:50 e 1:100 (AUC: 0,736 e 0,785; $p \leq 0,0007$). Para esses ensaios, o uso do FP mostrou maior poder de distinção entre pacientes TBpl e OPL, uma vez que, apresentou maior AUC e mais próxima do 1,0, o que não foi obtido com o soro.

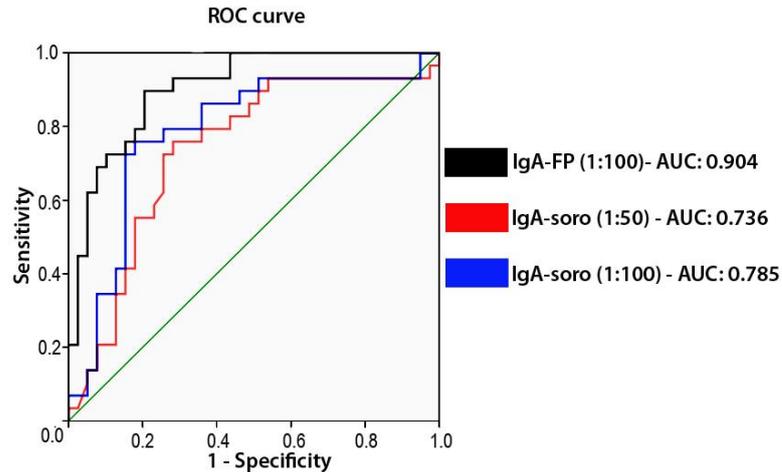


Figura 23 – Curvas ROC: IgA para a proteína PPE59 nas diferentes diluições de soro e fluido pleural (FP) ensaiadas. AUC: área sob a curva (*Area Under the Curve*).

No ELISA IgG-PPE59 de soros (1:50 e 1:100) foi obtida diferença significativa nas reatividades médias entre TBpl x OPL ($p=0.0006$) apenas com o soro diluído a 1:100 (figura 24 e tabela 6, páginas 61 e 67, respectivamente). As curvas obtidas com o soro diluído a 1:50 e 1:100 apresentaram os valores de área sob a curva de 0,591 e 0,711, respectivamente (figura 25, página 62). Assim, foram obtidos valores de AUC muito inferiores ao ideal 1,0, principalmente para o soro (1:50), atribuindo menor poder descritório entre TBpl e OPL nesses testes.

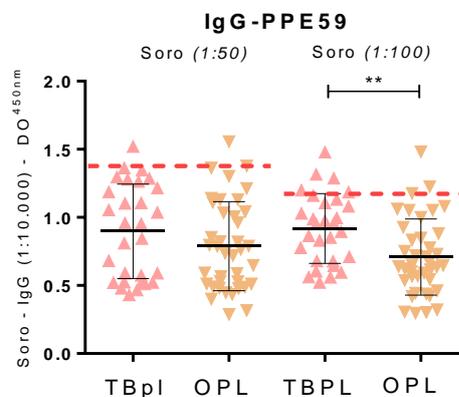


Figura 24 – Distribuição da resposta humoral na detecção de IgG, reativas à proteína PPE59, de soro (1:50 e 1:100) de pacientes com TB pleural (TBpl, n=29) e

com outras pleurisas não tuberculosa (OPL, n=39). ----- Linha vermelha pontilhada representa o *cut off* do teste estabelecido.

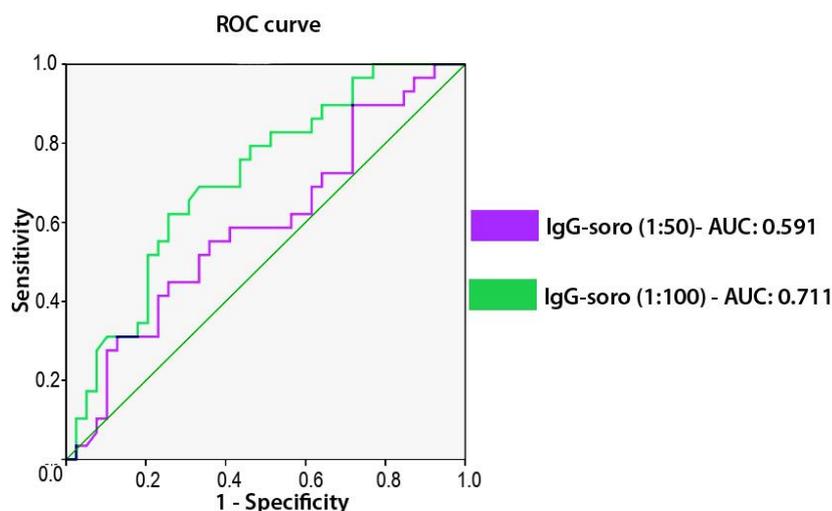


Figura 25 – Curvas ROC: IgG para a proteína PPE59 nas diferentes diluições de soro ensaiadas. AUC: área sob a curva (*Area Under the Curve*).

5.1.11 Detecção de IgA por ELISA “in house” para a proteína MT10.3 nas diferentes diluições de soro e FP de pacientes TBpl e OPL

A tabela 6 mostra que houve diferenças significativas de médias de reatividade entre TBpl vs OPL apenas na detecção de IgA em FP ($p \leq 0,0001$) e no soro (1:100) ($p=0.012$) (figura 26 e tabela 6, páginas 62 e 67, respectivamente).

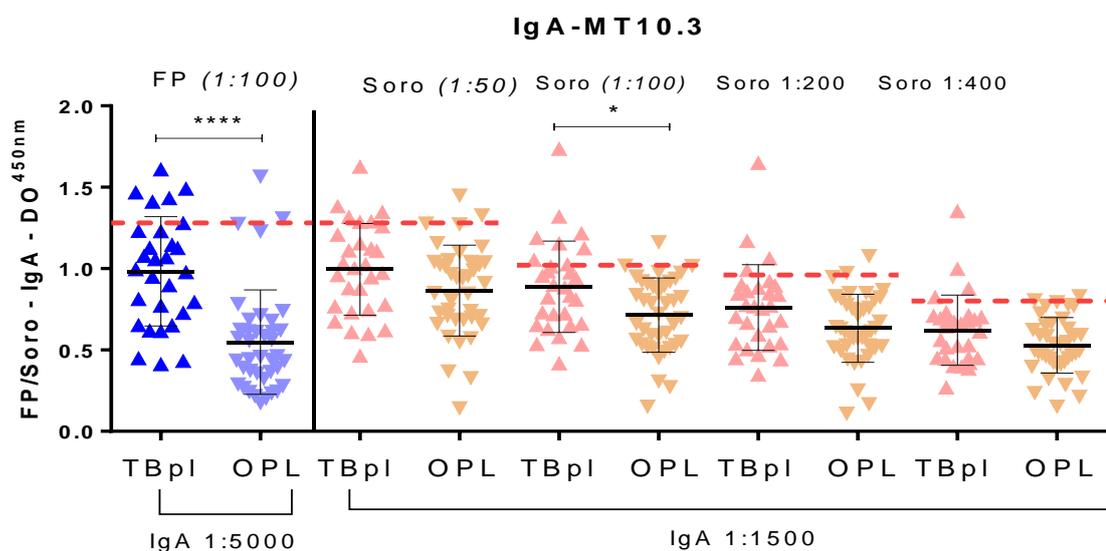


Figura 26 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à proteína de fusão MT10.3, de líquido pleural (1:50) e soro (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=29) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL, n=39). ----- Linha vermelha pontilhada representa o *cut off* do teste estabelecido.

A figura 27 (página 63) apresenta as curvas ROC de IgA-MT10.3 de FP diluído a 1:100 (AUC: 0.852; $p \leq 0,0001$), e soros diluídos respectivamente a 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 (AUC: 0.625, 0.678, 0.636 e 0.608; $p > 0.130$). Dessa forma, foi obtido menor poder descritório entre TBpl e OPL nesses testes, uma vez que, valores de AUC foram inferiores ao ideal 1,0.

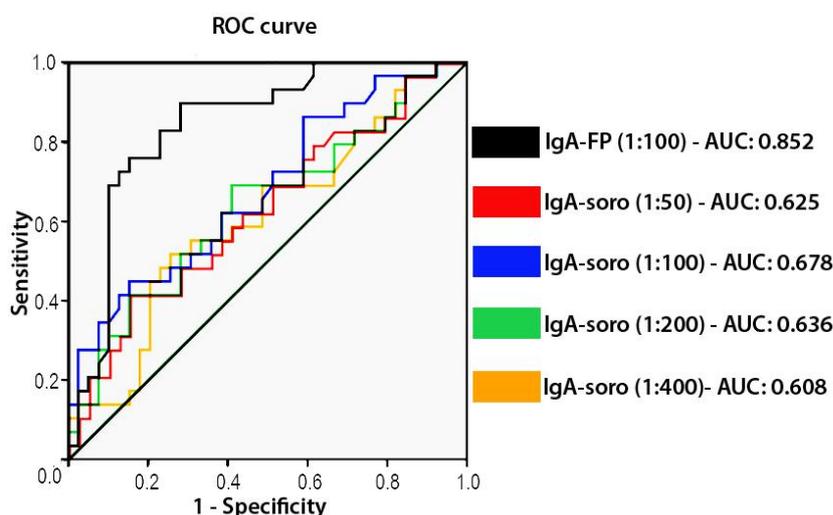


Figura 27– Curvas ROC: IgA para a proteína MT10.3 nas diferentes diluições de soro e líquido pleural (FP) ensaiadas. AUC: área sob a curva (*Area Under the Curve*).

5.1.12 Diferença significativa nas médias de reatividade de IgA entre pacientes TBpl e OPL foi evidenciado no ELISA “in house” para MPT64 em todas as diluições de soro e no FP.

ELISA IgA-MPT64 apresentou reatividades médias significativamente aumentadas em soro (na diluição seriada de 1:50 a 1:400, $p < 0.0058$) e FP (na diluição 1:100, $p \leq 0,0001$) utilizando os tampões PBSt 0,01% e PBST 0,01-BSA 1% em TBpl x OPL, como mostrado na figura 28 e tabela 6 (páginas 64 e 67, respectivamente).

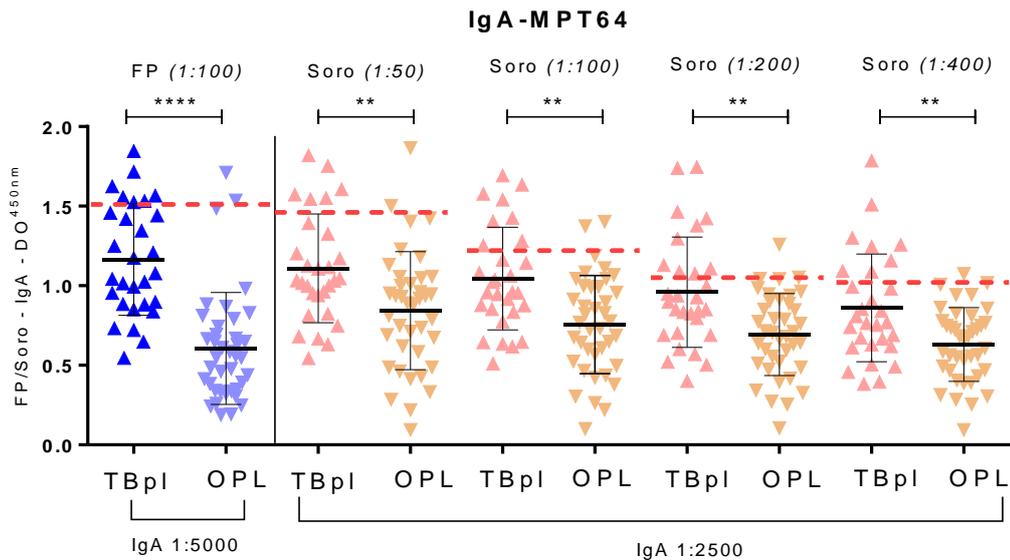


Figura 28 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA, reativas à proteína MPT64, de líquido pleural (1:50) e soro (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=29) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL, n=39). ----- Linha vermelha pontilhada representa o *cut off* do teste estabelecido.

Análise de curva ROC mostra valores de AUC de 0.708, 0.729, 0.717 e 0.695 ($p < 0.006$), respectivamente para diluições dos soros de 1:50 a 1: 400 e AUC de 0.887 ($p \leq 0,0001$) no FP (figura 29, página 64)). Logo, para o IgA-MPT64 também foi evidenciado valores de AUC reduzidos, diminuindo a eficácia desse teste quanto a distinção de pacientes TB e aqueles que não albergam a doença.

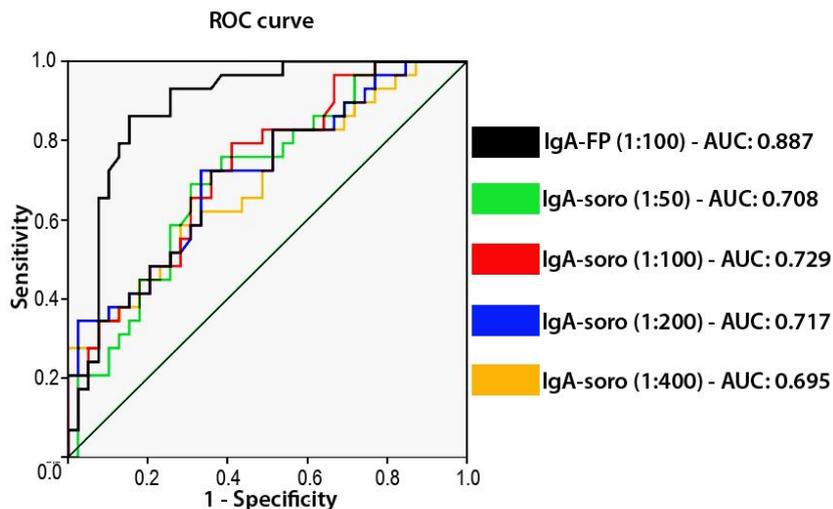


Figura 29 – Curvas ROC: IgA para a proteína MPT64 nas diferentes diluições de soro e fluido pleural (FP) ensaiadas. AUC: área sob a curva (*Area Under the Curve*).

5.1.13 ELISA “in house” para detecção de IgG mostrou diferença significativa nas médias de reatividade no soro entre pacientes TBpl e OPL para a proteína MT10.3, mas não para MPT64.

ELISA foi realizado com os tampões PBSt 0,01% e PBST 0,01-BSA 1%, e soro na diluição 1:400. As reatividades médias mostraram diferenças significativas entre TBpl x OPL ($p=0.006$) somente no soro (1:400) para o Ag MT10.3, entretanto, poucos pacientes TBpl responderam acima do *cut off* estabelecido (figura 30 e tabela 6, páginas 65 e 67, respectivamente).

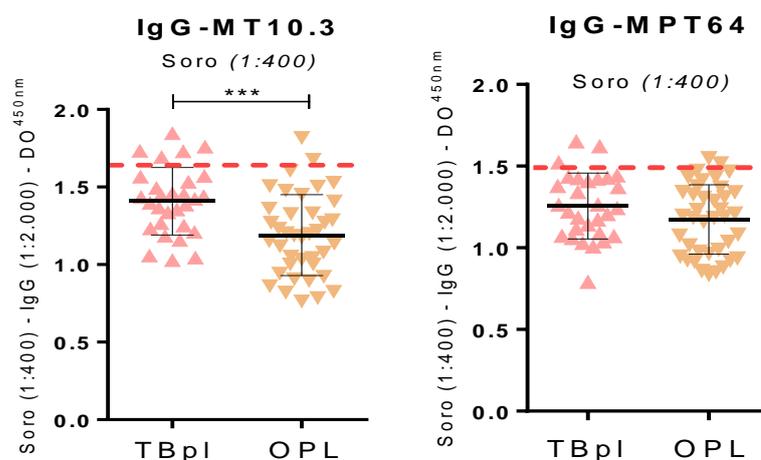


Figura 30 - Distribuição da resposta humoral na detecção de IgG, reativas as proteínas MT10.3 e MPT64 separadamente, de soro (1:400) de pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=29) e com outras pleurisas não tuberculosa (OPL, n=39). ----- Linha vermelha pontilhada representa o *cut off* do teste estabelecido.

As curvas ROC obtidas nas diferentes diluições de soro para MT10.3 mostraram UAC de 0.739 ($p<0.006$) e para MPT64 AUC baixa de 0.609 ($p=0.129$) (figura 31, página 66). Portanto, para ambos os Ags não foram observados valores de AUC satisfatórios na detecção de IgG em soro.

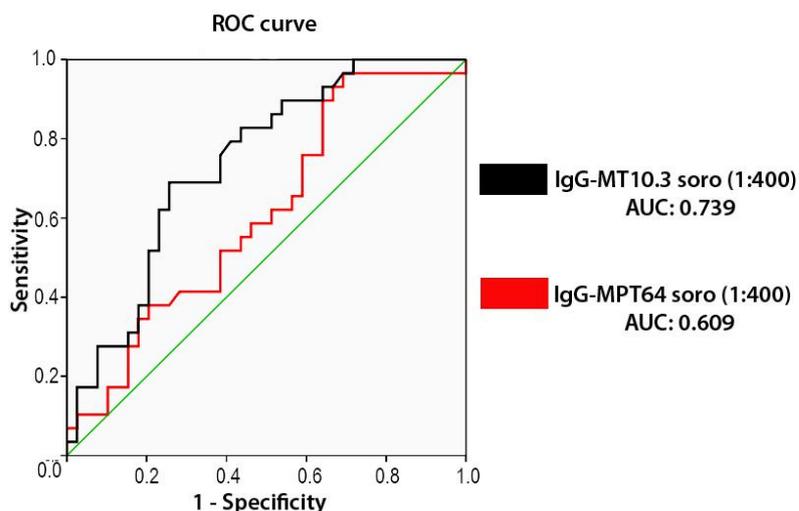


Figura 31 – Curvas ROC: IgG para as proteínas MT10.3 e MPT64 nas diferentes diluições de soro e fluido pleural (FP) ensaiadas. AUC: área sob a curva (*Area Under the Curve*).

5.1.14 Avaliação dos resultados do ELISA “in house” separados ou em combinação para os diferentes antígenos testados.

A tabela 6 (página 67) mostra a sensibilidade (S), especificidade (Sp), o *cut off*, p valor e AUC nas diferentes diluições das amostras, para os diferentes Ags micobacterianos utilizados. Maior sensibilidade foi obtida para IgA e IgG-Mt10.3:MPT64, em soro e FP, respectivamente, na diluição de 1:50 e com excelente especificidade. Esta positividade não foi obtida para nenhum outro Ag testado individualmente.

De acordo com a curva ROC, ao fixar especificidade a 95%, uma alta positividade de FP IgA-MT10.3:MPT64 foi confirmada, registrando as melhores sensibilidades em diluições de 1:50 e 1: 200 (86,2 %), seguido por 82,8%, a 1:400. FP IgA-PPE59 (62,1%) e -F2 (44,8%) provocaram sensibilidades moderadas e baixas, nas diluições de 1: 100 e 1:50, respectivamente. Todos os testes mostraram $AUC > 0,904$, exceto para F2. A IgA-F2 sérica alcançou a melhor positividade (51,7%) nas diluições de 1:25 e 1:50 e $AUC < 0,844$. O único antígeno para detectar pacientes PLTB com alta AUC (0,952) foi a proteína de fusão MT10.3: MPT64, com sensibilidade de 65,5% no FP na diluição de 1:200, diminuindo para 51,7% no soro a uma diluição de 1:50 $AUC = 0,809$.

Tabela 6 – Parâmetros de validade do teste de ELISA para a detecção do anticorpo IgA e IgG contra diferentes Ag micobacterianos, MT10.3, MPT64, PPE59, a fusão MT10.3:MPT64 e a quimera proteica F2, nas diferentes diluições de FP e soro.

Teste de ELISA (diluição da amostra)	TBpl (n=29)	OPL (n=39)	p valor ¹	Cut off	AUC	Sensibilidade (%) (Número +)	Especificidade (%) (Número -)
	Média ± DP	Média ± DP					
IgA-(FP)							
MT10.3 (1:100)	0.983 ± 0.336	0.548 ± 0.321	*	1.278	0.852	20.7 (6)	95 (37)
MPT64 (1:100)	1.164 ± 0.350	0.606 ± 0.352	*	1.505	0.887	24.1 (7)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:50)	0.821 ± 0.213	0.387±0.188	*	0.658	0.949	86.2 (25)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:100)	0.667 ± 0.195	0.302±0.138	*	0.598	0.950	65.5 (19)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:200)	0.542 ± 0.154	0.232±0.093	*	0.385	0.968	86.2 (25)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:400)	0.433 ± 0.126	0.185±0.060	*	0.311	0.980	82.8 (24)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:800)	0.323 ± 0.125	0.209±0.094	*	0.404	0.823	27.6 (8)	95 (37)
PPE59 (1:100)	0.696 ± 0.186	0.392 ± 0.155	*	0.639	0.904	62.1 (18)	95 (37)
F2 (1:50)	0.553 ± 0.230	0.351 ± 0.212	*	0.542	0.774	44.8 (13)	95 (37)
IgA-(soro)							
MT10.3 (1:50)	0.996 ± 0.282	0.865 ± 0.279	0.081	1.282	0.625	20.7 (6)	95 (37)
MT10.3 (1:100)	0.888 ± 0.281	0.714 ± 0.228	0.012	1.018	0.678	27.6 (8)	95 (37)
MT10.3 (1:200)	0.760 ± 0.263	0.634 ± 0.209	0.057	0.962	0.636	13.8 (4)	95 (37)
MT10.3 (1:400)	0.622 ± 0.216	0.528 ± 0.172	0.130	0.799	0.608	13.8 (4)	95 (37)
MPT64 (1:50)	1.109 ± 0.341	0.843 ± 0.371	0.003	1.462	0.708	20.7 (6)	95 (37)
MPT64 (1:100)	1.045 ± 0.323	0.757 ± 0.308	*	1.220	0.729	27.6 (8)	95 (37)
MPT64 (1:200)	0.959 ± 0.347	0.693 ± 0.258	0.002	1.048	0.717	34.5 (10)	95 (37)
MPT64 (1:400)	0.860 ± 0.338	0.630 ± 0.231	0.006	1.012	0.695	27.6 (8)	95 (37)
MT10.3:MPT64 (1:50)	1.176 ± 0.338	0.621±0.282	*	1.267	0.905	44.8 (13)	95 (37)
PPE59 (1:50)	0.868 ± 0.204	0.706 ± 0.206	*	1.042	0.736	13.8 (4)	95 (37)
PPE59 (1:100)	0.841 ± 0.189	0.663 ± 0.190	*	1.043	0.785	13.8 (4)	95 (37)
F2 (1:25)	0.963 ± 0.304	0.624±0.195	*	0.957	0.837	51.7 (15)	95 (37)
F2 (1:50)	0.810 ± 0.271	0.507±0.165	*	0.772	0.844	51.7 (15)	95 (37)
F2 (1:100)	0.698 ± 0.282	0.414±0.134	*	0.670	0.847	48.3 (14)	95 (37)
F2 (1:200)	0.619 ± 0.252	0.443±0.188	*	0.591	0.879	44.8 (13)	95 (37)
IgG-(FP)							
MT10.3-MPT64 (1:200)	0.840 ± 0.352	0.347±0.126	*	0.616	0.952	65.5 (19)	95 (37)
IgG-(soro)							
MT10.3:MPT64 (1:50)	0.863 ± 0.196	0.636±0.195	*	0.891	0.809	51.7 (15)	95 (37)
MT10.3 (1:400)	1.409 ± 0.218	1.190 ± 0.261	*	1.641	0.739	17.2 (5)	95 (37)
MPT64 (1:400)	1.256 ± 0.201	1.173 ± 0.213	0.129	1.490	0.609	10.3 (3)	95 (37)
PPE59 (1:50)	0.918 ± 0.252	0.789 ± 0.327	0.204	1.370	0.591	3.4 (1)	95 (37)
PPE59 (1:100)	0.898 ± 0.346	0.709 ± 0.279	0.003	1.181	0.711	17.2 (5)	95 (37)
F2 (1:200)	0.604 ± 0.319	0.499 ± 0.313	0.087	1.084	0.622	6.9 (2)	95 (37)
F2 (1:400)	0.467 ± 0.267	0.387 ± 0.232	0.127	0.787	0.609	10.3 (3)	95 (37)
F2 (1:800)	0.369 ± 0.180	0.289 ± 0.161	0.024	0.552	0.660	13.8 (4)	95 (37)
F2 (1:1600)	0.271 ± 0.127	0.223 ± 0.123	0.031	0.427	0.663	10.3 (3)	95 (37)

Resultados dos níveis médios de IgA e IgG em densidade óptica (D.O.) e seus desvios padrão (DP). ¹ Diferença significativa da produção de IgA/IgG entre os grupos e entre os antígenos testados foi calculada pelo teste de Mann Whitney (p<0,001*). TBpl: pacientes com tuberculose pleural; OPL: pacientes com outras doenças pleurais não tuberculosas; AUC: área sob a curva.

Vale destacar que, ao combinar os resultados dos ensaios FP-IgA-MT10.3:MPT64 (1:50) -MPT64 (1:100) ou -F2 (1:50), ou IgA-MT10.3:MPT64 / -PPE59 (1:200/1:100, respectivamente), a sensibilidade aumentou para 89,6% sem comprometer a especificidade (94,9%) (Tabela 7, páginas 68 e 69). Estes resultados não foram obtidos para quaisquer outros Ags testados, embora os resultados combinatórios do ensaio FP-IgA-MT10.3:MPT64 / -PPE59 (1:50/1:100) e IgA/IgG-

MT10.3:MPT64 tenham apresentado maior sensibilidade (93,1%), foi observado uma ligeira diminuição na especificidade (92,3%), enquanto a IgG no soro (1:50/1:800 ou 1:1600) levou a um melhor resultado de combinação (55,1%) para ambas as proteínas de fusão MT10.3:MPT64 / F2, mas também com diminuição na especificidade (>92,3%). Outros resultados combinatórios de antígeno IgA e/ou IgG atingiram sensibilidades moderadas e altas (>68%), porém comprometendo a especificidade (89,7%) (Tabela 7, páginas 68 e 69).

Tabela 7 – Sensibilidade (S) e especificidade (Sp) dos resultados combinatórios de IgA e/ou IgG-MT10.3:MPT64 com PPE59, MT10.3, MPT64 e F2, no líquido pleural e no soro, em diferentes diluições, de pacientes com tuberculose pleural (PLTB) e outras pleurisias não TB (OPL).

<i>Resultados combinatórios de MT10.3:MPT64 (diluição da amostra)</i>	<i>TBpl (N=29) N. Positivos S (%)</i>	<i>OPL (N=39) N. Negativos Sp (%)</i>
Fluido Pleural - IgA		
(1:50) / PPE59 (1:100)	27 (93.1)	36 (92.3)
(1:100)/ PPE59 (1: 100)	24 (82.7)	37 (94.8)
(1:200) / PPE59 (1:100); (1:50) / MPT64 (1:100); (1:50) / F2 (1:50)	26 (89.6)	37 (94.8)
(1:400)/ PPE59 (1:100); (1:50) or/(1:200) or/(1:400) / MT10.3 (1:100)	26 (89.6)	36 (92.3)
(1:800) / PPE59 (1:100); (1:100) / MT10.3 (1:100)	21 (72.4)	36 (92.3)
(1:800) / MT10.3 (1:100)	12 (41.3)	35 (89.7)
(1:100) / MPT64 (1:100)	20 (68.9)	36 (92.3)
(1:200) / MPT64 (1:100) or / F2 (1:50) or / MT10.3:MPT64.serum1.50	25 (86.2)	36 (92.3)
(1:400) / MPT64 (1:100) or / F2 (1:50)	24 (82.7)	36 (92.3)
(1:800) / MPT64 (1:100)	14 (48.2)	35 (89.7)
(1:100) / F2 (1:50)	22 (75.8)	36 (92.3)
(1:800) / F2 (1:50)	18 (62)	35 (89.7)
(1:50) / MT10.3-MPT64.serum1.50	26 (93.1)	35 (89.7)
(1:1000) / MT10.3-MPT64.serum1.50	19 (65.5)	36 (92.3)
(1:400) / MT10.3:MPT64.serum1.50	25 (86.2)	35 (89.7)
(1:800) / MT10.3:MPT64.serum1.50	15 (51.7)	36 (92.3)
Soro - IgA		
(1.50) / PPE59 (1.50 or 1:100) or / MPT64 (1:400)	13 (44.8)	35 (89.7)
(1.50) / MT10.3 (1:50 or 1:100 or 1:200); or / MPT64 (1:100)	14 (48.2)	35 (89.7)
(1.50) / MT10.3 (1:400)	15 (51.7)	35 (89.7)
(1.50) / MPT64 (1:50)	13 (44.8)	36 (92.3)
(1.50) / MPT64 (1:200)	14 (48.2)	36 (92.3)
(1.50) / F2 (1:25)	20 (68.9)	35 (89.7)
(1.50) / F2 (1:50 or 1:100)	19 (65.5)	35 (89.7)
(1.50) / F2 (1:200)	17 (58.6)	35 (89.7)
Soro - IgG		
(1:50) / MT10.3-MPT64 (1:200)	21 (72.4)	35 (89.7)
(1:50) / PPE59 (1:50) or / F2 (1:200)	15 (51.7)	35 (89.7)
(1:50) / PPE59 (1:100) or / MPT64 (1:400)	16 (55.1)	35 (89.7)
(1:50) / MT10.3 (1:400)	18 (62)	35 (89.7)
(1:50) / F2 (1:400)	15 (51.7)	36 (92.3)
(1:50) / F2 (1:800 or 1:1600)	16 (55.1)	36 (92.3)
Fluido Pleural - IgA/IgG		
(1:50)/ MT10.3:MPT64 (1:200)	27 (93.1)	36 (92.3)

(1:100)/MT10.3-MPT64 (1:200)	24 (82.7)	35 (89.7)
(1:200)/ MT10.3-MPT64 (1:200)	27 (93.1)	35 (89.7)
(1:400)/ MT10.3-MPT64 (1:200)	28 (96.5)	35 (89.7)
(1:800)/ MT10.3-MPT64 (1:200)	21 (72.4)	35 (89.7)
Soro – IgA		
(1:50) / IgG-MT10.3:MPT64 (1:50)	22 (75.9)	35 (89.7)

A reatividade cruzada global foi principalmente associada com câncer (12/25), entretanto, apenas uma diluição de FP (1:50) foi associado à proteína de fusão IgA-MT10.3:MPT64, bem como uma diluição de FP em pacientes com insuficiência cardíaca (3/5), sendo que estes tiveram resultados positivos para o ensaio *QuantiFERON®-TB Gold In-Tube* (QFT-GIT) (dados não mostrados). Além disso, duas amostras de um terceiro paciente com insuficiência cardíaca também tiveram resultados positivos no QFT-GIT, com exame histopatológico inespecífico e foram positivos no ELISA IgA-F2 para FP (1:50) aqui testado. De fato, entre todos os 18 casos OPL que tiveram resultados positivos no ELISA para qualquer um dos Abs, Ags e/ou fluidos corporais, quatro (22%) também tiveram resultados positivos para QFT-GIT. Esses resultados podem sugerir infecção latente por Mtb (LTBI).

5.1.15 Comparação de testes-padrão e ADA com as respostas imunes no diagnóstico de tuberculose pleural.

Considerando os melhores resultados de IgA e IgG para FP e soro com diferentes antígenos, hipotetizamos que estes seriam mais precisos em comparação com outros testes tradicionais utilizados para diagnosticar TBpl. Como visto na Tabela 8 (página 71), FP-ADA (S = 79,3% e Sp = 94,9%) ou histopatológica da biópsia pleural (S = 69,2%, 9/13 e Sp = 76,2%, 16/21) apresentaram menor acurácia em comparação com o ELISA IgA-MT10.3:MPT64 no FP (1:50) e seus resultados combinados com /MPT64 (1:100) ou /F2 (1:50), que demonstraram S ≥ 89,6% e Sp = 94,9%. Assim, o ELISA IgA no FP apresentou positividade semelhante à dos testes convencionais, entretanto, vale ressaltar a positividade do teste imunológico entre aqueles que tiveram resultados negativos no diagnóstico da TBpl pelos testes convencionais. Apesar de nem todos os indivíduos terem sido examinados pelo exame histopatológico, 15,3% eram inespecíficos, porém foram identificados com resultados positivos nos testes de ELISA aqui realizados. Também foram identificados pelo ELISA aqueles casos de TBpl sem exame histopatológico confirmado (12/16, 75%). Assim, o ELISA resultou em uma sensibilidade geral de

86,2% vs 69,2% do exame histopatológico. Por outro lado, a maioria dos casos TBpl que apresentaram resultados negativos no ADA apresentaram positividade no ELISA IgA-MT10.3:MPT64 no FP diluído a 1:50 (5/6), bem como seus resultados combinatórios com /MPT64 diluído 1:100 ou /F2 diluído 1:50 (5/6, respectivamente).

Entre os testes microbiológicos utilizados para o diagnóstico da TB, a coloração de BAAR é mais utilizado por ser de fácil execução, rápido e barato, embora apresente baixas sensibilidades, enquanto as culturas, apesar de mais precisas, são laboriosas e demoradas. Embora esses testes não tenham sido realizados em todos os pacientes, seu desempenho foi baixo (> 25%), como esperado em casos paucibacilares, como TBpl. Entretanto, os testes imunológicos propostos neste estudo demonstraram significativamente melhores acurácias (variando de 51,7% a 89,6%) para IgG ou IgA em ambas as amostras clínicas, no soro (51,7% ou 44,8%) ou FP (65,5% ou > 86%, respectivamente), especialmente para o resultados combinatórios de FP (1:50) IgA-MT10.3:MPT64/F2. Nenhum dos outros resultados combinatórios levou a melhor reatividade (Tabelas 7 e 8, páginas 68 e 71, respectivamente).

Uma das desvantagens do teste imunológico para detecção de Ac é a heterogeneidade da resposta imune entre os pacientes (SAMANICH; BELISLE; LAAL, 2001; ABEBE *et al.*, 2007; PATHAKUMARI *et al.*, 2016). Como o presente estudo avaliou um pequeno número de antígenos ou seus peptídeos fusionados, alguns dos pacientes não responderam. Assim, os resultados do teste imunológico combinado com os resultados da ADA foram avaliados visando uma melhora na performance do diagnóstico da TBpl, uma vez que o teste da ADA foi também realizado para todos os pacientes. Os resultados combinados de FP (1:50) IgA-MT10.3-MPT64/-F2 e ADA proporcionaram a melhor sensibilidade (96,6%, 28/29) para a detecção de TBpl, com especificidade de 92,3% (36/39).

Tabela 8 - Os melhores resultados do ELISA comparados com os testes convencionais microbiológicos, histopatológicos e de adenosina deaminase (ADA) determinados em amostras de líquido pleural (FP) e / ou biópsia pleural (PB) para diagnóstico de infecção pleural tuberculosa (TBpl).

Teste Diagnóstico	Número (%)	TBpl (n=29)												Número (%)	OPL (n=39)													
		ELISA MT10.3:MPT64 (Número de positivos %)													ELISA MT10.3:MPT64 (Número de positivos %)													
		IgA						IgG							IgA						IgG							
		FP (1:50) ¹		Soro (1:50) ¹		Combinação com MPT64 ²		Combinação com F2 ²		FP (1:200) ¹		Soro (1:50) ¹				FP (1:50) ¹		Soro (1:50) ¹		Combinação com MPT64 ²		Combinação com F2 ²		FP (1:200) ¹		Soro (1:50) ¹		
ADA FP																												
Positivo	23 (79.3)	20		12		21		21		17		12		2 (5.1)	0		1		1		0		0		0		0	
Negativo	6 (20.7)	5	86.2	1	44.8	5	89.6	5	89.6	2	65.5	3	51.7	37(94.9)	2	5.1	1	5.1	1	5.1	2	5.1	2	5.1	2	5.1	2	5.1
AFB FP																												
Positivo	0	0		0		0		0		0		0		0	0		0		0		0		0		0		0	
Negativo	28 (96.6)	24	86.2	12	44.8	25	89.6	25	89.6	19	65.5	15	51.7	35(100)	2	7.6	2	5.1	2	5.1	2	5.1	2	5.1	2	7.6	2	5.1
Sem informação	1 (3.4)	1		1		1		1		0		0		4 (10.3)	1		0		0		0		0		1		0	
AFB Biópsia pleural																												
Positivo	0	0		0		0		0		0		0		0	0		0		0		0		0		0		0	
Negativo	6 (100)	6	86.2	4	44.8	6	89.6	6	89.6	4	65.5	3	51.7	4 (100)	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1
Sem informação	23 (79.3)	19		9		20		20		15		12		35(89.7)	2		2		2		2		2		2		2	
Cultura (FP)																												
Positivo	4 (14.3)	3		2		3		3		3		2		0	0		0		0		0		0		0		0	
Negativo	24 (85.7)	21	86.2	10	44.8	22	86.2	22	86.2	16	65.5	13	51.7	36(100)	1	5.1	2	5.1	2	5.1	2	5.1	2	5.1	1	2.5	2	5.1
Sem informação	1 (3.4)	1		1		1		1		0		0		3 (7.7)	1		0		0		0		0		0		0	
Cultura (fragmento de pleura) para Mtb																												
Positivo	1 (25)	1		0		1		1		1		1		0	0		0		0		0		0		0		0	
Negativo	4 (80)	4	86.2	3	44.8	4	86.2	4	86.2	2	55.2	1	58.6	3 (100)	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1
Sem informação	24 (82.8)	20		10		21		21		13		16		36(92.3)	2		2		2		2		2		2		2	
Exame histopatológico (fragmento de pleura)																												
Sugestivo para TB	9 (69.2)	9		1		9		9		6		3		0	0		0		0		0		0		0		0	
Negativo	2 (15.3)	2	86.2	1	13.7	2	86.2	2	86.2	2	65.5	2	51.7	16(79.2)	1	5.1	1	5.1	1	5.1	0	5.1	1	5.1	1	5.1	0	5.1
Não-específico	2 (15.3)	2		1		2		2		2		2		5 (23.8)	0		1		1		1		1		0		1	
Sem informação	16 (55.2)	12		10		13		13		9		8		18(46.2)	1		0		0		1		1		1		1	

¹ diluição FP; ² resultados combinatórios de IgA-MT10.3-MPT64 no FP diluído a 1:50 com -MPT64 (1:100) ou -F2 (1:50). OPL: pacientes com outras prleurisias não tuberculosa

5.2 dot-ELISA para a detecção de TB pleural

5.2.1 Padronização e otimização dot-ELISA com a proteína de fusão MT10.3:MPT64 para IgA e IgG em soro e FP.

Foram utilizadas as mesmas diluições para os espécimes clínicos, anticorpos e Ags (MT10.3:MPT64, F2 e PPE59) do teste de ELISA convencional padronizado (tabela 1, página 42). Este teste foi realizado apenas com os Ags que foram melhor reconhecidos por IgA e IgG em soro ou FP.

Os resultados globais da padronização estão mostrados na figura 38. Reatividade entre *pools* de pacientes com TBpl e OPL de soro e FP, foram obtidas para MT10.3:MPT64-IgG e -IgA, respectivamente, bem como para as outras proteínas. Entretanto, melhores reatividades de IgA e IgG foram obtidas, respectivamente, com o FP e soro para a proteína fusionada MT10.3:MPT64, sendo esta reativa ao TBpl, mas não ao OPL (figuras 32C, D, E, F, página 74). Para IgA em soro a proteína de fusão não demonstrou bons parâmetros de padronização, sendo reativa a ambos em grupos testados (figura 39A). As outras proteínas PPE59 e F2 embora reativas ao TBpl, também mostraram reação inespecífica no *pool* de OPL (figura 32, página 74) e, portanto, foi descontinuado sua utilização nesse teste. Assim, MT10.3:MPT64 foi a proteína de escolha para demonstrar conceitualmente ser um marcador útil para desenvolver um teste rápido e prático para auxiliar o diagnóstico da TBpl.

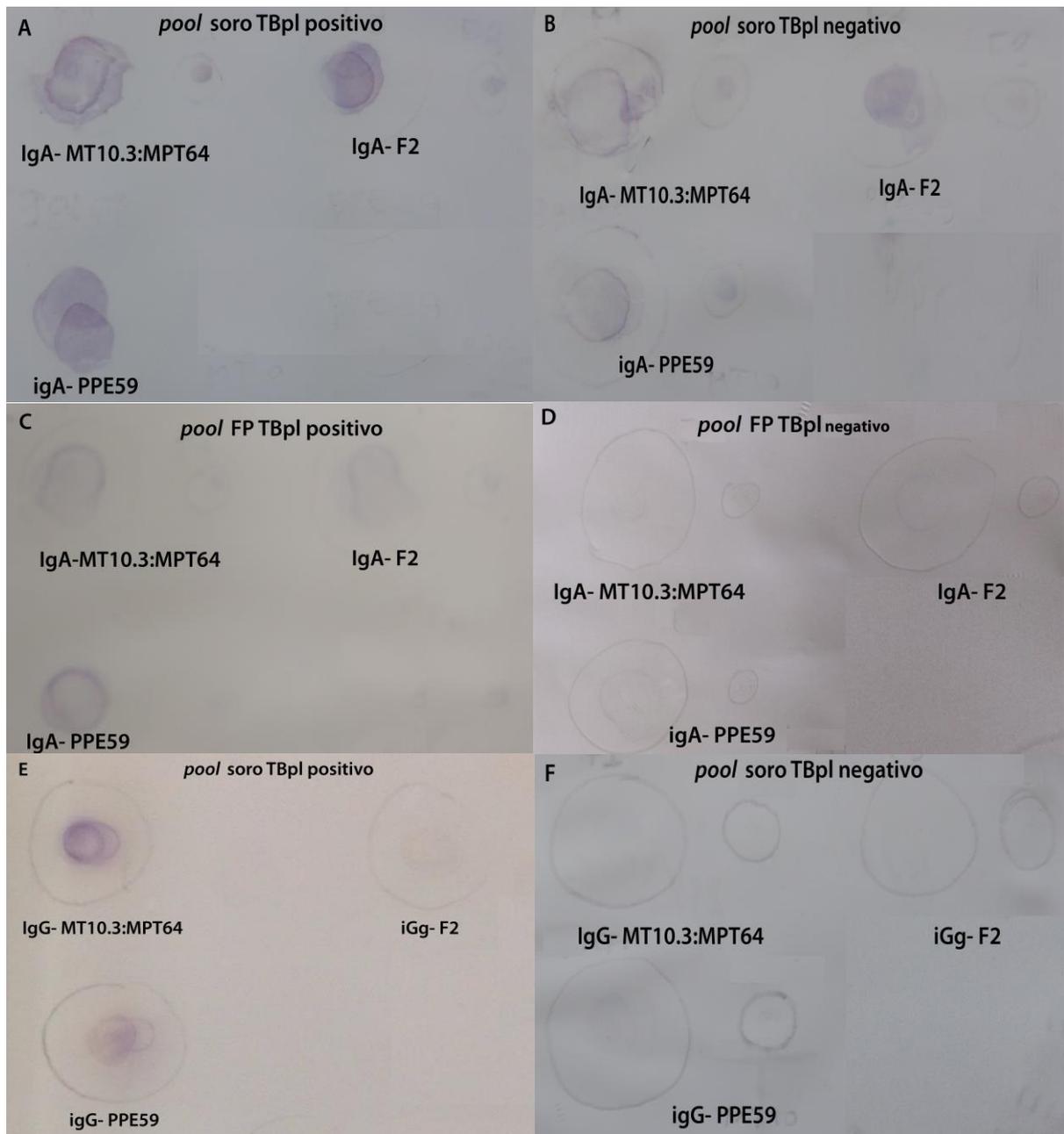


Figura 32 - Padronização do dot-ELISA com diluições seriadas de *pools* de fluidos pleurais e soro de pacientes com tuberculose pleural ($pool^+$) e outras pleurisia ($pool^-$), utilizando: A e B) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (0,05 µg/mL), F2 (0,5 µg/mL) e PPE59 (0,5 µg/mL) com diluições de *pools* de soro (1:50), na detecção de IgA 1:2.500 (Mt10.3:MPT64 e PPE59) e 1:5.000 (F2); C e D) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (0,5 µg/mL), F2 (1,5 µg/mL) e PPE59 (1,0 µg/mL) com diluições de *pools* de FP (1:50 (MT10.3:MPT64 e F2) e 1:100 (PPE59)), na detecção de IgA 1:5.000; E e F) a proteína de fusão MT10.3:MPT64 (1,0 µg/mL), F2 (1,5 µg/mL) e PPE59 (1,0 µg/mL) com diluições de *pools* de FP (1:50 (MT10.3:MPT64 e PPE59) e 1:200 (F2)), na detecção de IgG 1:10.000 (Mt10.3:MPT64 e PPE59) e 1:20.000 (F2).

5.2.2 Resultados dot-ELISA com a proteína de fusão MT10.3:MPT64 para IgA e IgG em soro e FP.

Foram utilizadas amostras de soro e FP de 68 pacientes com derrame pleural atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), anteriormente testados para o ELISA “*in house*” convencional, dos quais 29 foram diagnosticados com TBpl e 39 com OPL.

Na detecção de IgA-MT10.3:MPT64 no FP, o dot-ELISA mostrou reação positiva em todos os 29 pacientes com TBpl testados. Por outro lado, 3/39 (7,6%) pacientes OPL (pacientes 16, 19 e 51) apresentaram baixa reação positiva, entretanto, vale ressaltar que o paciente 51 diagnosticado com insuficiência cardíaca também apresentou positividade no teste ELISA “*in house*” na detecção de IgA em FP (figura 33 e tabela 9, páginas 76 e 79). Os pacientes 16 e 19 diagnosticados com insuficiência renal e LES, respectivamente, não apresentaram detecção positiva de IgA no teste de ELISA em FP, entretanto, vale destacar que o paciente 19 foi o único do grupo OPL vacinado com duas doses da BCG. Por outro lado, o dot-ELISA IgA-MT10:MPT64 no FP foi capaz de identificar 4 pacientes TBpl que tiveram resultados negativos no ELISA IgA em FP para a mesma proteína (tabela 9, página 79). Dessa forma, o dot-ELISA IgA-Mt10.3:MPT64 apresentou ótima sensibilidade (100%), mas com ligeira diminuição da especificidade (92,3%). Isto torna IgA-MPT64:MT1-.3 um excelente biomarcador de triagem rápida na TBpl.

dot-ELISA FP IgA-MT10.3:MPT64

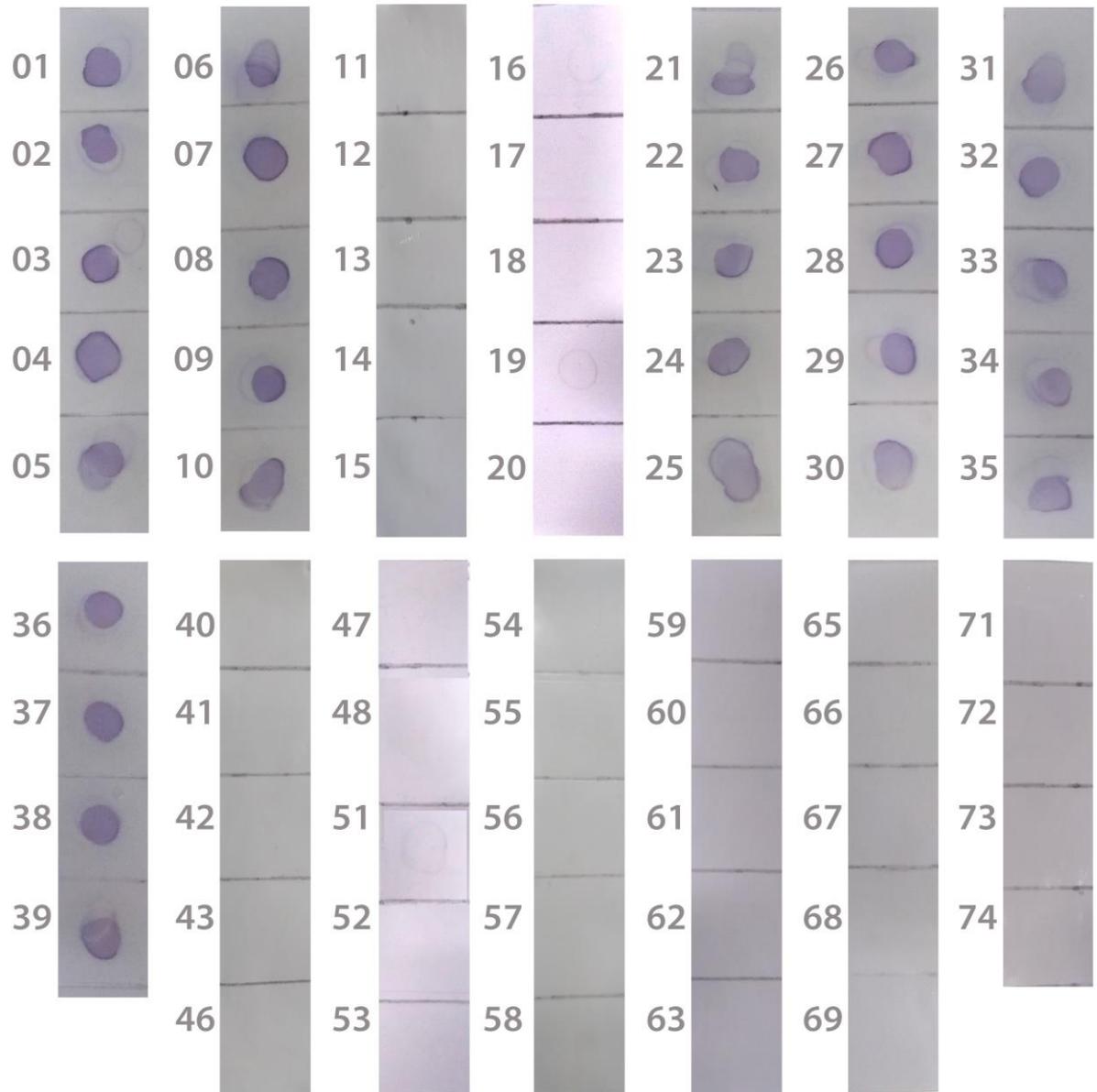


Figura 33 – Resultados individuais do dot-ELISA IgA-MT10.3:MPT64 em FP de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e outras pleurisas não TB (OPL). Os números laterais correspondem a identificação dos pacientes. TBpl = pacientes 01-10 e 21-39; OPL = pacientes 11-20 e 40-74.

Na detecção de IgG-MT10.3:MPT64 no soro, todos os 29 pacientes com TBpl testados também apresentaram positividade no ensaio dot-ELISA. Entretanto, 5,5% (2/36) dos soros de OPL mostrou reação positiva (pacientes 48 e 68). Ambos foram diagnosticados com neoplasia, sendo que estes pacientes também apresentaram positividade no teste ELISA “*in house*” para IgG no soro (figura 34 e tabela 9, páginas 78 e 79). Vale destacar que o dot-ELISA IgG-MT10:MPT64 no soro mostrou reação positiva em 14 pacientes TBpl que tiveram resultados negativos no ELISA IgG em soro para a mesma proteína de fusão (tabela 9, página 79). O dot-ELISA IgG-MT10:MPT64 mostrou excelente sensibilidade (100%), e boa especificidade (94,8%). Assim, o dot-ELISA aqui desenvolvido para detecção de IgA em FP e IgG em soro para a proteína MT10:MPT64, se mostrou promissor como um excelente teste rápido de triagem para detecção de TBpl.

dot-ELISA FP IgG -MT10.3:MPT64

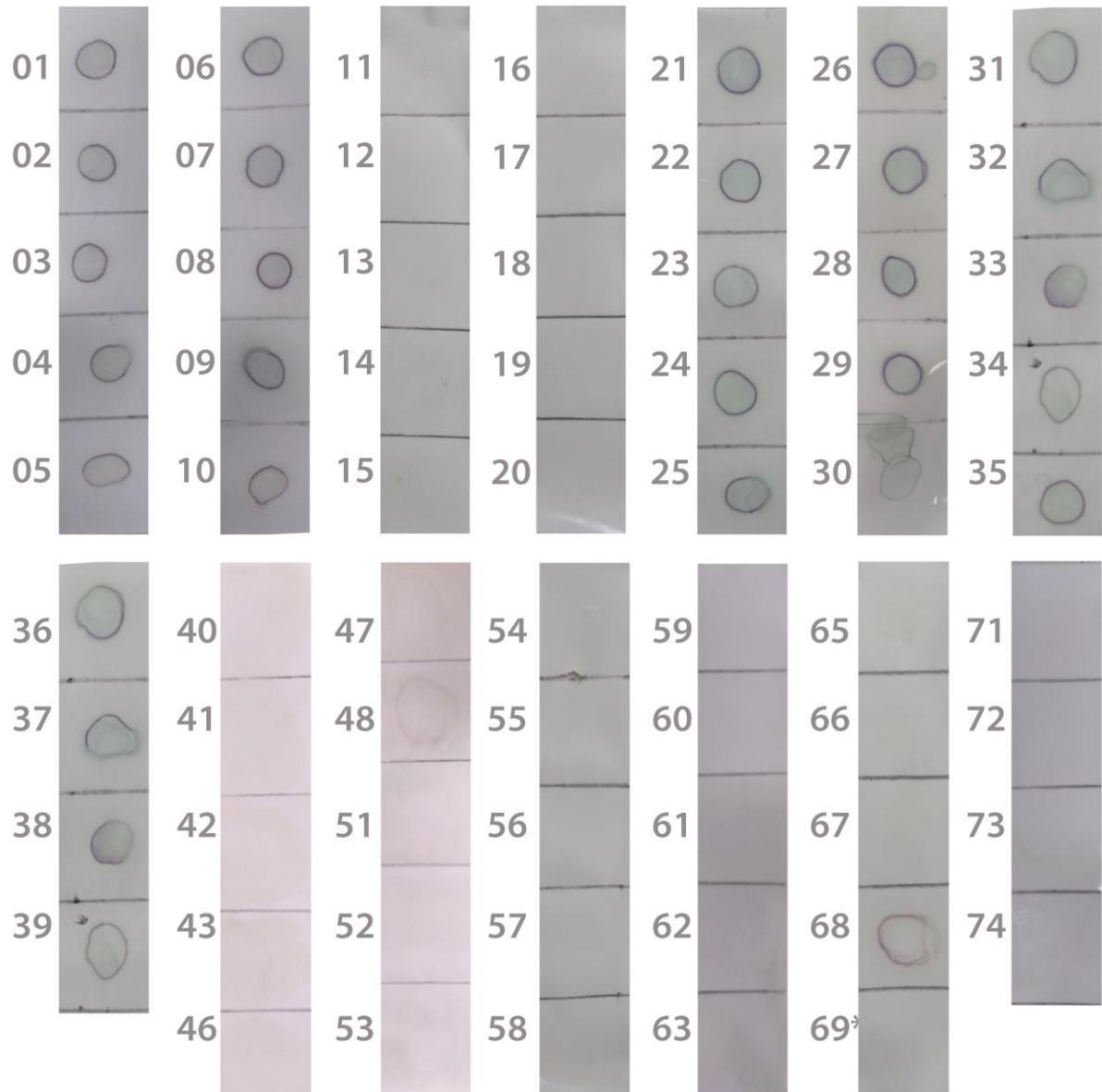


Figura 34 – Resultados individuais do dot-ELISA IgG-MT10.3:MPT64 em soro de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e outras pleurisas não TB (OPL). Os números laterais correspondem a identificação dos pacientes. TBpl = pacientes 01-10 e 21-39; OPL = pacientes 11-20 e 40-74.

Tabela 9 – Resultados individuais dos testes ELISA “in house” e dot-ELISA para o diagnóstico de TBpl nos pacientes com suspeita da doença, e seus respectivos diagnósticos reais finais definidos pelo HUPE.

Pacientes	Teste de ELISA “in house” (diluição da amostra)		dot-ELISA IgA- (FP 1:50) MT10.3:MPT64	dot-ELISA IgG- (soro 1:50) MT10.3:MPT64	Diagnóstico final definido por testes convencionais no HUPE*	Paciente	Teste de ELISA “in house” (diluição da amostra)		dot-ELISA IgA-(FP 1:50) MT10.3:MPT64	dot-ELISA IgG-(soro 1:50) MT10.3:MPT64	Diagnóstico final definido por testes convencionais no HUPE*
	IgA-(FP 1:50) MT10.3:MPT64	IgG-(soro 1:50) MT10.3:MPT64					IgA-(FP 1:50) MT10.3:MPT64	IgG-(soro 1:50) MT10.3:MPT64			
01	+	+	+	+	+	35	+	-	+	+	+
02	-	+	+	+	+	36	+	-	+	+	+
03	+	+	+	+	+	37	+	+	+	+	+
04	+	+	+	+	+	38	+	-	+	+	+
05	+	+	+	+	+	39	+	+	+	+	+
06	+	+	+	+	+	40	-	-	-	-	-
07	+	-	+	+	+	41	-	-	-	-	-
08	+	-	+	+	+	42	-	-	-	-	-
09	+	+	+	+	+	43	-	-	-	-	-
10	-	+	+	+	+	46	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	47	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	48	-	+	-	+	-
13	-	-	-	-	-	51	+	-	+	-	-
14	-	-	-	-	-	52	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	53	-	-	-	-	-
16	-	-	+	-	-	54	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	55	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	56	-	-	-	-	-
19	-	-	+	-	-	57	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	58	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	+	59	-	-	-	-	-
22	+	+	+	+	+	60	-	-	-	-	-
23	+	--	+	+	+	61	-	-	-	-	-
24	+	+	+	+	+	62	-	-	-	-	-
25	-	-	+	+	+	63	-	-	-	-	-

26	+	+	+	+	+	65	-	-	-	-	-
27	+	-	+	+	+	66	-	-	-	-	-
28	+	-	+	+	+	67	-	-	-	-	-
29	+	+	+	+	+	68	-	+	-	+	-
30	+	-	+	+	+	69	-	-	-	-	-
31	-	-	+	+	+	71	-	-	-	-	-
32	+	-	+	+	+	72	-	-	-	-	-
33	+	-	+	+	+	73	+	-	-	-	-
34	+	-	+	+	+	74	-	-	-	-	-

Em vermelho: diagnostico positivo para TBpl. + = positivo para TBpl; - = negativo para TBpl. * = diagnóstico real e final dos pacientes definido pelos médicos do HUPE, obedecendo os critérios de definição de casos.

5.3 Validação do ELISA “*in house*” na detecção da resposta humoral para os Ags MT10.3:MPT-64 e F2 como teste promissor em pacientes com derrame pleural:

De julho de 2017 até novembro de 2018, foram coletadas amostras de sangue e FP de 16 pacientes adultos apresentando derrame pleural sob investigação, atendidos por demanda espontânea no Hospital Universitário Pedro Ernesto. O soro e o FP foram submetidos a avaliação pelo teste de ELISA e cego quanto ao diagnóstico de TBpl, para os Ags MT10.3:MPT64 e F2.

5.3.1 Validação do ELISA IgG e IgA-MT10.3:MPT64 e F2 “*in house*” para o diagnóstico da TBpl.

Todos os pacientes foram submetidos ao teste de ELISA para o diagnóstico de TBpl, em estudo cego, visando estimar o valor preditivo *versus* os testes convencionais da rotina do HUPE. Foram utilizados os mesmos parâmetros de ELISA padronizados anteriormente, bem como os “*cut offs*” que apresentaram maiores sensibilidades e especificidades, sendo estes: IgA-MT10.3-MPT64 [FP (1:50 e 1:200)], IgA-MT10.3-MPT64 [Soro (1:50)], IgG-MT10.3-MPT64 [FP (1:200)]; IgG-MT10.3-MPT64 [Soro (1:50)] e IgA-F2 [FP (1:50)]. A figura 35 e a tabela 10 (páginas 82 e 83, respectivamente) mostram os resultados obtidos.

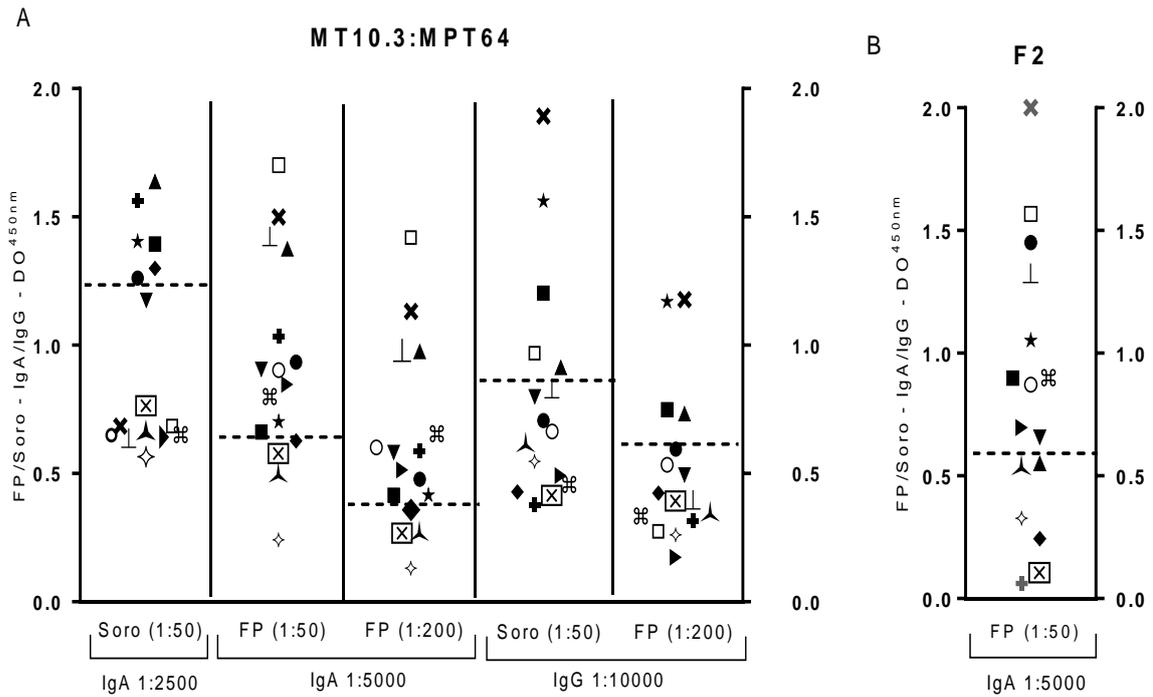


Figura 35 – Distribuição da resposta humoral na detecção de IgA e IgG, reativas à (A) proteína de fusão MT10.3:MPT64, de líquido pleural (1:50 e 1:200) e soro (1:50) e à (B) quimera proteica F2, de 16 pacientes com suspeita de tuberculose pleural (TBpl) ----- Linha pontilhada representa o *cut off* do teste previamente estabelecido. ● = paciente 01; ■ = paciente 02; ▲ = paciente 03; ◆ = paciente 04; ▼ = paciente 05; ★ = paciente 06; ✕ = paciente 07; † = paciente 08; ◇ = paciente 09; □ = paciente 10; ○ = paciente 11; ▲ = paciente 12; ▶ = paciente 13; ☒ = paciente 14; ⌘ = paciente 15; ⊥ = paciente 16.

Conforme demonstrado na tabela 10 (página 83), o ELISA MT10:MPT64-IgA no FP (1:50 e 1:200) apresentou resultados positivos, acima do “*cut off*”, em 12/16 pacientes (pacientes 01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 13, 15 e 16), enquanto no soro, apenas 3/16 pacientes (02, 03 e 07) apresentaram resultados positivos. Para IgG-MT10:MPT64, respostas acima do “*cut off*” foram obtidas em quatro (02, 03, 06 e 07) e cinco (02, 03, 06, 07 e 10) pacientes, em FP e soro, respectivamente. Nos FP, positividade de IgA-F2 foi encontrada em 11 pacientes (01, 02, 03, 05, 06, 07, 10, 11, 13, 15 e 16). Por outro lado, apenas 5/13 (38,4%) pacientes apresentaram

resultados positivos no ADA (pacientes 02, 03, 07, 10 e 11). Os pacientes 04, 09, 12 e 14 não apresentaram resposta positiva para nenhum dos testes de ELISA e ADA.

Tabela 10 – Resultados individuais dos testes ELISA “*in house*” para o diagnóstico de TBpl, nos pacientes com suspeita da doença sem diagnóstico confirmado.

Pacientes (Símbolo)	Teste de ELISA (diluição da amostra)						ADA (U/L)
	<u>IgA-(FP)</u>			<u>IgA-(soro)</u>	<u>IgG-(FP)</u>	<u>IgG-(soro)</u>	
	MT10.3:MPT64 (1:50)	MT10.3:MPT64 (1:200)	F2 (1:50)	MT10.3:MPT64 (1:50)	MT10.3:MPT64 (1:200)	MT10.3:MPT64 (1:50)	
Cut off →	0,658	0,385	0,542	1,267	0,616	0,891	>40
01 (●)	0,934	0,478	1,451	1,262	0,595	0,706	38,4
02 (■)	0,661	0,415	0,898	1,395	0,749	1,203	42,9
03 (▲)	1,375	0,975	0,550	1,637	0,733	0,913	67,5
04 (◆)	0,627	0,358	0,244	0,482	0,424	0,428	13,3
05 (▼)	0,906	0,582	0,658	0,604	0,495	0,799	18,7
06 (★)	0,702	0,415	1,052	1,175	1,170	1,562	32,4
07 (✕)	1,499	1,132	2,167	1,564	1,178	1,892	73,8
08 (+)	1,035	0,588	0,061	0,685	0,315	0,378	24,5
09 (◇)	0,241	0,130	0,327	0,566	0,260	0,547	3,2
10 (□)	1,702	1,419	1,567	0,684	0,274	0,968	115,9
11 (○)	0,903	0,602	0,872	0,649	0,534	0,664	57,3
12 (▲)	0,485	0,257	0,524	0,655	0,333	0,603	8,7
13 (▶)	0,849	0,515	0,699	0,629	0,175	0,494	35,6
14 (☒)	0,579	0,268	0,106	0,765	0,394	0,415	SR
15 (⌘)	0,796	0,651	0,896	0,648	0,330	0,454	SR
16 (⊥)	1,429	0,989	1,332	0,643	0,403	0,836	SR

Resultados dos níveis médios de IgA e IgG em densidade óptica (D.O.), individuais de cada paciente TBpl: pacientes com tuberculose pleural. Em vermelho: resposta positiva (acima do *cut off*) no ELISA. SR = sem resultado.

Como já é sabido na literatura, utilizar diferentes Ags e Acs pode aumentar o desempenho dos testes diagnósticos. Considerando a combinação dos resultados obtidos com os 68 pacientes TBpl e OPL avaliados, anteriormente, pelo ELISA “*in house*”, definimos como diagnóstico positivo para TBpl aqueles que apresentaram resultados positivos de IgA para a combinação dos ensaios FP-IgA-MT10.3:MPT64 (1:50) /-F2 (1:50), bem como sua combinação com a ADA. Assim, combinando estes resultados, os mesmos 12/16 (75%) pacientes com suspeita da doença

permaneceram positivos. Os quatro pacientes (04, 09, 12 e 14) que não apresentaram resposta positiva de IgA, foram classificados como pacientes não portadores de TBpl. O teste de ELISA, portanto, apresentou um poder de identificação maior para TBpl do que o ADA (tabela 11, página 84). Estes resultados oriundos do estudo cego de diagnóstico imunoenzimático da TBpl foram comparados a classificação diagnóstica final do HUPE. Os resultados do HUPE identificaram 10/16 pacientes com TBpl, os quais foram corroborados nos resultados combinados de ELISA IgA-MT10.3:MPT64/F2 ou usando apenas ELISA IgA-MT10.3:MPT64. Aparentemente o ELISA forneceu dois resultados falso positivos (pacientes 05 e 08), mas de acordo com as informações clínicas e sociais, estes pacientes eram contatos de TB. Portanto, o ELISA IgA-MT10.3:MPT64 permanece candidato a um teste de triagem rápido para TBpl.

Tabela 11 – Resultados individuais e/ou combinados dos testes ELISA “in house” e ADA em pacientes com suspeita clínica de tuberculose pleural, e seus respectivos diagnósticos finais definidos pelo HUPE por testes convencionais.

<i>Pacientes</i>	<i>ELISA FP IgA (1:50) - MT10.3:MPT64/ F2</i>	<i>ADA</i>	<i>Combinação ELISA / ADA</i>	<i>Diagnóstico final *</i>
01	+	-	+	+
02	+	+	+	+
03	+	+	+	+
04	-	-	-	-
05	+	-	+	-
06	+	-	+	+
07	+	+	+	+
08	+	-	+	-
09	-	-	-	-
10	+	+	+	+
11	+	+	+	+
12	-	-	-	-
13	+	-	+	+
14	-	SR	-	-
15	+	SR	+	+
16	+	SR	+	+

+: diagnóstico positivo para TBpl. -: negativo para TBpl. SR = sem resultado. * = diagnóstico final dos pacientes definido por testes laboratoriais convencionais e por exame clínico no HUPE, obedecendo os critérios de definição de casos.

5.4 Avaliação da resposta imune celular em fluido pleural e sangue total em pacientes com derrame pleural.

Conforme descrito no ítem 5.3, de julho de 2017 até novembro de 2018, foram coletadas amostras de sangue e FP de 16 pacientes adultos apresentando derrame pleural sob investigação, atendidos por demanda espontânea no Hospital Universitário Pedro Ernesto. As PBMC e FPMC obtidas foram estimuladas com os antígenos alvos e os sobrenadantes de cultura foram estocados a -70°C , para posterior dosagem de citocinas.

5.4.1 Características da população do estudo da detecção de citocinas.

A maioria dos pacientes TBpl eram de etnia branca e parda (4/10, 40%, respectivamente), sem histórico prévio de TB (9/10, 90%) e HIV negativos (7/10, 70%). Entre os 6 pacientes controles, sem diagnóstico para TBpl, apenas dois tinham diagnósticos definidos para outras OPL, câncer e insuficiência cardíaca, respectivamente.

Os principais dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos dos grupos arrolados no estudo estão descritos na tabela 12 (página 86). Os indivíduos com OPL eram mais idosos ($p < 0,024$). O grupo TBpl apresentou homogênea distribuição quanto ao sexo (50%, respectivamente), não apresentando diferença significativa em relação ao controle. Apenas um paciente do grupo TB relatou histórico prévio de TB (1/10, 10%). Diferença significativa foi observada nos níveis de ADA de pacientes TBpl ($57,98 \pm 27,93$), que foram mais elevados que nos participantes do grupo OPL ($13,68 \pm 8,32$, $p < 0,001$). Apenas 2/10 (20%) pacientes TBpl e 1/6 (16,7%) do grupo não TB não realizaram o teste de ADA. Assim, neste grupo a pesquisa de ADA no FP mostrou moderada sensibilidade e especificidade (50%, 5/10 e 83,3%, 5/6), respectivamente. Sensibilidades decrescente foram obtidas para os resultados histopatológicos em fragmento pleural (50%, 5/10 e 66,6%, 4/6), cultura de FP (10%,

1/10 e 50%, 3/6) e na pesquisa BAAR no FP (0%, 0/10 e 100%, 6/6), e especificidade >50%, respectivamente.

Tabela 12 – Dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos dos participantes com tuberculose pleural (TBpl) e indivíduos não TB (controles).

Variáveis	TBpl n=10 (62.5%)	Controle n=6 (37.5%)
<i>Idade (média ± DP) ¹</i>	46,20±19,67	71,67±14,43*
< 50 anos	4 (40)	0
> 50 anos	6 (60)	6 (37,5)
<i>Sexo</i>		
Feminino	5 (50)	4 (66,6)
Masculino	5 (50)	2 (33,3)
<i>Etnia</i>		
Branco	4 (40)	3 (50)
Negro	2 (20)	1 (16,7)
Pardo	4 (40)	2 (33,3)
<i>Vacinação BCG:</i>		
Positivo	5 (50)	2 (33,3)
Negativo	5 (50)	4 (66,7)
<i>Uso de bebida alcoólica:</i>		
Positivo	3 (30)	1 (16,7)
Negativo	7 (70)	5 (83,3)
<i>Fumante atual:</i>		
Positivo	1 (10)	1 (16,7)
Negativo	9 (90)	5 (83,6)
<i>ADA (média ± DP)</i>	57,98±27,93*	13,68±8,32
Positivo	5 (50)	0
Negativo	3 (30)	5 (83,3)
Sem informação	2 (20)	1 (16,7)
<i>BAAR FP</i>		
Positivo	0	0
Negativo	8 (80)	6 (100)
Sem informação	2 (20)	0
<i>Cultura (FP)</i>		
Positivo	1 (10)	0
Negativo	7 (70)	3 (50)
Sem informação	2 (20)	3 (50)
<i>Exame citopatológico (FP)</i>		
Sugestivo de TB	1 (10)	0
Não específico	0	1 (16,7)
Sem informação	9 (90)	5 (83,3)
<i>Exame histopatológico (fragmento de pleura)</i>		
Sugestivo de TB	5 (50)	1 (16,7)

Negativo	0	4 (66,6)
Sem informação	5 (50)	1 (16,7)
<i>Histórico prévio de TB</i>		
Positivo	1 (10)	0
Negativo	9 (90)	6 (100)
<i>Outras morbidades</i>		
Câncer	0	1 (16,7)
Insuficiência cardíaca	0	1 (66,6)
Sem informação	0	4 (16,7)
<i>Sorologia HIV</i>		
Negativo	7 (70)	2 (33,3)
Sem informação	3 (30)	4 (66,7)

* $p < 0,05$. DP - Desvio Padrão. ADA - *cutoff da adenosina deaminase > 40 U/L*, TBpl: pacientes com tuberculose pleural; OPL: pacientes que apresentam outras doenças pleurais não relacionadas à TB. LES: lúpus eritematoso sistêmico. Nota: No Brasil, pardo significa uma mistura de etnicidades européias, negras e ameríndias. HIV: vírus da imunodeficiência humana

5.4.2 Produção de citocinas Th1, Th2 e Th17 por PBMC e PFMC de pacientes com derrame pleural em resposta aos antígenos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT6:CFP10

Foram utilizadas amostras de sangue periférico e FP de 10 pacientes diagnosticados com TBpl e 6 (37,5%) classificados como não TBpl ou controle (C). O controle (C) foi assim denominado por embora não possuam diagnóstico definido para outras OPL, detinham diagnóstico excludente de TB. A tabela 13 (página 94) mostra as médias e desvio padrão resultante da dosagem de citocinas (pg/mL), *in vitro*, produzidas por PFMC e PBMC estimuladas com os diferentes Ags propostos entre os grupos TBpl e C.

Como o IFN- γ é o principal produto da resposta imune por células Th1 e é considerado necessário na proteção contra a infecção por Mtb, testamos se no local da infecção (PFMC) se produz mais IFN- γ em resposta aos estímulos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6:CFP-10. A produção *in vitro* de IFN- γ pelas PFMC foi significativamente maior no grupo TBpl para o antígeno PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 em relação ao grupo C (1156 ± 2001 vs $26,62 \pm 37,42$, $p=0,023$), bem como em relação as suas respectivas culturas de PBMC ($31,45 \pm 55,34$ vs $0,055 \pm 0,134$; $p=0,022$). Diferentemente, produção média de IFN- γ para as PFMC primadas com o ESAT-6:CFP10 (1493 ± 2214 vs $22,27 \pm 52,82$, $p = 0,057$) apresentou significância

borderline. É importante notar que a média de IFN- γ produzida por PFMC de pacientes TBpl (1156 \pm 2001) estimulados por PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 foi ligeiramente menor comparada com as estimuladas com ESAT-6:CFP10 (1493 \pm 2214), embora sem diferença estatisticamente significativa (p=0,982). Médias significativamente diferentes e menores foram obtidas para IFN- γ produzido por PBMC de pacientes TBpl vs C (31,45 \pm 55,34 vs 0,055 \pm 0,134, p=0,037) primadas com o PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 ou por ESAT6:CFP10 (182,2 \pm 276,0 vs 0, p=0.026), Notou-se que, embora a produção tenha sido baixa, houve diferença significativa de IFN- γ produzido por PFMC em relação as culturas de PBMC do grupo C estimuladas com o Ag PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 (p=0,015). Embora as médias tenham sido baixas, o grupo TBpl apresentou produção significativamente maior de IFN- γ em comparação ao grupo C, em culturas de PBMC estimuladas com ambos os Ags (p<0,022). Em consonância com o IGRA comercial, o ESAT-6:CFP10 mostra-se mais específico na PBMC, e produção média de IFN- γ mais baixa (figura 36 e tabela 13, páginas 86 e 93, respectivamente).

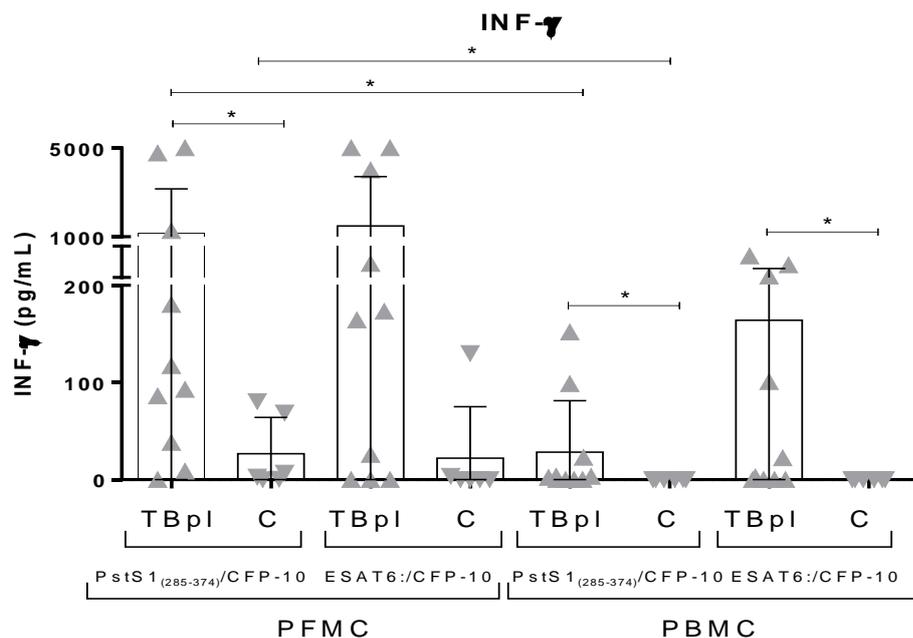


Figura 36 - Produção *in vitro* de IFN- γ por células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles (C, n=6) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=10) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10. *diferença estatisticamente significativa de (p \leq 0,05)

Respectivamente, baixa ou nenhuma produção de IL-4, foi observada em PFMC e PBMC nos grupos TBpl e controles para os antígenos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6:CFP10. A resposta da citocina IL-2 produzidas pelas PFMC em TBpl foram mais elevadas, para ambos os antígenos (figura 37 e tabela 13 na pag 93).

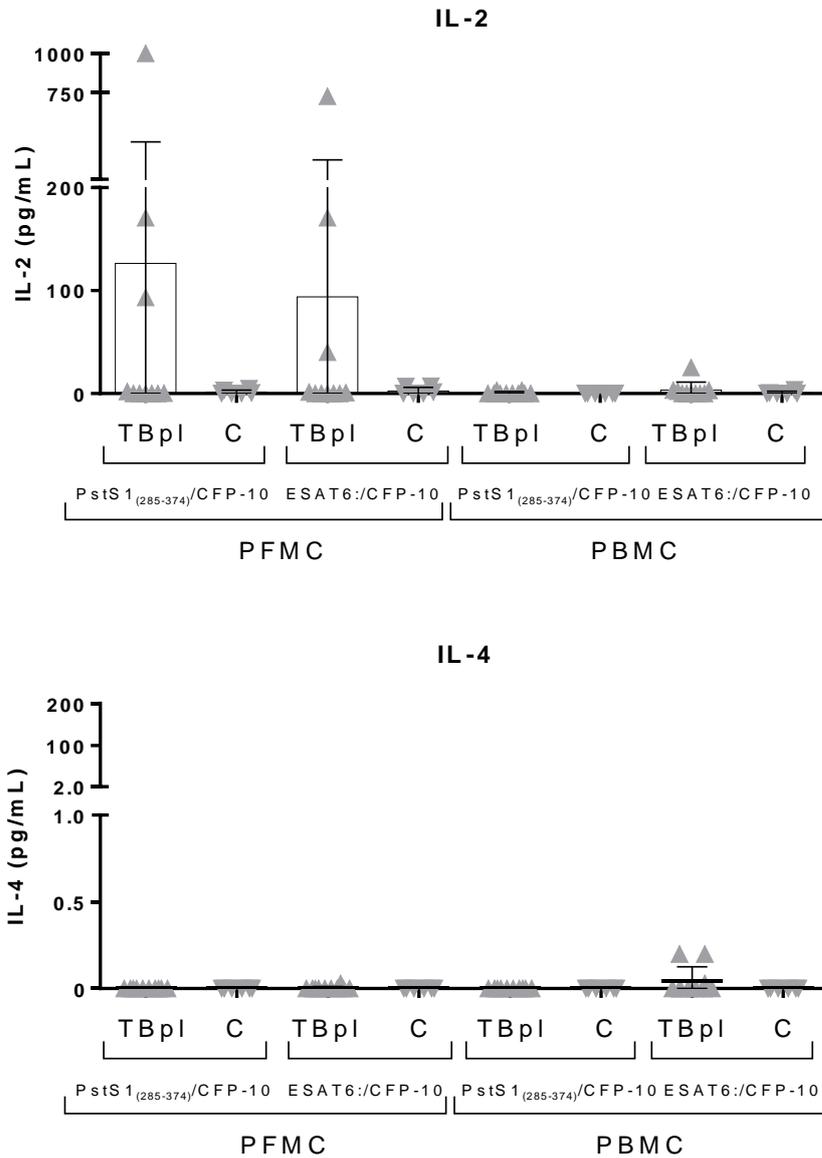


Figura 37 - Resposta das citocinas IL-2 e IL-4 *in vitro*, de 10 pacientes com tuberculose pleural e 6 controles, produzidas pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) aos antígenos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10.

As PFMC de 50% e 40 % dos pacientes TBpl produziram IL-6 mais elevado sob os estímulos de PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10, quando comparados aos controle, respectivamente. Para os C apenas 16% apresentaram resposta de IL-6, embora sem diferença média significativa. As PBMC resultaram em produção de IL-6 menos específica entre os grupos, para ambos os antígenos ($p > 0,334$) (figura 38 e tabela 13 na pag 93).

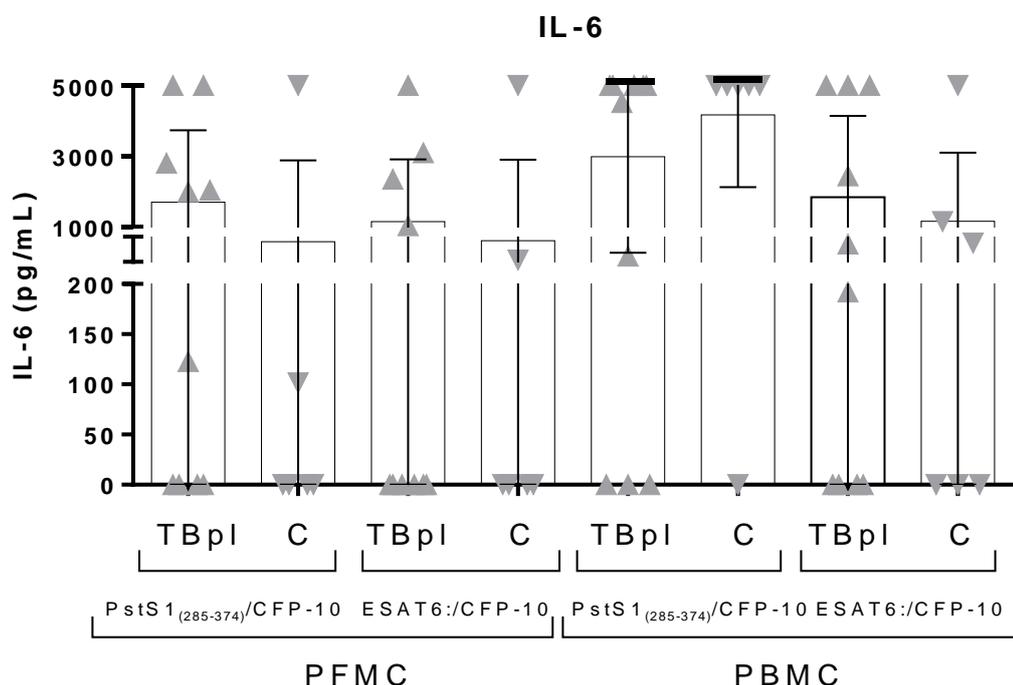


Figura 38 – Produção *in vitro* de IL-6 pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles (C, n=6) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl, n=10) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10.

Produção de IL-10 aumentada em 40% dos TBpl foi associada ao estímulo de PFMC com o Ag ESAT-6:CFP-10, quando comparado aos controles, porém sem diferença média significativa ($p=0.3874$). Por outro lado, este antígeno não é capaz de induzir IL-10 a partir de PBMC em nenhuma das pleurites estudadas (TBpl e C). O estímulo produzido pelo Ag PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 em PFMC e PBMC resultaram inespecíficos ($p>0.226$). Nota-se que as PFMC e PBMC do grupo C apresentaram resposta média de IL-10 ao estímulo PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 significativamente maior comparado àquelas primadas com Ag ESAT-6:CFP10 ($p=0,04$). Portanto, culturas de PFMC apresentaram uma maior produção média de IL-10 do que as culturas com PBMC, principalmente para o Ag ESAT6:CFP-10 (figura 39 e tabela 13 da pág93).

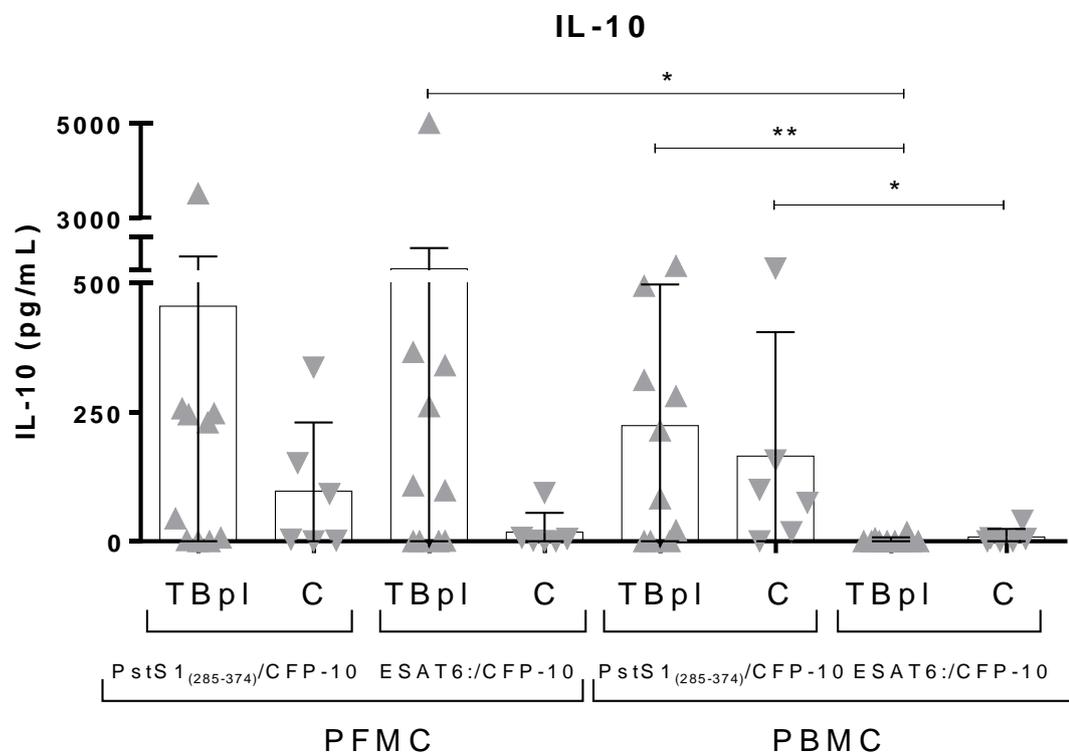


Figura 39 - Produção *in vitro* de IL-10 pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles (n=6) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl) (n=10) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10. * diferenças estatisticamente significativa de acordo com $p \leq 0,05$.

TNF tende a estar discretamente aumentado em PFMC no grupo TBpl em resposta a ambos os antígenos ($p > 0,097$). Vale ressaltar que a média de TNF produzidos pelas PFMC-TBpl ($552,1 \pm 1242$) foi maior comparada aos controles ($39,69 \pm 95,48$) para o Ag ESAT-6:CFP10, embora sem diferença significativa para o grupo não-TB ($p = 0,158$) e para as culturas de PBMC ($p = 0,4017$) (figura 40 e tabela 13, páginas 92 e 93, respectivamente). Baixa produção de TNF foi observada em PBMC para ambos os Ags. Diferença *borderline* na produção de TNF por PBMC estimuladas com ESAT6:CFP10 foi obtida associada ao grupo TBpl quando comprado ao grupo controle ($48,95 \pm 90,73$ vs $0,803 \pm 1,968$, $p = 0,053$) (figura 40 e tabela 13 da pág93).

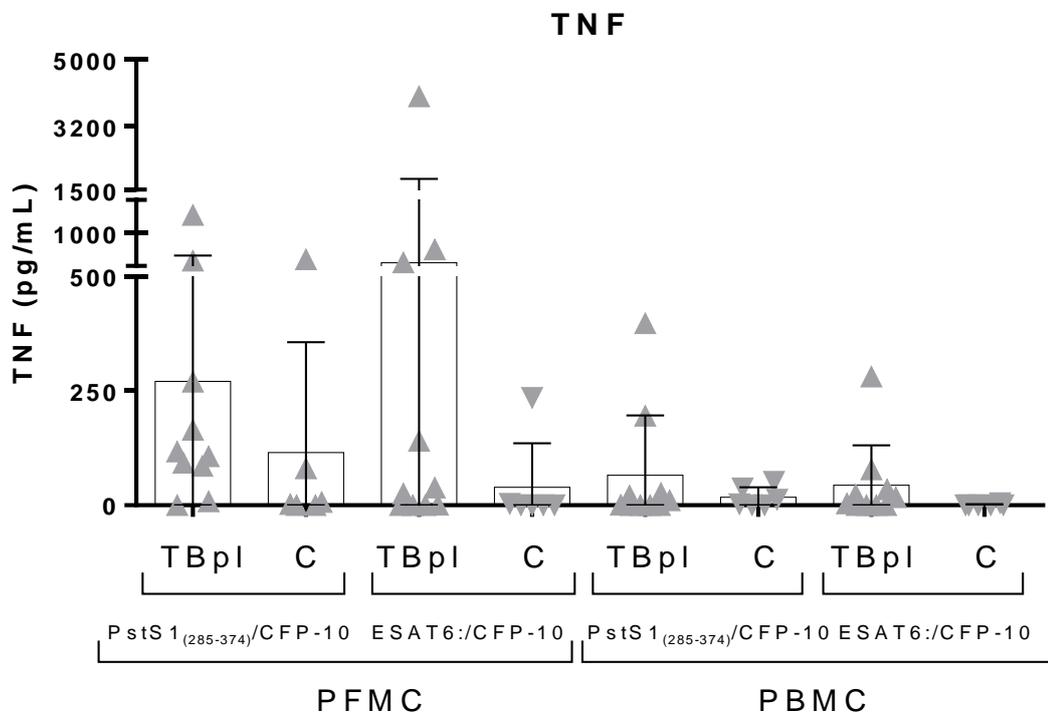


Figura 40 - Produção *in vitro* de TNF pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles ($n = 6$) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl) ($n = 10$) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10.

A resposta de células Th1 é sabidamente significativa na resposta imune na TB, mas adicionalmente as células Th17 também são necessárias. Ao avaliar a produção de IL-17A observou-se, no grupo TBpl, tendência a aumento na produção pelas PFMC em resposta a ambos os Ags, porém sem diferença estatisticamente significativa. Para o estímulo com o antígeno PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, produção ligeiramente diminuída de IL-17A em PFMC foi encontrada no grupo TBpl, porém sem diferença significativa em relação ao ESAT6:CFP10 (p=0,741). Não foi evidenciado produção de IL-17A nas culturas de PBMC de ambos os grupos, uma vez que, apenas um paciente TBpl apresentou nível de IL-17A <100 pg/mL quando estimuladas com PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10. Não houve diferença significativa na produção de IL-17A entre as culturas de PFMC e PBMC (Figura 41 e tabela 13, páginas 93).

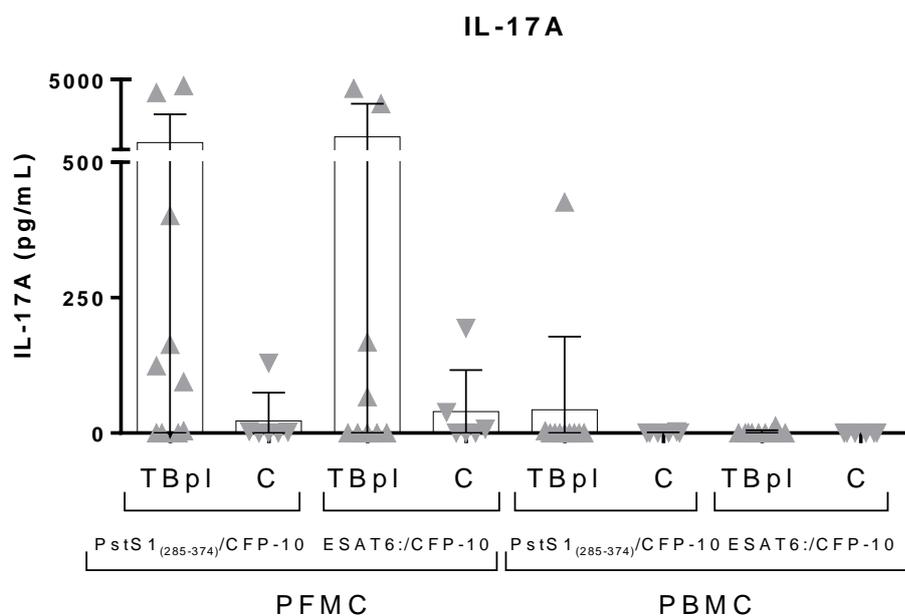


Figura 41 - Produção *in vitro* de IL-17A pelas células mononucleadas do líquido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) de controles (n=6) e pacientes com tuberculose pleural (TBpl) (n=10) em resposta aos antígenos micobacterianos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT-6/CFP-10.

Tabela 13 – Níveis de citocinas Th1/Th2/TH17 (pg/mL) determinados por ensaio CBA, produzidos por células mononucleares do fluido pleural (PFMC) e do sangue periférico (PBMC) estimuladas com os Ags PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT6:CFP10, de pacientes com tuberculose pleural (TBpl) e indivíduos não TB (controles).

Citocinas (células produtoras)	TBpl (n=10)	Controle (n=6)	p valor ¹
	Média ± DP	Média ± DP	
PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10			
<i>IL-2 (PFMC)</i>	126,5 ± 311,8	1,41 ± 2,0	0,700
<i>IL-2 (PBMC)</i>	0,6778 ± 1,34	0	0,485
<i>IL-4 (PFMC)</i>	0	0	> 0,999
<i>IL-4 (PBMC)</i>	0	0	> 0,999
<i>IL-6 (PFMC)</i>	1696 ± 2035	850,2 ± 2033	0,334
<i>IL-6 (PBMC)</i>	3323 ± 2404	4167 ± 2041	0,508
<i>IL-10 (PFMC)</i>	454,9 ± 1081	97,51 ± 132,3	0,634
<i>IL-10 (PBMC)</i>	249,1 ± 277,0	165,2 ± 239,8	0,604
<i>IFN-γ (PFMC)</i>	1156 ± 2001	26,62 ± 37,42	0,023 *
<i>IFN-γ (PBMC)</i>	31,45 ± 55,34	0,055 ± 0,134	0,037*
<i>TNF (PFMC)</i>	270,5 ± 390,8	115,6 ± 240,6	0,097
<i>TNF (PBMC)</i>	72,61 ± 137,0	17,29 ± 21,94	0,841
<i>IL-17A (PFMC)</i>	951,6 ± 1806	22,32 ± 52,31	0,147
<i>IL-17A (PBMC)</i>	47,87 ± 142,0	0,380 ± 0,930	0,485
ESAT-6:CFP10			
<i>IL-2 (PFMC)</i>	94,08 ± 228,9	2,57 ± 3,47	0,809
<i>IL-2 (PBMC)</i>	3,789 ± 8,229	0,735 ± 1,48	0,655
<i>IL-4 (PFMC)</i>	0	0	> 0,999
<i>IL-4 (PBMC)</i>	0	0	0,228
<i>IL-6 (PFMC)</i>	1148 ± 1765	876,2 ± 2023	0,775
<i>IL-6 (PBMC)</i>	2046 ± 2344	1933 ± 3813	0,704
<i>IL-10 (PFMC)</i>	789,0 ± 2087	17,99 ± 37,25	0,255
<i>IL-10 (PBMC)</i>	2,611 ± 6,056	8,615 ± 15,68	0,383
<i>IFN-γ (PFMC)</i>	1493 ± 2214	22,27 ± 52,82	0,057
<i>IFN-γ (PBMC)</i>	182,2 ± 276,0	0	0,026*
<i>TNF (PFMC)</i>	552,1 ± 1242	39,69 ± 95,48	0,158
<i>TNF (PBMC)</i>	48,95 ± 90,73	0,803 ± 1,968	0,053
<i>IL-17A (PFMC)</i>	1321 ± 2111	39,84 ± 76,63	0,552
<i>IL-17A (PBMC)</i>	1,523 ± 4,342	0	0,485

Níveis médios de citocinas em pg/mL e seus desvios padrão (DP). ¹ Diferença significativa da produção de citocinas entre os grupos e entre os antígenos testados foi calculada pelo teste de Mann Whitney (p<0,05*).

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico de TB é difícil e lento, principalmente em casos extrapulmonares, onde os sintomas clínicos são inespecíficos e os espécimes para diagnóstico são de difícil obtenção (RODGER *et al.*, 2003). Portanto, ainda se fazem necessários testes rápidos, simples, de baixo custo e de acurácia adequada, que auxiliem no diagnóstico rápido e acurado das diferentes formas clínicas da TB, podendo ser facilmente implementados em programas de saúde pública. Entretanto, deve-se ter em mente que o diagnóstico da TB e principalmente da TB paucibacilar deverá ser feito no contexto dos diferentes métodos existentes, devido à complexidade da doença, do bacilo e da resposta imune do hospedeiro. Considerando que a imunidade mediada por células e por Ac desempenham papel importante nas infecções por Mtb (WILLIAMS *et al.*, 2004), é provável que a TB esteja associada com a produção de biomarcadores no local da infecção, bem como em espécime clínico mais simples, o soro. A identificação de possíveis biomarcadores suficientemente acurados para o diagnóstico se somará aos outros métodos na luta para auxiliar na determinação da etiologia dos exsudatos pleurais.

Os testes baseados na resposta imune embora considerados promissoras alternativas no diagnóstico auxiliar da TB, sua aplicabilidade na rotina diagnóstica ainda é incerta. Os testes sorológicos possuem simplicidade tecnológica e podem ser acoplados aos serviços de saúde de menor complexidade; podem ser formatados para testes do tipo POC, além de permitir a rápida liberação dos resultados, o que pode ser feito em poucas horas ou em poucos minutos, se adaptado a plataformas imuno cromatográficas ou de micro chips, na prática clínica (FENG *et al.*, 2014; BAUMANN *et al.*, 2014; JENUM *et al.*, 2016). A pesquisa de Ac para o diagnóstico da TB vem recuperando seu espaço nos últimos anos e estudos têm evidenciado o importante papel da resposta imune humoral na infecção contra Mtb (KAISERMANN *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008; SARDELLA *et al.*, 2008; BEZERRA *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2010; STEINGART *et al.*, 2012; SARDELLA

et al., 2014; SARDELLA *et al.*, 2015; MULINARI, 2016; AMICOSANTE *et al.*, 2017; BAI *et al.*, 2018; TARHAN, 2018; WANG *et al.*, 2018).

No ano de 2011, a OMS declarou que a utilização de testes sorológicos, comercialmente disponíveis, não apresentava acurácia suficiente para o diagnóstico da TB e, portanto, sem utilidade para substituir os métodos diagnósticos tradicionais (WHO, 2011). Isso não impede ou desmerece as pesquisas desenvolvidas neste campo, pois ainda se faz necessário maior conhecimento sobre os diversos Ags de Mtb e seu uso potencial em novas tecnologias diagnósticas, bem como em vacinas. Recentemente, o Prof Harinath publicou um editorial em que fala a favor do povo indiano que sofre de TB e hanseníase, muitos deles vivendo em áreas rurais, declarando que um único teste não responderá a todas as questões colocadas pelos clínicos e agentes de saúde pública (HARINATH, 2017). Assim, considerando a dificuldade em diagnosticar rapidamente a TB, os métodos imunológicos podem ser úteis como testes adjuvantes rápidos.

Hipóteses têm sido levantadas de que as proteínas ativamente secretadas por Mtb, como MPT64 e MT10.3, são importantes na ativação da resposta imune por serem as primeiras a interagir com o sistema imune do hospedeiro. As proteínas MPT-64 e MT10.3 são reconhecidas tanto por células Th1 como Th2 e, portanto, podem ser úteis no imunodiagnóstico da TB e também candidata a molécula vacinal para TB (KAISERMANN *et al.*, 2005; TRAJMAN *et al.*, 2008). No presente estudo, embora tenhamos demonstrado diferenças significativas entre os grupos para os Ags separados MT10.3 e MPT-64, a sensibilidade foi baixa para ambos os espécimes clínicos, mantendo alta especificidade (95%). A menor reatividade evidenciada no FP para os Ags separados MT10.3 (20.7%) e MPT64 (24.1%) não era esperada e está em discordância com relatos anteriores (72%) que avaliaram populações portadoras de morbididades semelhantes às pleurísias encontradas no presente estudo (KAISERMANN *et al.*, 2005). Uma possível explicação pode ser a degradação dos Ags, uma vez que, os lotes eram antigos e sofreram vários ciclos de congelamento e descongelamento. Por outro lado, para o soro, os resultados corroboraram os relatados por Silva *et al.* (2008), onde mesmo avaliando a forma pulmonar da TB, ambos os Ags separados não apresentaram alta sensibilidade

(<34,5%). Além disso, a menor reatividade destes Ags para IgA e IgG no soro (incluindo para a PPE59) também foi detectada. Outra possível explicação é que, no presente estudo, 64% dos pacientes OPL apresentavam câncer e maiores níveis médios de IgA no FP e no soro, assim como IgG no FP, em comparação com outros casos de OPL. Resultados falso-positivos no ELISA em pacientes com câncer de pulmão foram relatados por outros autores (VAN VOOREN *et al.*, 1990; KAISERMANN *et al.*, 2005). No Brasil, estimativas para 2018-2019 indicam a ocorrência de cerca de 600.000 novos casos de câncer, dos quais aproximadamente 10% serão apresentados no estado do Rio de Janeiro (INCA, 2018). No presente estudo, maior proporção de pacientes OPL com câncer foi observada em comparação com relatos anteriores (KAISERMANN *et al.*, 2005). Isso pode estar associado ao fato ser o HUPE um hospital terciário, que oferece atendimento de saúde especializado após encaminhamentos de atenção primária e secundária. Portanto, trata-se de um hospital para grandes operações, consultas com especialistas e composto de sofisticadas unidades de terapia intensiva, essenciais para pacientes com câncer. Além disso, entre outras razões, a redução das taxas de natalidade e mortalidade, que indicam prolongamento da expectativa de vida e envelhecimento da população, levam a um aumento na incidência de doenças crônico-degenerativas, especialmente câncer e doenças cardiovasculares (INCA, 2006). Coincidentemente, os casos de OPL com câncer eram de pacientes mais idosos e a doença cardiovascular era a segunda causa de morbidade. Assim, investigar marcadores com potencial diferenciação da TBpl e OPL traz benefícios na busca de novos biomarcadores de TB com valor para o diagnóstico baseado na resposta imune.

Devido à heterogeneidade de reconhecimento dos antígenos pelos indivíduos, sugere-se a utilização de multiantígenos, bem como diferentes classes de Ac, para aumentar o desempenho dos testes. Aqui, corroborando estudo anterior, demonstramos que o uso do antígeno fusionado MT10.3:MPT64 é reconhecido por Ac IgA em FP, com alta sensibilidade e especificidade, em nova coorte de TBpl. A obtenção do FP é relativamente menos invasiva que a biópsia, portanto, utilização

desse espécime clínico em testes imunológicos, como ELISA, pode trazer benefícios para o diagnóstico auxiliar da TBpl.

Na resposta humoral, IgA é uma imunoglobulina predominante nas mucosas/serosas, e também secretada no espaço pleural (PARSLOW, 1997), entretanto, IgA contra os Ags micobacterianos foi também encontrada no soro de pacientes com TB pulmonar (GLATMAN-FREEDMAN, 2003; BEZERRA *et al.*, 2009; SARDELLA *et al.*, 2015). Zhao *et al.* (2017) sugeriram testes baseados em Ac no plasma para identificar a infecção por Mtb do genótipo Beijing. No presente estudo, IgG e IgA resultaram em menor positividade no soro em comparação com o FP. No entanto, a frequência de resultados positivos é maior do que a obtida em testes microbiológicos sendo, portanto útil na sua ausência e de outros testes diagnósticos convencionais, menos sensíveis. O uso de antígenos recombinantes fusionados em testes diagnósticos constitui uma estratégia interessante para aumentar a sensibilidade e a simplicidade. Foi descrito que a posição dos genes na construção pode alterar a reatividade da molécula obtida (HOFF *et al.*, 2007; ARAUJO *et al.*, 2010; SARDELLA *et al.*, 2015). Neste estudo, a maior sensibilidade observada para MT10.3:MPT64 pode estar relacionada a esse fato, uma vez que, a proteína de fusão expressa por genes em posição oposta a desta construção parece apresentar baixa estabilidade e qualidade (comunicação pessoal).

Em nosso estudo, o acréscimo de NaCl 0,3M ao tampão de diluição das amostras clínicas e conjugado IgA, e o uso de maior quantidade de *Tween* nas lavagens, durante a padronização do ELISA para o reconhecimento da fusão MT10.3:MPT64 em FP e soro, não conferiu melhor especificidade ao teste, como sugerido por Araújo *et al.* (2010). Melhor especificidade e reprodutibilidade dos resultados foram obtidos com o tampão comumente utilizado no ELISA “*in house*”, ou seja, sem acréscimo de NaCl e *tween*. Assim, para detecção de IgA, em FP e soro, contra a proteína de fusão MT10.3:MPT64 sugerimos que o teste imunoenzimático deve ser realizado nas condições descritas neste trabalho. Entretanto, curiosamente, a utilização dos tampões sugeridos por Araújo *et al.* (2010), otimizou os resultados na detecção de IgG-MT10.3:MPT64, conferindo melhor especificidade.

A frequência de TBpl diagnosticada neste estudo foi menor do que a relatada em outros estudos nacionais (KAISERMANN *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2010). Essa diferença pode estar associada à melhora do programa de controle da TB em unidades públicas de saúde, refletindo a diminuição dos casos de TB nos últimos anos. No entanto, métodos diagnósticos alternativos ainda são necessários para a detecção da TBpl. Por exemplo, o exame histopatológico, referencia para biópsia pleural, praticamente não foi realizado na amostragem atual, em comparação com Araújo *et al* (2010). Pelo contrário, o diagnóstico de todos os pacientes aqui realizado, baseou-se principalmente na suspeita clínica e no teste diagnóstico da ADA, que produziu 79% de sensibilidade. Dentre as diluições de FP, ensaiadas nesse estudo para o ELISA IgA-MT10.3:MPT64, 1:50 e 1:200, apresentaram maior sensibilidade (86,2%) e especificidade (95%), resultados, estes maior que com as proteínas MPT64 e MT10.3 testadas individualmente nesse estudo e em estudo anterior (KAISERMANN *et al.* 2005), ambos com sensibilidades abaixo de 76% e mantendo similar especificidade (95%). Esta diferença de sensibilidade pode estar relacionada a diferenças na exposição de epítopos da proteína na sua forma fusionada, favorecendo assim o diagnóstico da TBpl (ARAUJO *et al.*, 2010).

Quando analisamos de forma combinada, todas as diluições de FP testadas, em relação a proteína de fusão MT10.3:MPT64, a sensibilidade foi superior a 65%, resultado este, próximo ao obtido em outro estudo com o exame histopatológico em biópsia pleural (69,2 a 74%) (TRAJMAN *et al.*, 2001; ARAUJO *et al.*, 2010), que é um teste invasivo, moroso e requer profissional especializado. Ainda importante, conseguimos pela primeira vez, demonstrar diferença significativa na detecção de IgA e IgG para MT10:MPT64 no soro, bem como de IgG no FP de pacientes TBpl, com boa sensibilidade e especificidade. O soro é um espécime menos invasivo e sua possível utilização na busca de biomarcadores de TB, bem como sua aplicação em testes diagnósticos mais simples, com possível identificação das diferentes formas clínicas da doença, traz benefícios na busca por uma identificação mais rápida da infecção. Assim, nossos resultados sugerem que embora IgA forneça menor positividade no soro, do que a foi obtida com a IgG-MT10:MPT64, poderia ser empregada no diagnóstico auxiliar da TBpl.

Vale ressaltar que IgA-MT10.3:MPT64 (86,2%) e seus resultados combinados com / -MPT64 ou / -F2 identificaram todos os pacientes TBpl neste estudo, exceto um, que apresentou também resultado negativo no ADA e, apesar de não conseguir identificar dois ou três dos pacientes TBpl com ADA negativos, os testes imunes aqui desenvolvidos melhoraram a detecção da pleurisia tuberculosa (89,6%). Os resultados combinados para IgA-MT10.3 no FP (1:50): -MPT64 / -F2 e ADA apresentam dupla vantagem, pois, além de aumentar a sensibilidade (96,6%), o FP pode ser usado na mesma diluição para ambos os Ags fusionados quando em comparação com os resultados combinatórios de diferentes diluições de FP para obter a mesma alta sensibilidade, tornando-os adequados como um componente de teste diagnóstico para auxiliar no diagnóstico de TBpl. Além disso, as combinações dos resultados dos testes podem evitar a necessidade de uma biópsia pleural durante o diagnóstico inicial e, como o teste imunológico e a ADA são técnicas rápidas de baixo custo, fáceis de operar e aplicar nos sistemas públicos de saúde, favorecem um diagnóstico auxiliar rápido de TBpl.

O teste da ADA é aplicado no diagnóstico de rotina da TBpl na ausência de dados microbiológicos e/ou histopatológicos positivos com sensibilidade e especificidade adequadas (MORISSON, NEVES, 2008; PORCEL, 2016; MOLLO *et al.*, 2017). Recentemente, autores sugeriram o uso de ADA em combinação com outros testes diagnósticos, como os testes de liberação de IFN- γ , e na busca por novos biomarcadores (DHEDA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2015a; SHU *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015b; KIM *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016). O presente estudo pode fornecer um teste imune alternativo mais simples para a combinação com a ADA.

Como esperado, os exames histopatológicos demonstraram maior sensibilidade do que os métodos microbiológicos convencionais para o diagnóstico de TBpl, porém, menor em comparação ao ELISA aqui proposto. No entanto, entre os pacientes com resultados negativos ou sem informação, o ELISA IgA-MT10.3:MPT64 foi capaz de identificar a maioria dos pacientes com TBpl. A detecção de anticorpos específicos para antígenos micobacterianos de TBpl, na ausência de informações ou resultados histopatológicos inespecíficos, poderia apoiar a hipótese de que, em alguns casos, o derrame pleural também pode ser

causado pela possível entrada de antígenos micobacterianos no espaço pleural, estimulando a presença de IgA neste local (SEISCENTO *et al.*, 2006). Por outro lado, poucos pacientes com OPL, e resultado falso positivo ao exame histopatológico, apresentaram resultados positivos ao ELISA IgA-MT10.3:MPT64 (1/16, 6,2%).

Até o presente momento, não identificamos publicações que associam a quimera proteica F2 ou a proteína PPE59 à detecção de IgA em FP de pacientes com TBpl. Embora em pacientes com essa forma clínica, tenhamos demonstrado diferença significativa em FP para detecção de IgA-F2, a sensibilidade do teste foi menor (44,8%), entretanto, comparável a encontrada na bacterioscopia, com alta especificidade (95%). Assim, considerando que o ELISA tem o potencial de ser formatado em um teste “*point-of-care*” (POC), resultados semelhantes aos encontrados em avaliações de bacterioscopia poderiam ser obtidos rapidamente. Os ensaios no soro de TBpl, mostram diferença média de reatividade, porém melhor reatividade apenas para IgA em comparação com os outros antígenos, com sensibilidade acima de 50%, embora na TBpul esta foi evidenciada também para IgG em estudo anterior (SARDELLA *et al.*, 2014). Essa discordância entre os estudos pode estar relacionada às diferentes formas clínica da TB investigadas. É possível que a conformação da proteína fusionada, onde o reposicionamento dos fragmentos gênicos levou a formação de novos epítomos e, conseqüentemente, o ofuscamento de outros, possa impactar positivamente no reconhecimento desse Ag por IgA e IgG nos soros de pacientes com TB e TBpl. O reconhecimento de F2 por um grupo de TBpl, nesse estudo, adicionou sensibilidade à combinação de resultados usando ambos os antígenos de fusão, para detecção de IgA em FP. Isto pode ser explicado pela exposição de outros epítomos não disponíveis na construção completa do gene ou antígenos únicos.

Estudos envolvendo a família PPE na avaliação do potencial diagnóstico nas diferentes formas clínicas da TB ainda são poucos. No presente estudo, demonstramos pela primeira vez, diferenças significativas de reatividades médias na detecção de IgA, utilizando a PPE59, em FP (diluído a 1:100) de pacientes com TBpl. Embora com positividade menor que a obtida para a fusão MT10.3:MPT64, a

PPE59 mostrou relativo valor diagnóstico. A função desta proteína no metabolismo ou seu papel evolutivo em *Mtb* é ainda desconhecida. Os soros dos TBpl mostraram baixa positividade para IgG, resultado este similar ao evidenciado por Mulinari *et al.* (2016) para TBpul e diferentes casos de TB extrapulmonares (25% e 0%, respectivamente). No entanto, é aqui descrita pela primeira vez, sensibilidade superior para IgA-PPE59 (62,1%) no FP (1:100) comparada com os dados de Mulinari *et al.* (2016) (54% e 28%, respectivamente). Outros estudos investigaram diferentes PPE quanto ao seu potencial imunodiagnóstico. Chen *et al.* (2009) demonstrou que o ELISPOT-IFN- γ utilizando a PPE59 apresentou sensibilidades de 47% e especificidades de 93% na detecção de TB ativa, sugerindo o seu potencial no diagnóstico da doença. A PPE41 foi testada quanto à sua importância na indução de respostas imune de células B usando um painel de soros humanos de pacientes com TB ativa, TB recidivante e TB extrapulmonar (CHAKHAIYAR *et al.*, 2004). A proteína PPE codificada pelo gene *Rv1168c* foi descrita com forte imuno-reatividade específica em soros de pacientes com TB ativa quando comparada aos dos antígenos PPD, ESAT6 e *hsp60* (KHAN, *et al.*, 2008). Em estudo de experimentação animal, a proteína PPE55 (*Rv3347c*) foi diferencialmente reconhecida entre infecção latente vs TB primária em teste sorológico (SINGH, *et al.*, 2005). Foi ainda descrito que além do IFN- γ , diferentes peptídeos, de regiões RD de *Mtb*, induzem resposta mediada por células por interleucina-10 na TB pulmonar (AL-ATTIYAH; MUSTAFA, 2008) e, como resultado do presente estudo, imunodominância de IgA e não-IgG em pacientes com TBpl em área endemia. Portanto, as proteínas PPE e/ou seus peptídeos tem potencial para serem usados como marcadores específicos no diagnóstico da TB, podendo auxiliar nas investigações diagnósticas realizadas em FP de pacientes com TBpl.

Algumas cepas vacinais BCG, incluindo a usada no Brasil, contêm o gene que codifica o antígeno MPT64 e foi hipotetizado que as células tumorais e a cepa BCG podem compartilhar antígenos (MINDEN *et al.*, 1976; MAVER *et al.*, 1982). No presente estudo, foi observada reatividade cruzada similar a descrita em outros estudos (DHAND *et al.*, 1988; KAISERMANN *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2010; SHE, LITWIN, 2015). Isso pode ser explicado por história de TB previamente curada,

ou possíveis distúrbios de resposta imune desencadeados no curso de doenças não tuberculosas, considerando que a maioria dos antígenos *Mtb* podem compartilhar semelhanças com outras espécies micobacterianas, como BCG e micobactérias atípicas (VAN VOOREN *et al.*, 1990; KAISERMANN *et al.*, 2005). A maioria dos participantes deste estudo é vacinada com BCG mas, mais importante, é que foram utilizadas as amostras clínicas de pacientes classificados como OPL residentes no Rio de Janeiro, cidade com alta taxa de incidência de TB (OLIVEIRA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2017). Assim, é possível que os pacientes tenham apresentado TB como comorbidade não diagnosticada ou LTBI. Quando uma resposta imune é bem-sucedida no controle da infecção, os bacilos de *Mtb* podem estar presentes na forma não replicativa ou se replicam lentamente, definidos dentro de um *status* dinâmico como LTBI, infecção incipiente ou infecção subclínica mas, em geral, clinicamente assintomático (DRAIN *et al.*, 2018). Entretanto, entre os pacientes OPL positivos a diferentes antígenos no ELISA, alguns apresentaram resultados positivos no QFT®. É possível que estivessem em alguma fase do *status* da TB, mas foram erroneamente incluídos no grupo OPL, pois nem todos os recursos disponíveis para o diagnóstico de TB foram aplicados, ou porque são LTBI. Outros estudos em que os espécimes clínicos possam ser investigados pelos diferentes métodos disponíveis devem ser realizados, a fim de confirmar esses dados.

Considerando que o ELISA, aqui desenvolvido, para a detecção de IgA e IgG, utilizando diferentes marcadores, MT10, MPT64, PPE59, MT10.3:MPT64 e a F2, em fluidos corporais de relativo poder invasivo de ser obtido como FP e soro e por ser um teste rápido, simples e de baixo custo à realidade das populações de países em desenvolvimento, os resultados mostram o potencial desta ferramenta para auxiliar no diagnóstico da TBpl. A proteína de fusão MT10:MPT64 se confirmou altamente promissora para ser empregada no teste de ELISA para IgA e IgG em FP e em soro.

Por fim, conseguimos demonstrar aqui o desenvolvimento de um teste rápido, simples e de baixo custo, baseado no dot-ELISA, capaz de identificar pacientes TBpl de forma satisfatória. A proteína fusionada MT10.3:MPT-64 foi reconhecida por IgA no FP e IgG no soro em 100% dos pacientes TBpl, embora tenha apresentado poucos resultados falso-positivos. Este teste deve ser validado em diferentes

unidades diagnóstica para TBpl, podendo ser candidato a um produto de fácil operacionalidade e característica de um teste tipo “*point-of-care*” (POC), principalmente para uma abordagem de triagem. As sensibilidades obtidas no ELISA convencional ou no dot-ELISA colocam este teste como um produto alvo de alta prioridade (TPP) e com perfil excelente para triagem, pois segundo a WHO (2018) testes como sensibilidades de $\geq 95\%$ ou $\geq 90\%$ e especificidades de $\geq 80\%$ ou $\geq 70\%$ estariam na categoria de TPP ótimo ou mínimo para triagem. Para ser incluído como TPP mínimo para diagnóstico o biomarcador deve apresentar sensibilidade $\geq 65\%$ e especificidade $\geq 98\%$ ou TPP ótimo para diagnóstico, sensibilidade $\geq 80\%$ é requerida.

Até o momento, a ADA é o único biomarcador em FP útil e de baixo custo, usado na prática clínica de rotina em cenários de alta prevalência para o diagnóstico de TBpl (GOPI *et al.*, 2007). No entanto, altos níveis de ADA também podem ser observados em outros tipos de infecções, derrame pleural maligno e doenças reumáticas e, portanto, não são específicos para o TBpl (LIGHT, 2010). Apesar da atividade da ADA proporcionar bons resultados quando utilizado o valor padronizado de corte de 40 U/L, estudos recentes sugerem melhores resultados com um valor de corte 1,6 vezes menor que o já estabelecido (SANTOS *et al.*, 2018). Em nosso estudo para avaliação da resposta imune celular, a ADA foi capaz de identificar 5/8 pacientes TBpl testados, mas não apresentou melhores resultados que o teste ELISA “*in house*” IgA-MT10:MPT64 no FP em estudo cego, que identificou 100% dos pacientes TBpl. Embora o ELISA tenha apresentado positividade em dois pacientes não TBpl, esses eram contatos de pacientes TB, o que pode ser uma justificativa para a resposta positiva desses pacientes no teste, uma vez que, podem ter entrado em contato com o bacilo em algum momento e/ou albergar a forma latente da doença. Outra possível explicação é que esses pacientes apresentavam, respectivamente, neoplasia e insuficiência cardíaca, sendo que, resultados falso-positivos de ELISA em pacientes com neoplasia foram relatados por outros autores e podem ser explicados por história prévia de TB curada (DHAND *et al.*, 1988; KAISERMANN *et al.*, 2005) ou possivelmente distúrbios na resposta imune desencadeada no curso de doenças não-tuberculosas, considerando que a maioria

dos antígenos de *Mtb* pode compartilhar algumas semelhanças com outras espécies micobacterianas, como BCG e micobactérias atípicas.

A fim de auxiliar a superar as limitações dos métodos tradicionais e convencionais para diagnósticos de TBpl, como a baixa sensibilidade dos métodos microbiológicos em fluidos pleurais e a necessidade de procedimentos invasivos para biópsia pleural, vários estudos tem se empenhado na busca de biomarcadores em FP (HIRAKI *et al.*, 2003; TIWARI *et al.*, 2007; AMBADE *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2018). A avaliação de biomarcadores em diferentes espécimes clínicos configura uma atraente alternativa para o diagnóstico da TB, uma vez que, a imunopatologia da doença envolve diferentes categorias de citocinas e quimiocinas (SHIMOKATA *et al.*, 1991; NEMETH *et al.*, 2009; SUTHERLAND *et al.*, 2012).

O reconhecimento de *Mtb* por células fagocitárias se dá através de receptores de superfície, incluindo os receptores Toll-like (TLR), receptores de complemento (CR), receptores de manose, receptores de lectina tipo C (DC-SIGN), etc. Este reconhecimento faz com que haja ativação de células fagocíticas em produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1- β , IL-6, IL-12 e IFN- γ (HUYGEN *et al.*, 1988; HIRSCH *et al.*, 1996; HIRSCH *et al.*, 1999). Considerado que os antígenos específicos de *Mtb* ESAT-6/CFP-10 e 38kDa/CFP-10 são usados em avaliações imunodiagnósticas para TB baseado na liberação de IFN- γ pelas células do sangue total e em células mononucleadas do sangue periférico (TAVARES *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012), acessamos a resposta celular a esses antígenos em pacientes TBpl pelo ensaio CBA. O antígeno de *Mtb* PstS-1 (também conhecido como 38kDa), atua como receptor de transporte de fosfato na superfície celular, sendo altamente imunogênico porque contém epítopos específicos de *Mtb* e é antigênica para células T humanas, principalmente quando combinado com CFP10 na infecção latente e ativa da TB. O Ag PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 é composto por uma sequência genica do PstS1 contendo 267 pb que foi fusionado ao CFP10 (ARAÚJO *et al.*, 2014). Esse estudo demonstrou pela primeira vez que PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 promoveu ligeiro aumento da positividade de contatos PPD positivos e a detecção da progressão ativa da doença, sugerindo sua potencial aplicação como marcador de infecção por TB. Assim, no presente estudo, foi avaliado a produção “in vitro” de citocinas por

PBMC e PFMC estimuladas os Ags PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 comparado as proteínas RD1 (região da deleção 1) fusionadas (ESAT6:CFP10) em pacientes com TBpl. Nós demonstramos pela primeira vez que PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 apresentou desempenho semelhante ao internacionalmente utilizado ESAT-6:CFP-10 quanto a produção de citocinas, exceção a IL-6, por PFMC de pacientes TBpl. Embora sem diferença significativa, a IL-6 mostrou tendência ao aumento em pacientes TBpl em PFMC estimuladas com ambos os Ags, bem como em PBMC estimuladas com o ESAT-6:CFP-10. Curiosamente, para o Ag PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, a produção de IL-6 apresentou tendência ao aumento nos pacientes controles em relação aos TBpl. O braço de imunidade Th2 ativa vários mecanismos efetores que promovem a erradicação do patógeno ou, pelo menos, minimizam o dano ao tecido do hospedeiro. Embora em resposta a estes Ags a produção de IL-4 não tenha sido encontrada a produção inespecífica de IL-6 para ambos Ags pode estar denotando proteção ao dano tecidual, já que todos os pacientes possuem alguma morbidade pleural.

Para o IFN- γ produzido pelas PFMC estimuladas com PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, embora tenha apresentado ligeira menor produção média comparada ao ESAT6:CFP-10, apresentou diferença significativa entre pacientes TBpl e controles, sugerindo sua potencial aplicação como um biomarcador de TBpl. Existem alguns estudos que investigaram o padrão de citocinas circulantes por métodos de ELISA em pacientes com TB pulmonar, inclusive em diferentes estágios da doença. Níveis aumentados de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 no soro de pacientes TBpul já foram relatados, sendo a produção elevada de IFN- γ e IL-2 nos níveis leve e moderado da doença, aumento de IL-4 no estágio moderado e avançado da doença, bem como níveis mais altos de IL-10 em pacientes em estágio avançado da doença (DLUGOVITZKY *et al.*, 1997). Em outro estudo, os níveis séricos de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4 e IL-10) em pacientes TB e indivíduos foram analisados, mas nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos níveis de citocinas (LI; XIE, 2004). Além de estudos sobre perfis imunológicos em vários estágios da TB, existem alguns estudos que investigam o impacto da terapia da TB sobre as citocinas. Foi relatado que os níveis de IFN- γ , TNF e IL-10 no soro

foram reduzidos após a interrupção do tratamento da TB (DEVECI *et al.*, 2005). A relação dos perfis de citocinas com o estágio da doença é complexa. (KART *et al.*, 2003). Há estudos mostrando que os níveis de IFN- γ , TNF, IL-4 e IL-5 no plasma foram detectados por CBA após 6 meses de tratamento, apresentando-se diminuídos no estágio moderado da doença, enquanto se encontravam elevados no estágio mais grave (COZMEI *et al.*, 2007). Vários estudos já foram publicados sobre o desempenho do IGRA em PBMC ou adaptados às PFMC no diagnóstico do TBpl (LOSI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; DHEDA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2015a; SANTOS *et al.*, 2018). T-SPOT.TB e QFT-GIT, dois IGRAs aprovados pela OMS para diagnóstico de TB latente (WHO, 2018), foram aplicados em FP para diagnóstico de pleurisia tuberculosa. Em estudo anterior foi demonstrado que a eficácia de células T é 15 vezes maior em PFMC de pacientes TB do que em suas PBMC (WILKINSON *et al.*, 2005). Santos *et al.* (2018) demonstrou que a produção de IFN- γ , IP-10 e ADA foi significativamente maior em PFMC de pacientes TBpl em relação aos casos não-TBpl pelo ensaio QuantiFERON-TB Gold In-Tube. Outro estudo com pacientes TBpl também evidenciou aumento significativo de IFN- γ e IP-10 em efusões pleurais tuberculosas pela técnica de ELISA, com maior sensibilidade para o IP-10 quando comparado ao IFN- γ (89,2% e 84,2%, respectivamente) e igual especificidade (95,7%), sugerindo que o IP-10 é um potencial marcador diagnóstico para avaliar TPpl (SUPRIYA, CHANDRASEKARAN, DAS, 2008). Em nosso estudo, também foi evidenciado maior produção significativa de IFN- γ e IL-10, respectivamente para os Ags PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT6:CFP-10, em PFMC de pacientes TBpl quando comparado às culturas de PBMC, porém utilizamos o ensaio CBA. Ainda são poucos os estudos que utilizam ensaio CBA para avaliar possíveis biomarcadores em PBMC e PFMC de pacientes TBpl. Assim, sugere-se que as células dos sítios ativos da doença também podem ser usados em testes diagnósticos, a fim de avaliar a resposta imune celular após estimulação com Ags específicos de Mtb de acordo com a quantidade de citocinas e quimiocinas produzidas. Assim, o CBA foi utilizado neste estudo para tentar minimizar as limitações apresentada em outros testes, por ser um teste de relativo baixo custo, capaz de dosar mais de uma citocina em uma única amostra e otimização do tempo para obtenção de resultados mais rápidos.

O ensaio CBA utilizado no presente estudo, apresenta várias vantagens, como a detecção de várias citocinas, inclusive aquelas que apresentam níveis mais amplos de detecção, em um mesmo ensaio em formato multiplex, sendo altamente sensível e reprodutível. Além disso, a detecção do perfil de citocinas diretamente da amostra (OLIVER, KETTMAN, FULTON, 1999; MORGAN *et al.*, 2004; TALAT *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2018.], diminui erros do ensaio e das diluição da amostra, presentes em testes como ELISA para dosar citocinas individualmente. Já foi demonstrado em infecções virais e em sepse grave que os ensaios multiplex melhoram os padrões discriminatórios (MAINO; MAECKER, 2004, BOZZA *et al.*, 2007). Em outro estudo envolvendo PBMC de pacientes com TBpul, a análise de CBA revelou níveis diminuídos de IL-2, IL-4, IL-5 e TNF e nenhuma diferença nos níveis de IFN- γ e IL-10 quando comparados com indivíduos saudáveis (AKTAS *et al.* 2009). Um estudo recente mostrou que a expressão de citocinas Th2 foi maior em PBMC de pacientes com TB, apenas com alta expressão de IL-4 e para a proteína GATA3, resultando em aumento da relação Th2/Th1 e GATA3/T-bet nesses pacientes. No entanto, a relação de células Th2 diminuiu após o bloqueio da secreção de IFN- γ pelo inibidor DAPT, além disso, a relação Th2/Th1 em pacientes com TB foi dose-dependente da DAPT, acompanhada pela diminuição de IL-4 e GATA3 (LI *et al.*, 2018). No presente estudo, observamos tendências de respostas mais elevadas de IL-2, IL-10, TNF e IL-17A para ambos os antígenos, bem como aumento significativo de IFN- γ e IL-10 em resposta ao Ags PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e ESAT6:CFP10, respectivamente, em culturas de PFMC quando comparado as culturas de PBMC. Outros estudos utilizando ensaio ELISPOT também mostraram aumento significativo de células produtoras de IFN- γ em culturas de PFMC de pacientes TBpl comprado aos pacientes não TBpl (ADILISTYA; ASTRWINATA; NASIR, 2016) bem como em relação aumento significativo de células produtoras de IFN- γ em culturas de PFMC em relação a culturas de PBMC (LIAO *et al.*, 2014). Assim, avaliação de citocinas em culturas de células provenientes dos sítios de infecção parece apresentar uma melhor *performance* em relação a culturas de PBMC em pacientes TBpl. Diferentes resultados na literatura podem estar relacionados às diferentes formas e estágios clínicos dos pacientes com TB arrolados nos estudos.

As células T na resposta imune protetora ao Mtb são fundamentais, uma vez que, produzem citocinas como o IFN- γ e o TNF, que tem papel crucial na ativação de macrófagos, no controle da replicação micobacteriana e na formação de granuloma tanto em humanos como em camundongos (STENGER; MODLIN, 1999; GARCIA *et al.*, 2002). As citocinas produzidas no local da infecção após interações entre linfócitos T e macrófagos infectados são essenciais para a patogênese da TB (SHER, COFFMAN, 1992; ORAL *et al.*, 2006). Nos últimos anos, os níveis de IFN- γ têm sido relatados como uma valiosa ferramenta diagnóstica para a TBpl (AOE *et al.*, 2003; GRECO *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; MELDAU *et al.*, 2014). Pelo ensaio CBA aqui realizado, foi detectado aumento significativo de IFN- γ em culturas de PFMC primadas com o Ag PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, em pacientes TBpl em relação aos não-TBpl, corroborando com estudos anteriores. Para a dosagem de IFN- γ por CBA, a utilização desse Ag se mostra promissor, uma vez que, apresentou *performance* comparável ao internacionalmente utilizado em testes comerciais, o ESAT-6:CFP10, porém com maior poder de diferenciação entre pacientes TBpl e não-TBpl. Além disso, as PFMC apresentaram significativamente maior produção de IFN- γ quando estimuladas com o PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 em relação as PBMC estimuladas com o mesmo Ag, para ambos os grupos TBpl e controles. Esses resultados são consistentes com os relatos anteriores de que as concentrações de IFN- γ no FP são maiores em pacientes com pleurite tuberculosa em comparação com pacientes com derrames não tuberculosos (RIBERA *et al.*, 1988; SHIMOKATA *et al.*, 1991; WONGTIM *et al.*, 1999; VILLEGAS *et al.*, 2000). Por outro lado, em nosso estudo a produção de TNF tendeu a um discreto aumento em PFMC no grupo TBpl em resposta a ambos os antígenos aqui testados, mas sem diferença significativa. AOE *et al.* (2003) utilizando o ensaio CBA demonstrou que as concentrações de INF- γ em FP de pacientes com pleurisia tuberculosa foram significativamente maiores do que nas efusões malignas, enquanto que não houve diferença significativa entre os grupos para a produção de TNF. Outro estudo relatou aumento significativo nos níveis de INF- γ , acompanhado da ADA, em FP de pacientes TBpl comparado aos que apresentavam efusões malignas (LIU *et al.*, 2011). Em um estudo com camundongos BALB/c infectados com Mtb, foi

demonstrado que em relação às citocinas circulantes no soro e presentes em amostras de biopsia do pulmão, a citocina mais proeminente observada foi o IFN- γ . Durante o curso da doença, os níveis de IFN- γ nas amostras pulmonares e no soro aumentaram rapidamente e atingiram concentrações mais elevadas 4 semanas após a infecção, sendo reduzido durante a terapia eficaz contra o Mtb. A segunda citocina proeminente no curso de TB neste estudo de modelo animal foi TNF. Níveis elevados de TNF foram observados em amostras de biopsia do pulmão e soro na fase aguda e esses níveis permaneceram altos durante a fase crônica da infecção (DE STEENWINKEL *et al.*, 2009). Diferenças na literatura podem estar relacionadas aos diferentes tipos clínicos de TB estudados, bem como aos diversos Ags e amostras clínicas utilizadas.

Sabe-se que o balanço da resposta Th1/Th2 é essencial para uma resposta imune eficaz contra o Mtb, e estudos sugerem que o equilíbrio entre as diversas categorias de citocinas garante um melhor desempenho da resposta para conter a doença (AOE *et al.*, 2003). A dosagem de citocinas já foi usada para caracterizar outras doenças, como asma (KCNYON; KELLY; JARJOUR, 2000) e doenças atópicas como alergias (MAGGI, 1998). Uma resposta Th2 é caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que ativam células B a produzirem anticorpos, entretanto, suprimem a resposta Th1 (TALAT *et al.*, 2011). AOE *et al.* (2003) demonstrou que as concentrações de IL-2, IL-4 e IL-10 no líquido pleural são menores em pacientes com pleurite tuberculosa, embora não haja significância estatística na comparação com o grupo controle. Outros estudos envolvendo modelos animais sugerem que após a fase aguda da infecção pelo Mtb caracterizada por um perfil de resposta Th1, haja uma mudança para uma reação crônica com um padrão de resposta imune Th2, caracterizada pela expressão de citocinas antiinflamatórias, tal como a IL-4. No entanto, o aumento nos níveis de IL-4 durante a progressão da infecção se mostra moderado nos espécimes de biopsia do pulmão e no soro e, assim, não forneceu informações adicionais sobre a progressão da infecção (HERNANDEZ-PANDO *et al.*, 1996; DE STEENWINKEL *et al.*, 2009). No presente estudo, não foi observado produção positiva de IL-4 nos pacientes TBpl e controles para ambos os Ags e tipos celulares utilizados nas culturas. Essa falta de

positividade para a IL-4 em nosso estudo pode estar relacionada ao estágio clínico da doença nos pacientes avaliados, uma vez que, arrolamos apenas pacientes em estágios clínicos iniciais da doença, ausentes de tratamento anti-TB. A discrepância com os estudos envolvendo modelos murinos pode estar relacionado as diferentes formas clínicas das doenças avaliadas, bem como aos diferentes modelos de estudo, uma vez que, aqui incluímos humanos com TBpl e nesses estudos foram avaliados camundongos com TBpul. Por outro lado, em nosso estudo, embora não tenha apresentado diferença significativa entre os grupos TBpl e controles, a produção de IL-10 mostrou tendência de aumento em PFMC de pacientes TBpl, primadas com ambos os Ags, estando elevada significativamente para o Ag ESAT6:CFP-10, quando comparado as culturas de PBMC. Outro estudo avaliando a produção de citocinas por CBA também demonstrou aumento significativo de IL-10 no PF de pacientes TBpl. Estes dados indicaram claramente que a infecção por *Mtb* pode induzir uma resposta pró-inflamatória polarizada por macrófagos M1 (TANG *et al.*, 2014). Utilizando a técnica de ELISA, aumento de IL-10 produzida por PFMC estimuladas com a BCG também foi relatado em pacientes TBpl por outros autores. A expressão espontânea de IFN- α pelas PFMC pode induzir a produção de IL-10 durante estimulação com a BCG levando a inibição da produção de IL-1 β , modulando a resposta para um perfil Th2 (MA *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que a IL-10 diminui a resposta imune protetora ao *Mtb*, contribuindo para a suscetibilidade do hospedeiro à doença (TURNER *et al.*, 2002; BEAMER *et al.*, 2008; SCHREIBER *et al.*, 2009; REDFORD *et al.*, 2010). No entanto, ainda não está claro quais células produzem IL-10, limitando a proteção do hospedeiro (REDFORD, MURRAY, O'GARRA, 2011; O'GARRA *et al.*, 2013). Em um estudo utilizando camundongos deficientes de IL-10, mostrou que essa citocina é expressa por células da resposta imune inata (predominantemente por monócitos) e adaptativa (predominantemente por células T) durante a infecção por *Mtb in vivo*. Foi demonstrado produção de IL-10 por células T efetoras ativadas, cuja expressão durante a infecção por TB foi regulada pela IL-27 e pelo IFN tipo I. Assim, esses dados revelam que, apesar das múltiplas fontes imunológicas produtoras da IL-10 durante a infecção por *Mtb*, as células T efetoras ativadas são as responsáveis pela

suscetibilidade à TB, induzida pela produção de IL-10 (MOREIRA-TEIXEIRA *et al.*, 2017). Vários achados sugerem que a IL-10 produzida por células T produtoras de INF- γ desempenha um papel importante na supressão da resposta imune protetora do hospedeiro ao Mtb. Curiosamente, observamos produção significativamente aumentada de IL-10 em PFMC estimuladas com o ESAT-6:CFP10, mas isso não impactou na tendência a maior produção de INF- γ . Entretanto, as culturas de PBMC estimuladas com o Ag PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 apresentaram produção significativamente aumentada de IL-10 em pacientes TBpl, o que promoveu uma produção menor de INF- γ em PBMC estimuladas com este Ag quando comparadas ao ESAT6:CFP10. O fato de que diferentes componentes micobacterianos podem induzir resposta diferenciada na produção de citocinas foi evidenciado em macrófagos humanos estimulados com lipoarabinomanana (LAM) de cepas virulentas x não virulentas, ou com outras frações lipídicas e protéicas (DAHL *et al.*, 1996).

A IL-17 também participa da resposta imune, pois regulação da resposta Th1 e Th17 durante a TB é essencial para promover a imunidade anti-micobactérias e evitar extensas consequências imunopatológicas (TORRADO; COOPER, 2010). Vários estudos já foram publicados sobre a secreção de IL-17 em pacientes com TB ativa. Um estudo (PENG *et al.*, 2008) relatou que a proporção de células produtoras de IL-17 entre os linfócitos era semelhante entre pacientes com TB e saudáveis, mas as células produtoras de IL-17 na população de células T gama-delta estavam aumentadas em pacientes com TBpulmonar. Jurado *et al.* (2012) descrevem que a IL-17 induzida por Mtb foi marcadamente aumentada no sangue de pacientes com TBP ativa e, que, a expressão de IL-17 em linfócitos foi maior em lesões pulmonares graves, refletindo a gravidade das lesões nos pulmões. Um estudo recente (NUNNARI *et al.*, 2013) mostrou que a estimulação de PBMC de pacientes TB pulmonar com PPD não estimulou significativamente a liberação de IL-17. Outros autores sugerem tendência ao aumento da produção de IL-17 em PBMC de pacientes com TBpul cavitária. (FAN *et al.*, 2015). Mas, em nosso estudo, a IL-17A não foi induzida significativamente por nenhum dos antígenos estudados, embora tenha apresentado tendência a aumento no grupo TBpl em relação aos controles,

associada a ambos os Ags em culturas de PFMC, bem como quando comparado as culturas de PBMC. Outros estudos também mostraram aumento na produção de IL-17 em culturas de PFMC de pacientes com TBpl quando comparado as culturas de PBMC (ZHANG *et al.*, 2018b).

Este estudo apresenta algumas limitações, tais como: 1) na falta de um teste diagnóstico preciso para a TBpl e as limitações da ADA, é possível que algum paciente estivesse em alguma fase do *status* da TB, inclusive LTBI, mas foram erroneamente incluídos no grupo OPL, pois nem todos os recursos disponíveis para o diagnóstico de TB foram aplicados, 2) o baixo número de pacientes arrolados no estudo da resposta imune celular, bem como a não avaliação do perfil das células mononucleadas utilizadas nas culturas, impossibilitou a identificação dos tipos celulares produtores das citocinas, 3) o recrutamento dos pacientes arrolados no estudo foi realizado em um único centro de atendimento de saúde, o HUPE, que é um hospital terciário, e portanto, atende casos especializados, após encaminhamentos de unidades primárias e secundárias, o que contribui para a limitação na captação dos casos incluídos, 4) o não acompanhamento da evolução clínica dos pacientes, o que tornaria possível averiguação de adoecimento para TBpl nos casos falso-positivos nos testes aqui propostos.

6 CONCLUSÕES

- ELISA desenvolvido, para a detecção de IgA e IgG em fluidos corporais de poder invasivo relativo (FP e soro) contra diferentes antígenos micobacterianos para diagnóstico de TBpl, foi aqui descrito.
- A proteína fusionada MT10:MPT64 foi validada, em nova coorte, como Ag altamente promissor em ELISA FP IgA;
- Embora apresentando menor sensibilidade para IgG-MT10:MPT64 no soro, adiciona positividade com outros testes da rotina convencional.
- Pela primeira vez, a PPE59 é reconhecida por IgA FP com sensibilidade e especificidade mais elevada que os dos ensaios microbiológicos convencionais.
- Os resultados combinatórios de FP (1:50) IgA MT-10:MPT64/F2 foram melhores que os testes diagnósticos convencionais, mas sua combinação com ADA aumentou a sensibilidade no diagnóstico de TBpl.
- Assim, o ELISA FP IgA-MT10.3:MPT64, IgA-PPE59 e IgA-MT-10:MPT64/F2 tem potencial em teste alternativo e rápido para auxiliar no diagnóstico de TBpl.
- Em estudo cego, ELISA FP e soro IgA-MT-10:MPT64/F2 foi capaz de identificar todos os pacientes TBpl, porém apresentou resultados falso-positivos. Portanto, outros estudos devem ser realizados para confirmar estes resultados e a acurácia do teste rápido.
- Dot-ELISA FP IgA e IgG soro, pela primeira vez demonstrado conceitualmente que é sensível e suficientemente específico na detecção da TBpl usando o marcador MT10.3:MPT64.
- Aumento significativo na produção de IFN- γ por PFMC estimulado com PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 em TBpl vs controle, sugere-se sua utilização como promissor biomarcador na TBpl.
- IL-10 tende a estar aumentada na TBpl, porém sem diferença significativa em relação aos controles.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS:

- O ensaio imunoenzimático com a proteína fusionada MT10.3:MPT64 deverá ser melhor explorado quanto o seu potencial para teste rápido do tipo “*point-of-care*” (POC), que poderá trazer benefícios para auxiliar o diagnóstico da TBpl na atenção primária da rotina clínica.
- Tanto o ELISA convencional como o dot-ELISA IgA-MT10.3:MPT64 se caracterizam como testes TPP ótimo. Portanto, com excelente potencial para teste de triagem no manejo dos casos de derrame pleura a investigar para TBpl.
- Um maior número de pacientes deve ser avaliado para os potenciais biomarcadores identificados neste estudo como o IFN- γ e IL-10 utilizando o novo antígeno PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 em comparação ao ESAT6:CFP10.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

ABEBE, F.; HOLM-HANSEN, C.; WIKER, H. G.; BJUNE, G. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol.*, v. 66, n. 2-3, p. 176-191, 2007. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01978.x>

ABEBE, F.; BELAY, M.; LEGESSE, M.; MIHRET, A.; FRANKEN, K. S. Association of ESAT-6/CFP-10-induced IFN- γ , TNF- α 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.*, v. 189, n. 2, p. 241–249, 2017.

ACHKAR, J. M.; LAWN, S. D.; MOOSA, M. Y.; WRIGHT, C. A.; KASPROWICZ, V. O. Adjunctive tests for diagnosis of tuberculosis: serology, ELISPOT for site-specific lymphocytes, urinary lipoarabinomannan, string test, and fine needle aspiration. *J Infect Dis.*, n. 204 Suppl 4:S1130-41, 2011. doi: 10.1093/infdis/jir450.

ACHKAR, J. M.; CHAN, J.; CASADEVALL, A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev.* HHS public access, v. 264, n. 1, p. 167-181, 2015.

AKTAS, E.; CIFTCI, F.; BILGIC, S.; SEZER, O.; BOZKANAT, E.; DENIZ, O.; CITICI, U.; DENIZ, G. Peripheral Immune Response in Pulmonary Tuberculosis. *Scandinavian journal of immunology*, v. 70, n. 3, p.300-308, 2009.

ALVAREZ, N.; OTERO, O.; CAMACHO, F.; BORRERO, R.; TIRADO, Y.; PUIG, A.; AGUILAR, A.; RIVAS, C.; CERVANTES, A.; FALERO-DÍAZ, G.; CÁDIZ, A.; SARMIENTO, M. E.; NORAZMI, M. N.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; ACOSTA, A. Passive administration of purified secretory IgA from human colostrum induces protection against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model of progressive pulmonary infection. *BMC immunology*, 14 Suppl 1(Suppl 1), S3, 2013.

ADILISTYA, T.; ASTRAWINATA, D. A. W.; NASIR, U. Z. Use of pleural fluid interferon-gama Enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of pleural tuberculosis. *Acta Med Indones*, v. 48, n. 1, p. 41-47, 2016.

AGGARWAL, A. N.; AGARWAL, R.; GUPTA, D.; DHOORIA, S.; BEHERA, D. Interferon Gamma Release Assays for Diagnosis of Pleural Tuberculosis: a Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol*; v. 53, p. 2451-2459, 2015 <https://doi.org/10.1128/JCM.00823-15> PMID: 25994163

AL-ATTIYAH, R.; MUSTAFA, A. S. Characterization of human cellular immune responses to novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens encoded by genomic regions absent in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.*, v. 76, p. 4190–4198, 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00199-08>

ALI, M. Treating tuberculosis as a social disease. *Lancet*, v. 383: 2195, 2014.

ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHEL, A. L.; WILLIAMS, M.; VAN HELDEN, P. D.; WARREN, R. M.; VAN PITTIUS, N. C. G. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, M. Mungi. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 16, p. 1296–1299, 2010.

ALMEIDA L. A.; ARAUJO R. Highlights on molecular identification of closely related species. *Infect Genet Evol.*, v. 13, p. 67-75, 2013.

ALVES, R.; NATAL, S. Epidemiologia e controle da tuberculose. In: SANT'ANNA C.C. (ed.) *Tuberculose na infância e na adolescência*. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 5-16, 2002.

AMBADE, V.; ARORA, B.; RAI, C.; NIKUMB, S. K.; BASANNAR, D. R. Markers for differentiation of tubercular pleural effusion from non-tubercular effusion. *MJAFI*, v. 67, p. 338-342, 2011.

AMICOSANTE, M. Rational use of immunodiagnostic tools for tuberculosis infection. *Tuberculosis*, p. 93–107, 2010.

AMICOSANTE, M.; D'AMBROSIO, L.; MUNOZ, M.; MELLO, F. C. Q.; TEBRUEGGE, M.; CHEGOU, N. N.; SEGHRUCHNI, F.; CENTIS, R.; GOLETTI, D.; BOTHAMLEY, G.; MIGLIORI, G. B.; TB DIAGNOSTIC SURVEY WORKING GROUP. Uso atual e aceitabilidade de novos testes diagnósticos para tuberculose ativa: um inquérito mundial. *J. bras. pneumol.*, v.43, n.5, p. 380-392, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37562017000000219>

ANDRADE, C. H.; PAQUALOTO, K. F. M.; ZAIM, M. H.; FERREIRA, E. I. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: Inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 44, n. 2, p. 166-179, 2008.

ANDERSEN, A. B.; LJUNGQVIST. L.; HASLØV, K.; BENTZON, M. W. MPB 64 Possesses Tuberculosis-Complex'-Specific B- and T-Cell Epitopes. Scadinavian journal of immunology, v. 34, n. 3, p. 365-372, 1991.

AOE, K.; HIRAKI, A.; MURAKAMI, T.; EDA, R.; MAEDA, T.; SUGI, K.; TAKEYAMA, H. Diagnostic significance of interferon-gamma in tuberculous pleural effusions. Chest, n. 123, p.740-744, 2003.

APPELBERG, R. CD4+ T cells are required for antigen-specific recruitment of neutrophils by BCG-immune spleen cells. Immunology, v. 75, 414 p., 1992.

ARANAZ, A.; LIEBANA, E.; HOMEZ-MANPASO, E.; GALAN, J. C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLAZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae subsp. nov: a taxonomical study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int. J. Syst. Bacteriol. n. 49, p. 1263-1273, 1999.

ARAUJO; L. S.; MACIEL, R. M.; TRAJMAN, A.; SAAD, M. H. Assessment of the IgA immunoassay diagnostic potential of the *Mycobacterium tuberculosis* MT10.3-MPT64 fusion protein in tuberculous pleural fluid. Clin Vaccine Immunol., v. 17, n. 12, p.:1963-1969, 2010. doi: 10.1128/CVI.00372-10.

ARAUJO, L. S.; MELLO, F. Q.; SILVA, N. B. M.; LEUNG, J. A. W.; MACHADO, S. M. A.; SARDELLA, I. G.; MACIEL, R. M.; SAAD, M. H. F. 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., v. 21, n. 4, p. 552-560, 2014.

ARAUJO, L. S.; DA SILVA, N. B. M.; LEUNG, J. A. M.; MELLO, F. C. Q.; SAAD, M. H. F. IgG subclasses' response to a set of mycobacterial antigens in different stages of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Tuberculosis (Edinb)., v. 108, p. 70-76, 2018. doi: 10.1016/j.tube.2017.10.010.

ARIAS GUILLÉN, M. Advances in the Diagnosis of Tuberculosis Infection. Arch. Bronconeumol. (English Ed.), v. 47, p. 521–530, 2011.

AYVASIAN, L. F. History of Tuberculosis. In: REICHMAN, L.B.; HERSHFELD, E.S. (eds) Tuberculosis: A comprehensive international approach. New York: Marcel Dekker. p. 1-20, 1994.

BAI, Y.; XUE, Y.; GAO, H.; WANG, L.; DING, T.; BAI, W.; FAN, A.; ZHANG, J.; AN, Q.; XU, Z. Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and MPT64 fusion protein and its immunoprophylactic potential in mouse model. Protein Expr Purif., v. 59, n. 2, p. 189-96, 2008.

BAI, X. J.; YANG, Y. R.; LIANG, J. Q.; AN, H. R.; WANG, J.; LING, Y. B.; WU, X. Q. Diagnostic performance and problem analysis of commercial tuberculosis antibody detection kits in China. Military Medical Research, v. 5, n. 10, 2018. <http://doi.org/10.1186/s40779-018-0157-6>

BLANCHARD, D. K.; MICHELINI-NORRIS, M. B.; FRIEDMAN H. D.; JEU, J. Y. Lysis of mycobacteria-infected monocytes by IL-2 activated killer cells: role of LFA-1. Cell. Immunol., v. 119, p. 402-411, 1989.

BATES, J. H.; STEAD, W. W. The History of Tuberculosis as a Global Epidemic. Medical Clinics of North America, v. 77, n. 6, p. 1205-1216, 1993.

BAUMANN, R.; KAEMPFER, S.; CHEGOU, N. N.; OEHLMANN, W.; LOXTON, A. G.; KAUFMANN, S. H. E.; VAN HELDEN, P. D.; BLACK, G. F.; SINGH, M.; WALZL, G. Serologic diagnosis of tuberculosis by combining Ig classes against selected mycobacterial targets. J. Infect., v. 69, p. 581–589, 2014.

BEAMER, G. L.; FLAHERTY D. K.; ASSOGBA B. D.; STROMBERG P.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; DE WAAL MALEFYT, R.; VESOSKY, B.; TURNER, J. Interleukin-10 promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice. J.Immunol. v. 181, p. 5545–5550, 2008.

BEHLER, F.; STEINWEDE, K.; BALBOA, L.; UEBERBERG, B.; MAUS, R.; KIRCHHOF, G.; YAMASAKI, S.; WELTE, T.; MAUS, U. A. Role of mincle in alveolar macrophage-dependent innate immunity against mycobacterial infections in mice. J. Immunol., v. 189, p. 3121-312, 2012.

BELKNAP, R.; DALEY, C. L. Interferon-Gamma Release Assays. Clin. Lab. Med., v. 34, p. 337–349, 2014.

BETHLEM, E. P. Manifestações Clínicas da Tuberculose Pleural, Ganglionar, Geniturinária e do Sistema Nervoso Central. Pulmão RJ, v. 21, n. 1, p. 19-22, 2012.

BERMEJO, M. C.; CLAVERA, I.; ROSA, F. J. M.; MARIN, B. Epidemiology of tuberculosis. An. Sist. Sanit. Navar., v. 30, n. 2, p. 7-19, 2007.

BOZZA, F. A., SALLUH, J. I., JAPIASSU, A. M., SOARES, M., ASSIS, E. F., GOMES, R. N., BOZZA, M. T., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., BOZZA, P. T. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. Crit Care, v. 11, n. 2, R49, 2007.

BEZERRA, J. M.; BECK, S. T.; KANUNFRE, K. A.; LEITE, O. M.; FERREIRA, A. W. A study of IgA antibody response to different *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the diagnosis and monitoring of pulmonary tuberculosis. Braz J Infect Dis., v. 13, n. 1, p. 53-58, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702009000100012>.

BEVILAQUA, A.; BODART, C.; SUCUPIRA, E.; MENEZES, G.; WARTH, G.; CHAVES, G.; MACIEL, J.; AMORIM, K.; SELIG, L.; GUAZZI, M.; PINHEIRO, M.; MARTINS, M.; SOUZA, O.; ZUIM, R.; BITTAR, S.; OLIVEIRA, S.; MARQUES, F. Boletim Tuberculose. Secretária do Estado do Rio de Janeiro. Gerência de Pneumologia Sanitária \DTI\COVEP\SVEA\SVS\SES, p. 1–28, 2014.

BOOM, W. H.; CANADAY, D. H.; FULTON, S. A.; GEHRING, A. J.; ROJAS, R. E.; TORRES, M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. Tuberculosis (Edinb).; n. 83, v. 1–3, p. 98–106, 2003.

BOMBARDA, S.; FIGUEIREDO, C. M.; FUNARI, M. B. D. G.; SOARES JÚNIOR, J.; SEISCENTO, M.; TERRA FILHO, M. Imagem em tuberculose pulmonar. J. Pneumol., v. 27, p. 329–340, 2001.

BOTTAI, D.; BROSCH, R. Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families. Mol Microbiol., v. 73, n. 3, p. 325-328, 2009. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06784.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06784.x).

BRASIL 2018. Boletim Epidemiológico nº 11: Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, v. 49, n. 11, 18pp., 2018. ISSN 2358-9450

BRENNAN, P.J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.*, v. 64, p. 29-63, 1995.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. *Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 26ª edição. AMGH Editora Ltda. Porto Alegre, RS, 2014.

CAPONE, D. Patogenia E Imunologia. *Rev. do Hospital Univ. Pedro Ernesto, UERJ*, v. 5, p. 27–34, 2006.

CANDELA, A.; ANDUJAR, J.; HERNÁNDEZ, L.; MARTÍN, C.; BARROSO, E.; ARRIERO, J. M.; ROMERO, S. Functional sequelae of tuberculous pleurisy in patients correctly treated. *Chest*, v. 123, n. 6, p. 1996-2000, 2003. doi: <https://doi.org/10.1378/chest.123.6.1996>;

CARMINERO, J. The old battle between the human species and Koch's bacillae. Can one dream of eradicating tuberculosis? *An. Sist. Sanit. Navar.*, v. 30, n. 2, p. 163-180, 2007.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.A. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Adv. Immunol.*, v. 91, p. 1-44, 2006.

CASTELO FILHO, A.; KRITSKI, A. L.; BARRETO, Â. W.; LEMOS, A. C. M.; NETTO, A. R.; GUIMARÃES, C. A. *et al.* II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose, *J. Bras. Pneumol.*, v. 30, p. S57–S86, 2004.

CHAKHAIYAR, P.; NAGALAKSHMI, Y.; ARUNA, B.; MURTHY, K. J.; KATOCH, V. M.; HASNAIN, S.E. Regions of high antigenicity within the hypothetical PPE major polymorphic tandem repeat open-reading frame, Rv2608, show a differential humoral response and a low T cell response in various categories of patients with tuberculosis. *J Infect Dis.*, v. 190, n. 7, p. 1237-1244, 2004.

CHAN, J.; MEHTA, S.; BHARRHAN, S.; CHEN, Y.; ACHKAR, J. M.; CASADEVALL, A.; FLYNN, J. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Seminars in Immunology*, v. 26, p. 588–600, 2014.

CHEN, J.; SU, X.; ZHANG, Y.; WANG, S.; SHAO, L.; WU, J.; WANG, F.; ZHANG, S.; WANG, J.; WENG, X.; WANG, H.; ZHANG, W. Novel recombinant RD2- and RD11-encoded *Mycobacterium tuberculosis* antigens are potential candidates for diagnosis of tuberculosis infections in BCG-vaccinated individuals. *Microbes Infect.*, v. 11(10-11), p. 876–885, 2009. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.008>.

CHIN, S. T.; IGNATIUS, J.; SURAIYA, S.; TYE, G. J.; SARMIENTO, M. E.; ACOSTA, A.; NORAZMI, M. N.; LIM, T. S. Comparative study of IgA V H 3 gene usage in healthy TST- and TST+ population exposed to tuberculosis: deep sequencing analysis. *Immunology*, v. 144, p. 302–311, 2015.

CILEDAG, A.; KAYA, A.; EROL, S.; SEN, E.; CELIK, G.; CESUR, S.; FIDAN, Y.; KINIKLI, S. The comparison of pleural fluid TNF-alpha and IL-10 levels with ADA in tuberculous pleural effusion. *Curr Med Chem*, v. 17, n 19, p. 2096-2100, 2010.

COLE, S. T.;BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY III, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM,D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL,T.; GENTLES, S.; HALMIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGHS, A.; McLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARE, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B.G. .Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* v. 393, p. 537-544, 1998a.

COLE, S. T.; BARRELL, B. G. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found Symp*, v. 217, p. 160–172 (discussion 172–167), 1998b. doi: <https://doi.org/10.1002/0470846526.ch12>.

CONDE, MB. O diagnóstico da tuberculose pulmonar utilizando três diferentes testes. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.*, v. 27, p. 393–422, 2009.

CONSTANT, P.; DAVODEAU, F.; PEYRAT, M. A.; POQUET, Y.; PUZO, G.; BONNEVILLE, M.; FOURNIE, J. J. Stimulation of human gamma/delta t cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*, v. 264, p. 267-270, 1994.

COSTA, D. C. Considerações sobre a tendência da tuberculose no Brasil. *Cad. Saude Publica*, v. 1, p. 313–326, 1985.

COSTA, J. T.; SILVA¹, R.; SÁ¹, R.; CARDOSO, MJ.; RIBEIRO, C.; NIENHAUS, A. Comparação do teste de libertação do interferão- γ e da prova de tuberculina no rastreio de profissionais de saúde. *Revista portuguesa de pneumologia*, v. 16, n. 2, p.211-221, 2010.

COUSINS, D. V.; BATISTA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* n. 53, p. 1305-1314, 2003.

COZMEI, C.; CONSTANTINESCU, D.; CARASEVICI, E.; ANISIE, E.; UNGUREANU, D.; SORETE-ARBORE, A.; GRAMADĂ, D.; MIHĂESCU, T.; CROITORU, C.; POPA, D. Th1 and Th2 cytokine response in patients with pulmonary tuberculosis and health care workers occupationally exposed to *M. tuberculosis*. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*, v. 111, p. 702–709, 2007.

CROFTON, J.; HORNE, N & MILLER, F. *Tuberculose Clinica*. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 1994.

CUDAHY, P.; SHENOI, S. Diagnostics for pulmonary tuberculosis. *Postgrad Med J*, v. 92, n. 1086, p. 187–193, 2016.

DAMAYANTI, N.; YUDHAWATI, R. The comparison of pleural fluid TNF-a levels in tuberculous and nontuberculous pleural effusion, *Indian J Tuberc.*, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2018.05.017>

DANIEL, T.M. The History of Tuberculosis. *Respir Med.*, v. 100, n. 11, p. 1862-1870, 2006.

DAVIDOW, A.; KANAUIA, G. V.; SHI, L.; KAVIAR, J.; GUO, X. D.; SUNG, N.; KAPLAN, G.; MENZIES, D.; GENNARO, M. L. Antibody Profiles Characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection State Infect. Immun.*, v. 73, n. 10, p. 6846-6851, 2005.

DE LA BARRERA, S.; ALEMAN, M.; MUSELLA, R.; SCHIERLOH, P.; PASQUINELLI, V.; GARCIA, V.; ABBATE, E.; SASIAIN MDEL, C. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on *Mycobacterium tuberculosis*-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 138, n. 1, p. 128-138, 2004.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, v. 5, 2013.

DENG, W.; XIE, J. Ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* PPE family in pathogenesis and implications for novel measures against tuberculosis. *J Cell Biochem.*, v. 113, n. 4, p. 1087-1095, 2012. doi: 10.1002/jcb.23449.

DEVECI, F.; AKBULUT, H. H.; TURGUT, T.; HAMDİ MUZ, M. Changes in Serum Cytokine Levels in Active Tuberculosis With Treatment. *Mediators of Inflammation*:v . 5, p. 256–262, 2005. doi: 10.1155/MI.2005.256

DAHL, K. E.; SHIRATSUCHI, H.; HAMILTON, B. D.; ELLNER, J. J.; TOOSSI, Z. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, v. 64, n. 2, p. 399-405, 1996.

DEMKOW, U.; ZIOLKOWSKI, J.; BIALAS-CHROMIEC, B.; FILEWSKA, M.; ZIELONKA, T.; WASIK, M.; ROWINSKA-ZAKRZEWSKA, E. Humoral immune response against mycobacterial antigens in children with tuberculosis. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 57(Suppl. 4), p. 63-73, 2006.

DE STEENWINKEL, J. E.; DE KNEGT, G. J.; TEN KATE, M. T.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A.; HERNANDEZ-PANDO, R.; VAN SOOLINGEN, D.; BAKKER-WOUDENBERG, I. A. Immunological parameters to define infection progression and

therapy response in a well-defined tuberculosis model in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol.*, v. 22, n. 3, p. 723-734, 2009.

DHAND, R.; GANGULY, N. K.; VAISHNAVI, C.; GILHOTRA, R.; MALIK, S. K. False-positive reactions with enzyme-linked immunosorbent assay of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in pleural fluid. *J Med Microbiol*, v. 26, p. 241–243, 1988. doi: <https://dx.doi.org/10.1099/00222615-26-4-241>

DHEDA, K.; VAN ZYL-SMIT, R. N.; SECHI, L. A.; BADRI, M.; MELDAU, R.; MELDAU, S.; SYMONS, G.; SEMPLE, P. L.; MAREDZA, A.; DAWSON, R.; WAINWRIGHT, H.; WHITELAW, A.; VALLIE, Y.; RAUBENHEIMER, P.; BATEMAN, E. D.; ZUMLA, A. Utility of quantitative T-cell responses versus unstimulated interferon- γ for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Eur Respir J.*, v. 34, n. 5, p. 1118-1126, 2009. doi: <https://doi.org/10.1183/09031936.00005309>.

DIACON, A. H.; VAN DE WAL, B. W.; WYSER, C.; SMEDEMA, J. P.; BEZUIDENHOUT, J.; BOLLIGER, C. T.; WALZL, G. Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. *Eur Respir J*, v. 22, p. 589-591, 2003. doi: [10.1183/09031936.03.00017103a](https://doi.org/10.1183/09031936.03.00017103a)

DLUGOVITZKY, D.; TORRES-MORALES, A.; RATENI, L.; FARRONI, M. A.; LARGACHA, C.; MOLTENI, O.; BOTTASSO, O. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 18, p. 203–207, 1997.

DOHERTY, T. M.; DEMISSIE, A.; OLOBO, J.; WOLDAY, D.; BRITTON, S.; EGUALE, T.; RAVN, P.; ANDERSEN, P. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis* specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 704–705, 2002.

DOMENECH, P.; BARRY, C.E.; COLE, S. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Current Opinion in Microbiol.* v.4, n.1, p.28-34, fev. 2001.

DONG, X.; YANG, J. High IL-35 Pleural Expression in Patients with Tuberculous Pleural Effusion. *Med. Sci. Monit.*, v. 21, p. 1261-1268, 2015. DOI: [10.12659/MSM.892562](https://doi.org/10.12659/MSM.892562)

DRAIN, P. K.; BAJEMA, K. L.; DOWDY, D.; DHEDA, K.; NAIDOO, K.; SCHUMACHER, S. G.; MA, S.; MEERMEIER, E.; LEWINSOHN, D. M.; SHERMAN, D. R. Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 31, n. 4, p. e00021-18, 2018. doi: 10.1128/CMR.00021-18.

DUARTE, R.; KINDLELÁ, N. J. M.; CARRACEDO, J.; SÁNCHEZ-GUIJO, P.; RAMÍREZ, R. *Mycobacterium tuberculosis* Induces Apoptosis in T Lymphocytes from Patients with Advanced Clinical Forms of Active Tuberculosis. *Clin Diag Lab Immun*, v. 4, n. 1, p. 14 – 18, 1997.

DUNLAP, N.E.; BRILES, D. E. Immunology of tuberculosis. *Med Clin North Am*, v. 77, n. 6, p. 1235-1251, 1993.

EHLERS, S. Pathomorphogenesis of tubercular histologic changes: mechanisms of granuloma formation, maintenance and necrosis. *Internist (Berl)*, v. 44, n. 11, p. 1363-1373, 2003.

EL FENNIRI, L.; TOOSI, Z.; AUNG, H.; EL IRAKI, G.; BOURKKADI, J.; BENAMOR, J.; LASKRI, A.; BERRADA, N.; BENJOUAD, A.; MAYANJA-KIZZA, H.; BETTS, M. R.; EL AOUAD, R.; CANADAY, D H. Polyfunctional *Mycobacterium tuberculosis*-specific effector memory CD4+ T cells at sites of pleural TB. *Tuberculosis*, v. 91, p. 224-230, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.12.005> PMID: 21459675

ERNST, J.D.; TREVEJO-NUÑEZ, G.; BANAIEE, N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest.*, v. 117, n. 7, p. 1738-1745, 2007.

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. *Scand J Immunol.*, v. 81, n. 1, p. :46-55, 2015. doi: 10.1111/sji.12249.

FAN, L.; XIAO, H.; MAI, G.; SU, B.; ERNST, J.; HU, Z. Impaired *M. tuberculosis* Antigen-Specific IFN- γ Response without IL-17 Enhancement in Patients with Severe Cavitory Pulmonary Tuberculosis. *PLoS One*, v. 10, n. 5, p. e0127087, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0127087.

FANLO, P.; TIBERIO, G. Tuberculosis extrapulmonar/Extrapulmonary tuberculosis. An. Sist. Sanit. Navar., vol. 30, Suplemento 2, p. 143-162, 2007.

FENG, X.; YANG, X.; XIU, B.; QIE, S.; DAI, Z.; CHEN, K.; ZHAO, P.; ZHANG, L.; NICHOLSON, R. A.; WANG, G.; SONG, X.; ZHANG, H. IgG, IgM and IgA antibodies against the novel polyprotein in active tuberculosis. BMC Infect. Dis., v. 14, p. 336, 2014. doi: 10.1186/1471-2334-14-336

FERRAZ, J. C.; MELO, F. B.; ALBUQUERQUE, M. F.; MONTENEGRO, S. M.; ABATH, F. G. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. Braz J Med Biol Res., v. 39, n. 11, p. 1387-1397, 2006.

FILHO CB. História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001. 248p. Antropologia & Saúde collection. ISBN 85-7541-006-7.2001

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C. J.; SCHREIBER, R.; MAK, T. W.; BLOOM, B. R. Tumor necrosis factor alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Immunity, 2, n. 6, p. 561-572, 1995.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. Annu. Ver. Immunol., v. 19, p. 93-129, 2001.

FOGEL N. Tuberculosis: A disease without boundaries. Tuberculosis 95: 527–531, 2015.

FREEDMAN, A. G. Advantages in antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy. FEMS Immunol and Medical Microbiology, v. 39, p. 9-16, 2003.

FRIEDRICH, S. O.; VON GROOTE-BIDLINGMAIER, F.; DIACON, A. H. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pleural tuberculosis. J Clin Microbiol, v. 49, p. 4341-4342, 2011.

FULTON, S. A.; CROSS, J. V.; TOOSSI, Z. T.; BOOM, W. H. Regulation of interleukin-12 by interleukin-10, transforming growth factor-beta, tumor necrosis

factor-alpha, and interferon-gamma in human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J. Infect. Dis.*, v. 178, n. 4, p. 1105-1114, 1998.

GAKIS, C.; NAITANA, A.; ORTU, A. R.; CONTU, A.; BECHERE, M. Adenosine deaminase activity in the diagnosis of infectious diseases. *Infect Med*, p. 219–232, 1994.

GALDSTON I 1954. The White Plague, Tuberculosis; Man and Society. *Bulletin of the Medical Library Association*, v. 42, n. 1, p. 142-143, 2006.

GAO, Y.; OU, Q.; WU, J.; ZHANG, B.; SHEN, L.; CHEN, S.; WENG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.; SHAO, L. Potential diagnostic value of serum/pleural fluid IL-31 levels for tuberculous pleural effusion. *Sci. Rep.*, v. 11, n. 6, p. 20607, 2016. doi: 10.1038/srep20607

GARCIA M, VARGAS JA, CASTEJON R, NAVAS E, DURANTEZ A. Flow-cytometric assessment of lymphocyte cytokine production in tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, v. 82, p. 37–41, 2002.

GARG, S. K.; TIWARI, R. P.; TIWARI, D.; SINGH, R.; MALHOTRA, D.; RAMNANI, V. K.; PRASAD, G. B. K. S.; CHANDRA, R.; FRAZIANO, M.; COLIZZI, V.; BISEN, P. S. Diagnosis of tuberculosis: Available technologies, limitations, and possibilities. *J. Clin. Lab. Anal.*, v. 17, p. 155–163, 2003.

GETAHUN, H.; HARRINGTON, M.; O'BRIEN, R.; NUNN, P. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet*, v. 16, n. 369, p. 9578, 2042-2049, 2007.

GEROSA, F.; NISII, C.; RIGHETTI, S.; MICCIOLO, R.; MARCHESINI, M.; CAZZADORI, A.; TRINCHIERI, G. CD4(+) T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin. Immunol.*, v. 92, n. 3, p. 224-234, 1999.

GIDEON, H. P.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: what the host “sees”? *Immunol Rev. NIH.*, v. 50, p. 202–212, 2013.

GILSDORF, J. R. Antigenic diversity and gene polymorphisms in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, v. 66, n. 11, p. 5053–5059, 1998.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; p. 315, 1984.

GLATMAN-FREEDMAN, A.; CASADEVALL, A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*, v.11, p. 514–532, 1998.

GLATMAN-FREEDMAN, A. Advantages in antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy. *FEMS Immunol. Med Microbiol.*, v. 39, p. 9–16, 2003. doi: [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00172-X](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00172-X).

GLATMAN-FREEDMAN, A.. The role of antibody-mediated immunity in defense against *Mycobacterium tuberculosis*: advances toward a novel vaccine strategy. *Tuberculosis (Edinb)*, v. 86, p. 191–197, 2006.

GOMES, T.; REIS-SANTOS, B.; BERTOLDE, A.; JOHNSON, J. L.; RILEY, L. W.; MACIEL, E. L. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infectious Diseases* ,v. 14, n. 9, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-9> PMID: 24400848

GOODFELLOW, M.; MAGEE, J. G. Taxonomy of Mycobacteria. In: GANGADHAM, P. R. J.; JENKINS, P. A. (ed.) *Mycobacteria: Basics Aspects*. New York (EUA): Klumer Academic Pub, 1^a. Ed., 1998.

GONG, J. H.; ZHANG, M.; MODLIN, R. L.; LINSLEY, P. S.; IYER, D.; LIN, Y.; BARNES, P. F. Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect. Immun.*, v. 64, n. 3, p. 913-918, 1996.

GOPI, A.; MADHAVAN, S. M.; SHARMA, S. K; SAHN, S. A. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. *Chest*, v. 131, p. 880-889, 2007. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2063>

GILL, M. K, KUKREJA, S. N. C, Evaluation of nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of clinically suspected tuberculous pleurisy, *J. Clin. Diagn. Res.*, v. 7, p. 2456–2458, 2013.

GRECO, S.; GIRARDI, E.; MASCIANGELO, R.; CAPOCETTA, G.B.; SALTINI, C. Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta-analysis, *Int. J. Tubercul. Lung Dis: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, v. 7, p. 777–786, 2003.

GROSSET, J. H. Bacteriology of Tuberculosis In: REICHMAN, L. B.; HERSHFIELD, E. S. (eds.) *Tuberculosis: A comprehensive international approach*. New York: Marcel Dekker, p. 49-74, 1994.

GUTIERREZ, M. C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R.; FABRE, M.; OMAIS, B.; MARMIESSE, M.; SUPPLY, P.; VINCENT, V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Pathog.*, v. 1, p. e5, 2005.

HANEKOM, W. A. The immune response to BCG vaccination of newborns. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1062, p. 69-78, 2005.

HANEKOM, W.A.; ABEL, B.; SCRIBA, T. J. Immunological protection against tuberculosis. *S Afr Med J*. v. 97(10 Pt 2), p. 973-977, 2007.

HIRAKI, A.; AOE, K.; MATSUO, K.; MURAKAMI, K.; MURAKAMI, T.; ONODA, T.; SUGI, K.; TAKEYAMA, H.; EDA, R. Simultaneous measurement of T helper 1 cytokines in tuberculous pleural effusion. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 7, p. 1172-1177, 2003.

HARBOE, M.; WIKER, H. G. The 38-kDa Protein of *Mycobacterium tuberculosis*: A Review. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 166, n. 4, 1992, Pages 874–884, <https://doi.org/10.1093/infdis/166.4.8741992>

HARINATH, B. C. Probably one test may not answer the diagnosis of active PTB and extra-PTB of clinical (latent, fresh, chronic, relapse, resistant, and pauci-bacillary cases) and public health interests”. *Tuberculosis serodiagnostics: Ban and after*. *Int J Mycobacteriol*, v. 6, p. 323-325, 2017.

HASAN, Z.; JAMIL, B.; ASHRAF, M.; ISLAM, M.; YUSUF, M. S.; KHAN, J. A.; HUSSAIN, R. ESAT6-Induced IFN γ and CXCL9 Can Differentiate Severity of Tuberculosis. PLoS ONE, v. 4, n. 4, p.e5158, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005158>

HASANEEN, N.A.; ZAKI, M.E.; SHALABY, H.M.; EL-MORSI, A.S. Polymerase chain reaction of pleural biopsy is a rapid and sensitive method for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. Chest, v. 124, p. 2105–2111, 2003.

HAVLIR, D.V.; ELLNER, J.J.; CHERVENAK, K.A.; BOOM, W.H. Selective expansion of human gamma delta T cells by monocytes infected with live *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Invest., v. 87, n. 2, p. 729-733, 1991.

HE, Y.; ZHANG, W.; HUANG, T.; WANG, X.; WANG, M. Evaluation of a diagnostic flow chart applying medical thoracoscopy, adenosine deaminase and T-SPOT.TB in diagnosis of tuberculous pleural effusion. Eur Rev Med Pharmacol Sci 19:3563-3568, 2015.

HERNANDEZ-PANDO R, OROZCOE H, SAMPIERI A, PAVON L, VELASQUILLO C, LARRIVA-SAHD J, ALCOCER JM, MADRID MY. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology, v. 89, p. 26-33, 1996.

HERSHKOVITZ I, DONOGHUE HD, MINNIKIN DE, BESRA GS, LEE OY, GERNAEY AM, GALILI E, ESHED V, GREENBLATT CL, LEMMA E, BAR-GAL GK, SPIGELMAN M. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. PLoS One, v. 3, n. 10, p. e3426, 2008. doi: 10.1371/journal.pone.0003426

HETT, E. C.; RUBIN E. J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. Microbiol. Mol. Biol. Rev. v. 7, n. 1, p. 126-156, 2008.

HICKMAN, S. P.; CHAN, J.; SALGAME, P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naïve T cell polarization. J. Immunol., v. 168, p. 4636-4642, 2002.

HIJJAR, M. A.; CAMPOS, H. S.; FEITOSA, J. V. P. Tuberculose. In: COURA, J. R, (eds.) Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro, RJ (Brasil): Editora Guanabara Coogan. 2005. Capítulo 117, p. 1395-1433.

HIRSCH, C. S.; HUSSAIN, R.; TOOSI, Z.; DAWOOD, G.; SHAHID, F.; ELLNER, J. J. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen driven blastogenesis and interferon gamma production. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v. 93, n. 8, p. 3193-3198, 1996.

HIRSCH, C. S.; ELLNER, J. J.; BLINKHORN, R.; TOOSI, Z. *In vitro* restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; v. 94, n. 8, 3926-3931, 1997.

HIRSCH, C. S.; TOOSI, Z.; OTHIENO, C.; JOHNSON, J. L.; SCHWANDER, S. K.; ROBERTSON, S.; WALLIS, R. S.; EDMONDS, K.; OKWERA, A.; MUGERWA, R.; PETERS, P.; ELLNER, J. J. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. J. Infect. Dis., v. 180, n. 6, p. 2069-2073, 1999.

HOFF, S. T.; ABEBE, M.; RAVN, P.; RANGE, N.; MALENGANISHO, W.; RODRIQUES, D.S.; KALLAS, E.G.; 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., v. 45, n. 5, p. 575-582, 2007. doi: <https://doi.org/10.1086/520662>.

HOUBEN, E.N.G.; NGUYEN, L.; PIETERS, J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. Cur Opin Microbiol, v. 9, p. 76–85. 2006.

HUO, Z. Y.; PENG, L. Is Xpert MTB/RIF appropriate for diagnosing tuberculous pleurisy with pleural fluid samples? A systematic review. BMC Infect Dis., v. 18, n. 1, p. 284, 2018. doi:10.1186/s12879-018-3196-4

HUYGEN, K.; VAN VOOREN, J. P.; TURNEER, M.; BOSMANS, R.; DIERCKX, P.; DE BRUYN, J. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. **Scand. J. Immunol.**, v. 27, n. 2, p. 187-194, 1988.

INCA: Instituto Nacional de Câncer. A situação do cancer no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2006. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/situacao_cancer_brasil.pdf.

INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2018. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>

INCANDELA, M. L.; PERRIN, E.; FONDI, M.; DE JESUS LOPES RIBEIRO, A. L.; MORI, G.; MOIANA, A.; GRAMEGNA, M.; FANI, R.; RICCARDI, G.; PASCA, M.R. DprE1, a New Taxonomic Marker in Mycobacteria. FEMS Microbiol Lett., 2013.

INGEN, J., RAHIM, Z.; MULDER, A.; BOEREE, M. J.; SIMEONE, R.; BROSCH, R.; VAN SOOLINGEN, D. 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. Emerg. Infect. Dis. 18: 653–655, 2012.

ISEMAN, M. D. Tuberculosis therapy: past, present and future. European Respiratory Journal. v. 20, n. 36, p. 87-94, 2002.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. Immunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. 5. ed. Porto Alegre. Editora Art med., 2002.

JANIS, E.; KAUFMANN, S. H.; SCHWARTZ, R. H. PARDOLL, D. M. Activation of gamma/delta T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. Science, v. 244, p. 713-716, 1989.

JENUM, S.; DHANASEKARAN, S.; LODHA, R.; MUKHERJEE, A.; KUMAR SAINI, D.; SINGH, S.; SINGH, V.; MEDIGESHI, G.; HAKS, M. C.; OTTENHOFF, T. H. M.; DOHERTY, T. M.; KABRA, S. K.; RITZ, C.; GREWAL, H. M. S. Approaching a diagnostic point-of-care test for pediatric tuberculosis through evaluation of immune biomarkers across the clinical disease spectrum. Sci. Rep., v. 6, p. 18520, 2016.

JIANG, J.; SHI, H. Z.; LIANG, Q. L.; QIN, S. M.; QIN, X. J. Diagnostic value of interferon-gamma in tuberculous pleurisy: a metaanalysis. *Chest*, v.131, p.1133-1141, 2007. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2273>

JURADO, J. O.; PASQUINELLI, V.; ALVAREZ, I. B.; PEÑA, D.; ROVETTA, A. I.; TATEOSIAN, N. L.; ROMEO, H. E.; MUSELLA, R. M.; PALMERO, D.; CHULUYÁN, H. E.; GARCÍA, V. E. IL-17 and IFN- γ expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *J Leukoc Biol.*, v. 91, p. 991–1002, 2012. doi: 10.1189/jlb.1211619 PMID: 22416258

KABEER BSA, PARAMASIVAM P, RAJA A. Interferon gamma and interferon gamma inducible protein-10 in detecting tuberculosis infection. *J Infect*, v. 64, n. 6, p. 573-579, 2012.

KAISERMANN, M.; SARDELLA, I. G.; JONAS, F.; KAMPFER, S.; SINGH, M.; TRAJMANN, A.; SAAD, M. H. F. IgA response to *Mycobacterium tuberculosis* Recombinants MPT64 e MT-10.3 Antigens in fluid pleural of Patients with Tuberculous Pleurisy. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, v. 9, n.4, p.461-466, 2005.

KALRA, M.; KHULLER, G. K.; GROVER, A.; BEHERA, D.; WANCHU, A.; VERMA, I. Utility of a combination of RD1 and RD2 antigens as a diagnostic marker for tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 66, p. 153–161, 2010.

KARAKOUSIS PC, BISHAI WR, DORMAN SE. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cell. Microbiol.* 6: 105–116, 2004.

KART L, BUYUKOGLAN H, TEKIN IO, ALTIN R, SENTURK Z, GULMEZ I, DEMIR R, OZESMI M. Correlation of serum tumor necrosis factor-alpha, interleukin-4 and soluble interleukin-2 receptor levels with radiologic and clinical manifestations in active pulmonary tuberculosis. *Mediators Inflamm*, v. 12, p. 9–14, 2003.

KAPUR, V.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15 000 years old? *J Infect Dis.*, v. 170, p. 1348–1349, 1974.

KARBOUL, A.; MAZZA, A.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; HO, J. L.; BROUSSEAU, R.; MARDASS, I. H. Frequent homologous recombination events in *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE multigene families: potential role in antigenic variability. *J Bacteriol.*, v. 190, n. 23, p. 7838-46, 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00827-08>

KASHIWABARA, K.; OKAMOTO, T.; YAMANE, H. When pleural potassium exceeds 5.0 mEq/L, high pleural adenosine deaminase levels do not necessarily indicate tuberculous pleuritis. *Respirology* 17:92–98, 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2011.02053.x>.

KASHYAP, B.; GOYAL, N.; SINGH, N. P.; KAUR, I. R. Diagnostic Potential of Circulating Biomarkers in Adenosine Deaminase Diagnosed Pleural Tuberculosis Cases. *Indian J Clin Biochem*, v. 33, n. 3, p. 334-340, 2018. doi: 10.1007/s12291-017-0686-x.

KATARIA, Y. P.; KHURSHID, I. Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Chest*, 2001, doi: <https://doi.org/10.1378/chest.120.2.334>.

KAUFMANN, S. H. Gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what to they do? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 93, p. 2272-2279, 1996.

KAUFMANN, I.; EISNER, C.; RICHTER, P.; HUGE, V.; BEYER, A.; CHOUKER. A.; SCHELLING, G.; THIEL, M. Lymphocyte subsets and the role of TH1/TH2 balance in stressed chronic pain patients. *Neuroimmunomodulation*, v. 14, n. 5, p. 272-280, 2007.

KCNYON, NJ, KELLY EAB, JARJOUR NN: Enhanced cytokine generation by peripheral blood mononuclear cells in allergic and asthma subjects. *Ann Allergy Asthma Immunol* 85: 115-120, 2000.

KHADER, S. A.; BELL, G. K.; PEARL, J. E.; FOUNTAIN, J. J.; RANGEL-MORENO, J.; CILLEY, G. E.; SHEN, F.; EATON, S. M.; GAFFEN, S. L.; SWAIN, S. L.; LOCKSLEY, R. M.; HAYNES, L.; RANDALL, T. D.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature immunol.*, v. 8, n. 4, p.369-377, 2007. Doi:10.1038/ni1449

KHADER, S. A.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*, v. 41, n. 2, p.79-83, 2008. doi: 10.1016/j.cyto.2007.11.022.

KHAN, N.; ALAM, K.; NAIR, S.; VALLURI, V. L.; MURTHY, K. J.; MUKHOPADHYAY, S. Association of strong immune responses to PPE protein Rv1168c with active tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*, v. 15, n. 6, p. 974-980, 2008. doi: 10.1128/CVI.00485-07.

KIM, M. C.; KIM, S. M.; LEE, S. O.; CHOI, S. H.; KIM, Y. S.; WOO, J. H.; KIM, S. H. A diagnostic algorithm for tuberculous pleurisy using the ELISPOT assay on peripheral blood and pleural effusion. *Infect Dis (Lond)*, v. 48, n. 9, p. :688-694, 2016. doi: <https://doi.org/10.1080/23744235.2016.1183816>.

KINDLER, V.; SAPPINO, A. P.; GRAU, G. E.; PIGUET, P. F.; VASSALLI, P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell.*, v. 56, n. 5, p. 731-740, 1989.

KORB, V.; CHUTURGOON, A.; MOODLEY, D. *Mycobacterium tuberculosis*: Manipulator of Protective Immunity. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, n. 131, 2016.

KUTLU, A.; BOZKURT, B.; CIFTCI, F.; BOZKANAT, E. Th1-Th2 interaction: Is more complex than a see-saw? *Scand. J. Immunol.*, v. 65, p. 393–395, 2007.

LAPA E SILVA, J. R.; BOÉCHAT, N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. *J Bras Pneumol*, v. 30, n. 4, p. 478-484, 2004.

LAW, K.; WEIDEN, M.; HARKIN, T.; TCHOU-WONG, K.; CHI, C.; ROM, W. N. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am. J. of Resp. Crit. Care Med.*, v. 153, n. 2, p. 799-804, 1996. Doi: 10.1164/ajrccm.153.2.8564135

LEE, J. S.; SONG, C.H.; LIM, J. H.; LEE, K. S.; KIM, H. J.; PARK, J. K.; PAIK, T. H.; JUNG, S. S.; JO, E. K. Monocyte chemotactic protein-1 production in patients with active pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy. *Inflamm. Rev.*, v. 52, n. 7, p. 297-304. 2003.

LEE LN, CHOU CH, WANG JY, HSU HL, TSAI TH, JAN IS, HSUEH PR, YANG PC. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Clin Microbiol Infect*, v. 15, p. 173-179, 2009.

LEGESSE, M.; AMENI, G.; MEDHIN, G.; MAMO, G.; FRANKEN, K. L. M. C.; OTTENHOFF, T. H. M.; 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.*, v. 78, p. 266–274, 2013.

LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.*, v. 51, p. 2415–2418, 2005.

LHO, S.; YAMAMOTO, T.; TAKAHASHI, T.; YAMAMOTO, S. Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro. *J. Immunol.*, v. 163, p. 3642–3652, 1999.

LI, H.; ULSTRUP, J. C.; JONASSEN, T. O.; MELBY, K.; NAGAI, S.; HARBOE, M. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.*, v. 61, p. 1730-1734, 1993.

LI, Y. H.; XIE, C. M. A study on the Th1/Th2 cytokines in the pathogenesis of human tuberculous pleuritis. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*, v. 27, p. 324–327, 2004.

LI, M.; WANG, H.; WANG, X.; HUANG, J.; WANG, J.; XI, X. Diagnostic accuracy of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, interleukin-10 and adenosine deaminase 2 in differential diagnosis between tuberculous pleural effusion and malignant pleural effusion. *J Cardiothorac Surg.*, v. 1, n. 9, p. 118, 2014. doi: <https://doi.org/10.1186/1749-8090-9-118>.

LI, Z.Z.; QIN, W.Z.; LI, L.; WU, Q.; WANG, Y. J. Accuracy of enzyme-linked immunospot assay for diagnosis of pleural tuberculosis: a meta-analysis. *Gen and Mol Res*, v. 14, n. 3, p. 11672-11680, 2015a.

LI, D.; SHEN, Y.; FU, X.; LI, M.; WANG, T.; WEN, F. Combined detections of interleukin-33 and adenosine deaminase for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Int J Clin Exp Pathol* 1:888-893, 2015b.

LI, Q.; ZHANG, H.; YU, L.; WU, C.; LUO, X.; SUN, H.; DING, J. Down-regulation of Notch signaling pathway reverses the Th1/Th2 imbalance in tuberculosis patients. *International Immunopharmacology*, v. 54, p. 24–32, 2018. doi:10.1016/j.intimp.2017.10.026

LIAO, M.; YANG, Q.; ZHANG, J.; ZHANG, M.; DENG, Q.; LIU, H.; GRANER M. W.; KORNFELD, H.; ZHOU, B.; CHEN, X. Gamma Interferon Immunospot Assay of Pleural Effusion Mononuclear Cells for Diagnosis of Tuberculous Pleurisy. *Clin Vaccine Immunol.*, v. 21, n. 3, p. 347-53, 2014. doi: 10.1128/CVI.00680-13

LIGHT, R. W. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology*, v. 15, n 3, p. 451-458, 2010. doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01723.x;

LIU, Y.C.; LEE, S. S.; CHEN, Y. S.; TU, H. Z.; CHEN, B. C.; HUANG, T. S. Differential diagnosis of tuberculous and malignant pleurisy using pleural fluid adenosine deaminase and interferon gamma in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*; v. 44, p. 88-94, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2010.04.001> PMID: 21439509

LIU, F.; GAO, M.; ZHANG, X.; DU, F.; JIA, H.; YANG, X.; WANG, Z.; ZHANG, L.; MA, L.; WU, X.; XIE, L.; ZHANG, Z.. Interferon-Gamma Release Assay Performance of Pleural Fluid and Peripheral Blood in Pleural Tuberculosis. *PlosOne*, v. 8, n. 12, p. 83857, 2013.

LIU, Y.; OU, Q.; ZHENG, J.; SHEN, L.; ZHANG, B.; WENG, X.; SHAO, L.; GAO, Y.; ZHANG, W. A combination of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay and the detection of adenosine deaminase improves the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Emerg Microbes Infect*, v. 5, n. 8, p. e83, 2016. doi: <https://doi.org/10.1038/emi.2016.80>.

LOSI, M.; BOSSINK, A.; CODECASA, L.; JAFARI, C.; ERNST, M.; THIJSEN, S.; CIRILLO, D.; FERRARESE, M.; GREINERT, U.; FABBRI, L. M.; RICHELDI, L.; LANGE, C.; EUROPEAN TUBERCULOSIS NETWORK TBNET.. Use of a T-cell interferon- γ release assay for the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Eur Respir J*, v. 30, p. 1173-1179, 2007. <https://doi.org/10.1183/09031936.00067307> PMID: 17715165

LUSIBA, J. K.; NAKIYINGI, L.; KIRENGA, B. J.; KIRAGGA, A.; LUKANDE, R.; NSEREKO, M.; SSENGOOBA, W.; KATAMBA, A.; WORODRIA, W.; JOLOBA, M. L.; MAYANJA-KIZZA, H. Evaluation of Cepheid's Xpert MTB/Rif test on pleural fluid

in the diagnosis of pleural tuberculosis in a high prevalence HIV/TB setting. PLoS One, v. 9, p.:e102702, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0102702

LYASHCHENKO K, COLANGELI R, HOUDE M, AL JAHDALI H, MENZIES D, GENNARO, M. L. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. Infection and Immunity. v.. 66, n. 8. p. 3936–3940, 1998.

LYDYARD, P.; GROSSI, C. in: ROIT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Imunologia. 4ª edição; São Paulo; MANOLE LTDA, 10.1-10.15. 1997.

MA, J.; YANG, B.; YU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; LAO, S.; CHEN, X.; LI, B.; Wu, C. Tuberculosis antigen-induced expression of IFN- α in tuberculosis patients inhibits production of IL-1 β . FASEB J, v. 28, n. 7, p. 3238-3248, 2014. doi: 10.1096/fj.13-247056

MAGGI, E. The T111/TH2 paradigm in allergy. Immunotechnology, v. 3, p. 233-244, 1998.

MAGLIONE, P. J.; XU, J.; CHAN, J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, v. 178, p. 7222–7234, 2007.

MAGLIONE, P. J.; CHAN, J. How B cells Shape the Immune Response against *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Immunol., v. 39, n. 3, p. 676–686, 2009.

MAINO, V. C.; MAECKER, H. T. Cytokine flow cytometry: a multiparametric approach for assessing cellular immune responses to viral antigens. Clin Immunol, v. 110, n. 3, p. 222–231, 2004.

MATTOS, A. M. M.; CHAVES, A. S.; FRANKEN, K. L. M. C.; FIGUEIREDO, B. B. M.; FERREIRA, A. P.; OTTENHOFF, T. H. M.; TEIXEIRA, H. C. Detection of IgG1 antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* DosR and Rpf antigens in tuberculosis patients before and after chemotherapy. Tuberculosis, v. 96, p. 65–70, 2016.

MAVER, C.; KAUSEL, C.; LININGER, L.; MCKNEALLY, M. Intrapleural BCG immunotherapy of lung cancer patients. *Recent Results Cancer Res*, v. 80, p. 227–231, 1982. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-81685-7_36.

MELDAU, R.; PETER, J.; THERON, G.; CALLIGARO, G.; ALLWOOD, B.; SYMONS, G.; KHALFEY, H.; NTOMBENHLE, G.; GOVENDER, U.; BINDER, A.; VAN ZYL-SMIT, R.; DHEDA, K. Comparison of same day diagnostic tools including Gene Xpert and unstimulated IFN- γ for the evaluation of pleural tuberculosis: a prospective cohort study. *BMC Pulm Med*, v. 14, n. 58, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-58>. PMID: 24708530

MEYER, T. F.; GIBBS, C. P.; HAAS, R. Variation and control of protein expression in *Neisseria*. *Annu Rev Microbiol*, v. 44, p. 451–77, 1990.

MINDEN, P.; JARRETT, C.; MCCLATCHY, J. K.; GUTTERMAN, J. U.; HERSH, E. M. Antibodies to melanoma cell and BCG antigens in sera from tumourfree individuals and from melanoma patients. *Nature*, v. 263, p. 774–777, 1976. doi: <http://doi.org/10.1038/263774a0>.

MOLLO, B.; JOUVESHOMME, S.; PHILIPPART, F.; PILMIS, B. Biological markers in the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Ann Biol Clin (Paris)*, v. 75, n. 1, p. 19–27, 2017. doi: <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1201>.

MOREIRA-TEIXEIRA, L.; REDFORD, P. S.; STAVROPOULOS, E.; GHILARDI, N.; MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T.; FREITAS DO ROSÁRIO, A. P.; WU, X.; LANGHORNE, J.; O'GARRA, A. T. Cell-Derived IL-10 Impairs Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol.*, v. 199, n. 2, p. 613–623, 2017. doi: [10.4049/jimmunol.1601340](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601340).

MORGAN, E.; VARRO, R.; SEPULVEDA, H.; EMBER, J. A.; APGAR, J.; WILSON, J.; LOWE, L.; CHEN, R.; SHIVRAJ, L.; AGADIR, A.; CAMPOS, R.; ERNST, D.; GAUR, A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol*, v. 110, n. 3, p. 252–266, 2004.

MORISSON, P.; NEVES, D. D. Avaliação da adenosina desaminase no diagnóstico da tuberculose pleural: uma metanálise brasileira. *J. Bras Pneumol.*, v. 34, n. 4, p. 217–224, 2008. doi : <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132008000400006>.

MORRISON J, PAI M, HOPEWELL PC. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.*, v. 8, n. 6, p. 359-368, 2008. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70071-9.

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. *Rev Med Minas Gerais*, v. 21, n. 1 p. 42–48, 2011.

MULINARI, A. C. P. Obtenção da proteína codificada pelo gene RV3429 de *Mycobacterium tuberculosis* e avaliação da reatividade imune humoral. 2016. 80p. Dissertação de mestrado em Medicina Tropical. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro – RJ, 2016. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/22982>

MUNK, M. E.; EMOTO, M. Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. *Eur Respir J Suppl.*,v. 20, p. 668–675, 1995.

MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G.S.; THOMPSON, J.H. *Microbiologia Médica*. Guanabara Coogan, Rio de Janeiro, 513p., 1992.

MUSVOSVI, M.; DUFFY, D.; FILANDER, E.; AFRICA, H.; MABWE, S.; JAXA, L.; BILEK, N.; LLIBRE, A.; ROUILLY, V.; HATHERILL, M.; ALBERT, M.; SCRIBA, T. J.; NEMES, E. T-cell biomarkers for diagnosis of tuberculosis: candidate evaluation by a simple whole blood assay for clinical translation. *Eur Respir J*, v. 51, p.1800153, 2018. doi: <https://doi.org/10.1183/13993003.00153-2018>.

NAHID, P.; PAI, M.; HOPEW, P.C. Advances in the Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Proc Am Thorac Soc* 3:103–110, 2006.

NATARAJAN, K.; KUNDU, M.; SHARMA, P.; BASU, J. Innate immune responses to *M. tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*, v. 91, p. 427-431, 2011.

NEMETH, J.; WINKLER, H. M.; ZWICK, R. H.; RUMETSHOFER, R.; SCHENK, P.; BURGHUBER, O. C.; GRANINGER, W.; RAMHARTER, M.; WINKLER, S. Recruitment of *Mycobacterium tuberculosis* specific CD4+ T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. *J Int Med*, v. 265, p. 163-168, 2009.

NEVES, D. D., DIAS, R. M.; CUNHA, A. J. Predictive model for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 11, p. 83–88, 2007.

NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, v. 22, p. 599-623, 2004.

NUNNARI, G.; PINZONE, M. R.; VANCHERI, C.; PALERMO, F.; CACOPARDO, B. Interferon- γ and interleukin-17 production from PPD-stimulated PBMCs of patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Invest Med.*, v. 36, p. E64–71, 2013.

OCAÑA, I.; MARTINEZ-VAZQUEZ, J. M.; SEGURA, R. M.; FERNANDEZ-DE-SEVILLA, T.; CAPDEVILA, J. A. Adenosine deaminase in pleural fluids. Test for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Chest.*, v. 84, n. 1, p. 51–53, 1983.

OCEPEK, M.; PATE, M.; ZOLNIR-DOVE, M.; POLJAK, M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 3555–3557, 2005.

OETTINGER, T.; ANDERSEN, A. B. Cloning and B-cell-epitope mapping of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Infect Immun.*, v. 62, n. 5, p. 2058-2064, 1994.

OGATA, Y.; AOE, K.; HIRAKI, A.; MURAKAMI, K.; KISHINO, D.; CHIKAMORI, K.; MAEDA, T.; UEOKA, H.; KIURA, K.; TANIMOTO, M. Is adenosine deaminase in pleural fluid a useful marker for differentiating tuberculosis from lung cancer or mesothelioma in Japan, a country with intermediate incidence of tuberculosis? *Acta Med. Okayama*, v. 65, p. 259–263, 2011.

O’GARRA, A., REDFORD P. S., MCNAB F. W., BLOOM C. I., WILKINSON R. J., BERRY M. P. The immune response in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 31, p. 475–527, 2013.

OKAMOTO, M.; KAWABE, T.; IWASAKI, Y.; HARA, T.; HASHIMOTO, N.; IMAIZUMI, K.; HASEGAWA, Y.; SHIMOKATA, K. Evaluation of interferon- γ , interferon- γ -inducing cytokines, and interferon- γ -inducible chemokines in tuberculous pleural effusions. *J Lab Clin Med*, v. 145, p. 88-93, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2004.11.013> PMID: 15746651

OLIVEIRA, G. P.; TORRENS, A. W.; BARTHOLOMAY, P.; BARREIRA, D. Tuberculosis in Brazil: last ten years analysis – 2001–2010. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 2, p.123-124, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.01.005>.

ORME, I. M.; COOPER, A. M. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol. today*, v.20, p. 307-312, 1999.

OLIVER, K. G.; KETTMAN, J. R.; FULTON, R. J. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. *Clin Chem*, v. 44, n. 9, p. 2057–2060, 1998.

ORAL, H. B.; BUDAK, F.; UZASLAN, E. K.; BAŞTÜRK, B.; BEKAR, A.; AKALIN, H.; EGE, E.; ENER, B.; GÖRAL, G. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine*, v. 35, p. 143–147, 2006.

PAI, M.; FLORES, L. L.; HUBBARD, A.; RILEY, L. W.; COLFORDJR, J. M.. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, v. 4, n. 6, 2004. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-6>

PANG, C. S.; SHEN, Y. C.; TIAN, P. W.; ZHU, J.; FENG, M.; WAN, C.; WEN, F. Q. Accuracy of the interferon-gamma release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy: an updated meta-analysis. *Peer J*, v. 3, p. e951, 2015. <https://doi.org/10.7717/peerj.951> PMID: 26038718

PARSLOW, T. G. Immunoglobulins & immunoglobulin genes. (1997). In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARNSLOW, T. G. (eds). *Medical Immunology*, 9th ed., Stamford, CT: Appleton & Lange: 102–142.

PARKASH, O.; SINGH, B.P.; PAI, M. Regions of differences encoded antigens as targets for immunodiagnosis of tuberculosis in humans. *Scand J Immunol*, v. 70, p. 345–357, 2009.

PATHAKUMARI, B.; PRABHAVATHI, M.; ANBARASU, D.; PARAMANANDHAN, P.; RAJA, A. Dynamic IgG antibody response to immunodominant antigens of *M. tuberculosis* for active TB diagnosis in high endemic settings. *Clin Chim Acta*, v. 461, p. 25–33, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.06.033>

PENG, M. Y.; WANG, Z. H.; YAO, C. Y.; JIANG, L. N.; JIN, Q. L.; WANG, J.; LI, B. Q. Interleukin 17-producing gamma delta T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis. *Cell Mol Immunol.*, v. 5, p. 203–208, 2008. doi:10.1038/cmi.2008.25 PMID: 18582402

PERERA, P. Y.; LICHY, J. H.; WALDMANN, T. A.; PERERA, L. P. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect.*, v. 14, n. 3, p. 247-261, 2012.

PORCEL, J.M. Tuberculous Pleural Effusion. *Lung*, v. 187, p. 263-270, 2009.

PORCEL, J. M. Advances in the diagnosis of tuberculous pleuritic. *Ann Transl Med*, v. 4, n 15, p. 282, 2016. doi: <https://doi.org/10.21037/atm.2016.07.23>.

PORCELLI, S.; MORITA, C. T.; BRENNER. M. B. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature*, n. 360, p. 593-597, 1992.

POWRIE, F.; COFFMAN, R. L. Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL10. *Res. Immunol.*, v. 144, n. 8, p. 639-643, 1993.

RAJA A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med, Res.* v. 120, n. 4, p. 213–232, 2004.

RAVIGLIONE, M. C. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis*, v.83, n.3, p.4-14, fev. 2003.

REDFORD, P. S., BOONSTRA A., READ S., PITT J., GRAHAM C., STAVROPOULOS E., BANCROFT G. J., O’GARRA A. Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *Eur. J. Immunol.*, v. 40, p. 2200–2210, 2010.

REDFORD, P. S., MURRAY P. J., O'GARRA A. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal Immunol.*, v. 4, p. 261–270, 2011.

REIS, M. C. G. Caracterização da Resposta Imune Humoral em Trabalhadores da Área da Saúde frente a Antígenos Recombinantes de Mycobacterium tuberculosis.[Tese Msc]. Goiânia: Universidade Federal de Goiânia, 67pp, 2007.

REN, N.; JINLI, J.; CHEN, Y.; ZHOU, X.; WANG, J.; GE, P.; GUO, A. Identification of new diagnostic biomarkers for Mycobacterium tuberculosis and the potential application in the serodiagnosis of human tuberculosis. *Microbial Biotechnology*, v. 11, n. 5, p. 893–904, 2018. doi:10.1111/1751-7915.13291

RIBERA, E.; OCAÑA, I.; MARTINEZ-VAZQUEZ, J. M.; ROSSELL, M.; ESPAÑOL, T.; RUIBAL, A. High level of interferon gamma in tuberculous pleural effusion. *Chest*, v. 93, p. 308-311, 1988.

ROACH, D. R.; BRISCOE, H.; SAUNDERS, B.; FRANCE, M. P.; RIMINTON, S.; BRITTON, W. J. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J. Exp. Med.*, v. 193, p. 239-246, 2002.

ROCHA, A. L. D. C.; BARRETO, A. M. W.; SANT'ANNA, C. C.; CAMPOS, C. E. D.; (Kiki) CACB, CAPONE, D.; BETHLEM, E. P.; MARTINS, F. M.; DE MELO, F. A. F., VICENTIN, G.; FILHO, G. G.; MOURÃO, G. T. Controle da Tuberculose. 2008.

RODRIGUES, N. C. P.; ANDRADE, M. K. N.; O'DWYER, G.; FLYNN, M.; BRAGA, J. U.; ALMEIDA, A. S.; BASTOS, L. S.; LINO, V. T. S. Distribution of pulmonary tuberculosis in Rio de Janeiro (Brazil): a spatial analysis. *Cien Saude Colet*, v. 22, n. 12, p. 4125-4134, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172212.0143016>.

RODGER, A.; JAFFAR, S.; PAYNTER, S.; HAYWARD, A.; CARLESS, J.; MAGUIRE, H. Delay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis, London, 1998-2000: analysis of surveillance data. *BMJ*, v. 326, n. 7395, p. 909-910, 2003.

ROSEMBERG, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Bol. Pneumol. Sanit.*, v.7, n.2, 1999.

RUAN, S. Y.; CHUANG, Y. C.; WANG, J. Y.; LIN, J. W.; CHIEN, J. Y.; HUANG, C. T.; KUO, Y. W.; LEE, L. N.; YU, C. J. Revisiting tuberculous pleurisy: pleural fluid characteristics and diagnostic yield of mycobacterial culture in an endemic area. *Thorax*, v. 67, p. 822-827, 2012.

SAKAI, S.; KAUFFMAN, K. D.; SALLIN, M. A.; SHARPE, A. H.; YOUNG, H. A.; GANUSOV, V. V.; BARBER, D. L. CD4 T Cell-Derived IFN- γ Plays a Minimal Role in Control of Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Must Be Actively Repressed by PD-1 to Prevent Lethal Disease. *PLoS Pathog.*, v. 12, n. 5, p.e1005667, 2016. doi: 10.1371/journal.ppat.1005667.

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. v. 133, n. 5, p. 775-787, 2008.

SALES, R. K., VARGAS, F. S.; CAPELOZZI, V. L.; SEISCENTO, M. ; GENOFRE, E. H.; TEIXEIRA, L. R.; ANTONANGELO, L. Predictive models for diagnosis of pleural effusions secondary to tuberculosis or cancer. *Respirology*, v. 14, p. 1128–1133, 2009.

SAMANICH, K.; BELISLE, J. T.; LAAL, S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immun*, v. 69, p. 4600-4609, 2001. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.7.4600-4609.2001>.

SANTOS, A. P.; CORRÊA, R. D. S.; RIBEIRO-ALVES, M.; SOARES DA SILVA, A. C. O.; MAFORT, T. T.; LEUNG, J.; PEREIRA, G. M. B.; RODRIGUES, L. S.; RUFINO, R. Application of Venn's diagram in the diagnosis of pleural tuberculosis using IFN- γ , IP-10 and adenosine deaminase. *PLoS One*, v. 13, n. 8, p.:e0202481, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0202481.

SARDELLA, I. G. Avaliação dos antígenos MPT-64, MT-10.3, ESAT-6, 16kDa e 38 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* e KIT comercial da Lionex na resposta imune humoral na tuberculose pulmonar e extra pulmonar em área endêmica. 68p. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Rio de Janeiro – RJ, 2008.

SARDELLA, I. G. Rv3019c e Rv1980c: clonagem, expressão protéica e purificação de diferentes construções gênicas fusionadas e caracterização imunológica na tuberculose. 2014. 68p. Tese de doutorado em Ciências. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Rio de Janeiro – RJ, 2014.

SARDELLA, I. G.; MULINARI, A. C. P.; FONSECA, L. S.; SAAD, M. H. F. Cloning, Expression and Characterization of Fusion Proteins Based on Peptides of Rv1980c Disrupting Rv3019c Sequence and Evaluation of its Potential Immunoreactivity in Pulmonary Tuberculosis Sera. *Mycobact Dis*, v. 5, p. 183, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1068.1000183>

SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A.; ORME, I. M.; COOPER, A. M. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.*; v. 68, n. 6, p.3322-3326, 2000.

SCATENA, L. M.; VILLA, T. C. S.; NETTO, A. R.; KRITSKI, A. L.; MONTEIRO DE FIGUEIREDO, T. M. R.; VENDRAMINI, S. H. F.; ARAÚJO ASSIS, M. M.; MOTTA, M. C. S. Dificuldades de acesso a serviços de saúde para diagnóstico de tuberculose em municípios do Brasil. *Rev. Saude Publica*, v. 43, p. 389–397, 2009.

SCHLUGER, N. W.; ROM, W. N. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, n. 157, v. 3, p. 679–691, 1998. doi: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.3.9708002>

SCRIBA, T. J.; KALSDORF, B.; ABRAHAMS, D. A.; ISAACS, F.; HOFMEISTER, J.; BLACK, G.; HASSAN, H. Y.; WILKINSON, R. J.; WALZL, G.; GELDERBLOEM, S. J.; MAHOMED, H.; HUSSEY, G. D.; HANEKOM, W. A. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J. Immunol.*, v. 180, n. 3, p. 1962-70, 2008.

SEISCENTO, M.; CONDE, M. B.; DALCOLMO, M. M. P. Tuberculose Pleural. *J Bras Pneumol*, v. 32 (Sulp 4), p. S174-S181, 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132006000900003>.

SHALER, C. R.; HORVATH, C. N.; JEYANATHAN, M.; XING, Z. Within the enemy's camp: contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Immunol.*, v. 4, p. 30, 2013.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res*, v. 120, p. 316-353, 2004.

SHE, R. C.; LITWIN, C. M; Performance of a Tuberculosis Serologic Assay in Various Patient Populations. *Am J Clin Pathol*, v. 144, p. 240-246, 2015. doi: <https://dx.doi.org/10.1309/AJCP22DBRYZQGRBI>

SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol*, v. 10, p. 385–409, 1992.

SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S. C.; DINARELLO, C. A. Correlations and interactions in the production of interleukin- 6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, v. 75, p. 40–47, 1990.

SCHREIBER, T.; EHLERS S.; HEITMANN L.; RAUSCH A.; MAGES J.; MURRAY P. J.; LANG R.; HO"LSCHER C. Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. *J. Immunol.*, v. 183, p. 1301–1312, 2009.

SHIMOKATA, K.; SAKA, H.; MURATE, T.; HASEGAWA, Y.; HASEGAWA, T. Cytokine content in pleural effusion. *Chest*, v. 99, p. 1103-1107, 1991. PMID: 1902158

SHINGADIA, D.; NOVELLI, V. The tuberculin skin test: a hundred, not out? *Arch Dis Child*, v. 93, p. 189–190, 2008.

SHU, C. C.; WANG, J. Y.; HSU, C. L.; KENG, L. T.; TSUI, K.,; LIN, J. F.; LAI, H. C.; YU ,C. J.; LEE, L. N.; LUH, K. T. Diagnostic role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and effector molecules of cytotoxic T lymphocytes in tuberculous pleural effusion. *Respirology*; v. 20, n. 1, p. 147-154, 2015. doi: <https://doi.org/10.1111/resp.12414>.

SILVA, C. O. S.; MACEDO, A. G. Pneumologia. *In*: PRADO, F. C.; RAMOS, J. A.; VALLE, J. R., editores. *Atualização terapêutica*. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas, p. 1446–1452, 2003.

SILVA Jr., J. B. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. *J. Bras. Pneumol.*, v. 30, p. S57–S86, 2004.

SILVA, V. M.; SARDELLA, I. G.; LUIZ, R. R.; CUNHA, A. J.; CAVALCANTI, A. H.; MAHAVIR, S.; BARRETO, M. M.; RODRIGUES, R. S.; CARVALHO, T. F.; SAAD, M. H. Immunoreactivity of five antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in patients attending a public health care facility in an area with high endemicity for TB. *Microbiol Immunol.*, v. 52, n. 11, p. 544-550, 2008.

SILVA, L. C.; GELUK, A.; ARNONE, M.; ROMITI, R.; FRANKEN, K. C.; DUARTE, A. J.; TAKAHASHI, M. D.; BENARD, G. Infliximab partially impairs the anti-*Mycobacterium tuberculosis* immune responses of severe psoriasis patients with positive tuberculin skin-test. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, v. 26, n. 3, p. 319-324, 2012. Doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04067.x

SILVA, M. V.; TIBURCIO, M. G. S.; MACHADO, J. R.; SILVA, D. A. A.; RODRIGUES, D. B. R.; RODRIGUES, V.; OLIVEIRA, C. J. F. Complexity and Controversies over the Cytokine Profiles of T Helper Cell Subpopulations in Tuberculosis. *J. Immunol. Res.*, v. 2015, p. 639107, 2015.

SINGH, K. K.; DONG, Y.; PATIBANDLA, S. A.; MCMURRAY, D. N.; ARORA, V. K.; LAAL, S. Immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE55 (Rv3347c) protein during incipient and clinical tuberculosis. *Infect Immun.*, v. 73, n. 8, p. 5004-5014, 2005.

SKJOT, R. L.; BROCK, I.; AREND, S. M.; MUNK, M. E.; THEISEN, M.; OTTENHOFF, T. H.; ANDERSEN, P. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the *esat-6* gene family. *Infect Immun.*, v. 70, n. 10, p. 5446-5453, 2002.

SONMEZOGLU, Y.; TURNA, A.; CEVIK, A.; DEMIR, A.; SAYAR, A.; DINCER, Y.; BEDIRHAN, M. A.; GURSES, A. Factors affecting morbidity in chronic tuberculous empyema. *Thorac Cardiovasc Surg*, v. 56, n. 2, p. 99-102, 2008. doi: <https://doi.org/10.1055/s-2007-965301>

SMALL, P. M.; HOPEWELL, P. C.; SIGH, B. S.; PAZ, A.; PARSONNET, J.; RUSTON, D. C.; SCHECTER, G. F.; DALEY, C. L.; SCHOOLNIK, G. K. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *Epidemiol. Tuberc. San Francisco*, v. 330, n. 24, p. 1703-1709, 1994.

SOTIR, M.J.; PARROTT, P.; METCHOCK, B.; BOCK, N.N.; MCGOWAN, J.E. JR.; RAY, S.M.; MILLER, L.P.; BLUMBERG, H.M. Tuberculosis in the inner city: impact of a continuing epidemic in the 1990s. *Clin Infect Dis.*, v. 29, n. 5, p. 1138-1144, 1999.

STAM, C.; COLLINS, A.; SHILOH, M. Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and consequences to both host and bacillus. *NIH Immunol Rev.*, v. 264, n. 1, p. 204-219, 2015.

STEINGART, K. R.; RAMSAY, A.; DOWDY, D. W.; PAID, M. Serological tests for the diagnosis of active tuberculosis: relevance for India. *Indian J Med Res.*, v. 135, n. 5, p. 695–702, 2012.

STENGER, S.; MODLIN, R. L. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol*, v. 2, p. 89–93, 1999.

STRAKINGA, W. F. M.; NAUTA, J. J. P.; STRAUB, J. P.; STAM, J. Adenosine deaminase activity in tuberculous pleural effusions: a diagnostic test. *Tubercle*, v. 68, p. 137-40, 1987.

SUN, M.; YAN, D.; JIANG, S.; GU, X., MA, W. Diagnostic value of interleukin-27 in tuberculous pleural effusion. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, v. 94,n. 34, p. 2641-2644, 2014.

SUPRIYA, P.; CHANDRASEKARAN, P.; DAS, S. D. Diagnostic utility of interferon- γ -induced protein of 10 kDa (IP-10) in tuberculous pleurisy. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v. 62, n. 2, p. 186-192, 2008. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.011

SUTHERLAND, J. S.; GARBA, D.; FOMBAH, A. E.; MENDY-GOMEZ, A.; MENDY, F. S.; ANTONIO, M.; TOWNEND, J.; IDEH, R. C.; CORRAH, T.; OTA, M. O. Highly Accurate Diagnosis of Pleural Tuberculosis by Immunological Analysis of the Pleural Effusion. *PLoS ONE*, v. 7, n. 1, p. e30324, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030324> PMID: 22295081

TANG, Y.; HUA, S. C.; QIN, G. X.; XU, L. J.; JIANG, Y. F. Different Subsets of Macrophages in Patients with New Onset Tuberculous Pleural Effusion. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e88343, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0088343

TALAT, N.; SHAHID, F.; PERRY, S.; DAWOOD, G.; HUSSAIN, R. Th1/Th2 Cytometric Bead Array can discriminate cytokine secretion from endogenously activated cells in pulmonary disease, recent and remote infection in tuberculosis. *Cytokine*, v. 54, p. 136–143, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.01.012>

TANAKA, Y.; MORITA, C. T.; TANAKA, Y.; NIEVES, E.; BRENNER, M. B.; BLOOM, B. R. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature*, v. 357, p. 155-158, 1995.

TAVARES, R.C.; SALGADO, J.; MOREIRA, V.B.; FERREIRA, M.A.; MELLO, F.C.; LEUNG, J.A.; SINGH, M.; FONSECA, L. de S.; SAAD, M.H. Cell proliferation and interferon-gamma response to recombinant MBP-3, NarL, MT-10.3, and 16 kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Brazilian tuberculosis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v. 101, n. 8, p. 857-861, 2006.

TAVARES, R. C. O.; SALGADO, J. L.; MOREIRA, V. B.; FERREIRA, M. A.; MELO, F. Q.; LEUNG, J. AW.; FONSECA, L. S.; SPALLEK, R.; SINGH, M.; SAAD, M. H. F. Improvement of interferon gamma response to the combinations of 38kDa/CFP10, 38kDa/MPT-64, ESAT-6/MPT-64, CFP-10/ESAT-6 related to each single recombinants proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in individuals from endemic area for tuberculosis. *Microbiol. Immunol.*, v. 51, p. 289-296, 2007.

TARHAN, G. The Place Importance of Serologic Techniques in Tuberculosis Diagnosis. *Cohesive J Microbiol infect Dis.*, v. 2, n. 2, 2018. doi:10.31031/CJMI.2018.02.000531

TEITELBAUM, R.; GLATMAN-FREEDMAN, A.; CHEN, B.; ROBBINS, J.B.; UNANUE, E.; CASADEVALL, A.; BLOOM, B.R.. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci. USA.*, v. 95, n. 26, p. 15688–15693, 1998.

TERAN, R.; de WAARD, J. H. Recent advances in the laboratory diagnosis of tuberculosis. *eJIFCC*, v. 26, n. 4, 2015.

TERRA, M. F.; BERTOLOZZI, M. R. Tratamento diretamente supervisionado (DOTS) contribui para a adesão ao tratamento da tuberculose? *Rev Latino-am Enfermagem.* v. 16, n. 4, 2008.

TIWARI, R. P.; HATTIKUDUR, N. S.; BHARMAL, R. N.; KARTIKEKEYAN, S.; DESHMUKH, N. M.; BISEN, P. S. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead. *Tuberculosis*, v. 87, p. 193-201, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.07.005> PMID: 17029964

TORTOLI; E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 48, p. 159-178, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. Capítulo 56, p.423 – 436.

TRAJMAN, A.; BELO, M. T.; TEIXEIRA, E. G.; BELO, N. E.; RODRIGUES, D. F.; CASTELLO BRANCO, M. M. Valor diagnóstico da punção-biópsia pleural: experiência em um serviço de clínica médica. *J Pneumol.*, v. 27, n. 1, 2001.

TRAJMAN, A.; KAISERMANN, C.; LUIZ, R. R.; SPERHACKE, R. D.; ROSSETTI, M. L.; SAAD, M. H. F.; SARDELLA, I. G.; SPECTOR, N.; KRITSKI, A. L. Pleural fluid ADA, IgA-ELISA and PCR sensitivities for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Scand J Clin Lab Invest*, v. 67, p. 877–884, 2007.

TRAJMAN, A.; PAI, M.; DHEDA, K.; VAN ZYL SMIT, R.; ZWERLING, A.A.; JOSHI, R.; KALANTRI, S.; DALEY, P.; MENZIES, D. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? *Eur Respir J*; v. 31, n. 5, p. 1098-1106, 2008.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood.*, v. 84, n. 12, p 4008–4027, 1994.

TSAI, M.C.; CHAKRAVARTY, S.; ZHU, G.; XU, J.; TANAKA, K.; KOCH, C.; TUFARIELLO, J.; FLYNN, J.; CHAN, J. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol*, v. 8, p. 218–232, 2006.

TSENOVA, L.; BERGTOLD, A.; FREEDMAN, V. H.; YOUNG, R. A.; KAPLAN, G. Tumor necrosis factor is determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 96, p. 5657-5662, 1999.

TURNER, J., GONZALEZ-JUARRERO M., ELLIS D. L., BASARABA R. J., KIPNIS A., ORME I. M., COOPER A. M. *In vivo* IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J. Immunol.*, v. 169, p. 6343–6351, 2002.

UDWADIA, Z.F.; SEN, T. Pleural tuberculosis: an update. *Curr Opin Pulm Med*, v. 16, p. 399-406, 2010.

ULRICHS, T.; KOSMIADI, G.A.; TRUSOV, V.; JORG, S.; PRADL, L.; TITUKHINA, M.; MISHENKO, V.; GUSHINA, N.; KAUFMANN, S.H. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol*, v. 204, p. 217–228, 2004.

VALDES, L.; AIVAREZ, S.; SAN JOSE, E.; PENELA, P.; VALLE, J. M.; GARCÍA-PAZOS, J. M.; SUÁREZ, J.; POSE, A. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch Intern Med*, v. 158, p. 2017–2021, 1998.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H. M.; MEER, J. W. M. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15, n. 2, p. 294-309, 2002.

VAN PINXTEREN, L. A. H.; RAVN, P.; AGGER, E. M.; POLLOCK, J.; ANDERSEN, P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 7, .p. 155–160, 2000.

VAN RIE, A.; MELLET, K.; JOHN, M. A.; SCOTT, L.; PAGE-SHIPPI, L.; DANSEY, H.; VICTOR, T.; WARREN, R. False-positive rifampicin resistance on Xpert® MTB/RIF: case report and clinical implications. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, v. 16, p. 206-208, 2012.

VAN SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; DE HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; KOEDAM, M. A.; TEPPEMA, K. S.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L.M. & VAN EMBDEN, J. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Inter. J. Systematic Bacteriol.*, v.47, n.4, p. 1236-1245, out. 1997.

VAN VOOREN, J. P.; FARBER, C. M.; DE BRUYN, J.; YERNAULT, J. C. Antimycobacterial antibodies in pleural effusions. *Chest*, v. 97, p. 88–90, 1990. doi: <https://doi.org/10.1378/chest.97.1.88>.

VENDRAMINI, S. H. F.; VILLA, T. C.; SANTOS, M. L. G.; GAZETTA, C. E. Aspectos epidemiológicos atuais da tuberculose e o impacto da estratégia DOTS no controle da doença. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. v. 15, n. 1, p. 171-173, 2007.

VIANA-NIERO, C.; LEÃO, S. C. Limitações do uso do fragmento mtp40 como marcador de diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*. *J. Bras. Pneumol.*, v. 30, p. 407–407, 2004.

VILLEGAS, M.V.; LABRADA, L. A.; SARAVIA, N. G. Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase, and interferon-gamma in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest*, v. 118, p.1355-1364, 2000.

VORSTER, M. J.; ALLWOOD, B. W.; DIACON, A. H.; KOEGELEBERG, C. F. N. Tuberculous pleural effusions: advances and controversies. *Journal of Thoracic Disease.*, v. 7, n. 6, p. 981-991, 2015. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.02.18.

YANG, H.; KRUIH-GARCIA, N. A.; DOBOS, K. M. Purified protein derivatives of tuberculin - past, present, and future. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 66, p. 273–280, 2012.

YEAGER JR., H. J.; SMITH, L.; LE MAISTRE, C. Quantitative studies of mycobacterial population in sputum and saliva. *Am. Rev. Respir Dis.* v. 95, p. 998-1004, 1967.

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.*, v. 70, p. 1-9, 2018. doi: 10.1016/j.ijid.2018.01.007.

WILKINSON, K. A.; WILKINSON, R. J.; PATHAN, A.; EWER, K.; PRAKASH, M.; KLENERMAN, P.; MASKELL, N.; DAVIES, R.; PASVOL, G.; LALVANI, A. *Ex vivo* Characterization of Early Secretory Antigenic Target 6 ±Specific T Cells at Sites of Active Disease in Pleural Tuberculosis. *Clin Infec Dis*, v. 40, p. 184-187, 2005.

WILLIAMS, A.; RELJIC, R.; NAYLOR, I.; CLARK, S. O.; FALERO-DIAZ, G.; SINGH, M.; CHALLACOMBE, S.; MARSH, P. D.; IVANYI, J. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology*; v. 111, n. 3, p. 328-333, 2004.

WILSHER, M. L.; HAGAN, C.; PRESTIDGE, R.; WELLS, A. U.; MURISON, G. Human in vitro immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Diseases*, v. 79, n. 6, p. 371-377, 1999. <https://doi.org/10.1054/tuld.1999.0223>.

WHO 2011. World Health Organization. Commercial Serodiagnostic Tests for Diagnosis of Tuberculosis. Policy Statement. 26p. 2011.

WHO REPORT 2017. Global Tuberculosis Report 2017. Geneva: World Health Organization. 161 p. 2017.

WHO REPORT 2018. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization. 265 p. 2018.

WONGTIM, S.; SILACHAMROON, U.; RUXRUNGTHAM, K.; UDOMPANICH, V.; LIMTHONGKUL, S.; CHAROENLAP, P.; NUCHPRAYOON, C. Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions. *Thorax*, v. 54, p. 921-924, 1999.

WU, X.; YANG, Y.; ZHANG, J.; LI, B.; LIANG, Y.; ZHANG, C.; DONG, M.; CHENG, H.; HE, J. Humoral immune responses against the *Mycobacterium tuberculosis* 38-kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 antigens in tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*, v. 17, p. 372–375, 2010.

XIN, H.; ZHANG, H.; CAO, X.; LI, X.; LI, M.; FENG, B.; JIN, Q.; GAO, L. Serum level of IL-8 is associated with reversion of QuantiFERON-TB gold in-tube tests. *J Infect*, 2018. doi: 10.1016/j.jinf.2018.08.010

ZHANG, M.; XIONG, D.; LI, H.; WANG, Z.; LI, R. Diagnostic value of T-Spot TB combined with INF- γ and IL-27 in tuberculous pleurisy. *Exp Ther Med*, v. 15, n. 2, p. 1871-1874, 2018a. doi: 10.3892/etm.2017.5464.

ZHANG, X.; SUN, Y.; HE, C.; QIU, X.; ZHOU, D.; YE, Z.; LONG, Y.; TANG, T.; SU, X.; MA, J. The immune characterization of interferon- β responses in tuberculosis

patients. Microbiol Immunol., v. 62, n. 4, p. 281-290, 2018b. doi: 10.1111/1348-0421.12583

ZHAO, J.; SHIRATORI, B.; OKUMURA, M.; YANAI, H.; MATSUMOTO, M.; NAKAJIMA, C.; MIZUNO, K.; ONO, K.; ODA T CHAGAN-YASUTAN, H.; ASHINO, Y.; MATSUBA, T.; YOSHIYAMA, T.; SUZUKI, Y.; HATTORI, T. Difference in Antibody Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Antigens in Japanese Tuberculosis Patients Infected with the Beijing/Non-Beijing Genotype. J Immunol Res, 4797856, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/4797856>.

9 APÊNDICE 1: ARTIGO SUBMETIDO

BMC Immunology

IgA and IgG antibody detection of mycobacterial antigens in pleural fluid and serum from pleural tuberculous patients

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IMNO-D-18-00175	
Full Title:	IgA and IgG antibody detection of mycobacterial antigens in pleural fluid and serum from pleural tuberculous patients	
Article Type:	Research article	
Section/Category:	Immunity to infection	
Funding Information:	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (E26/110299/2014-4)	Dr Maria Helena Féres Saad
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (306047/2016-3)	Dr Maria Helena Féres Saad
	Fundação Oswaldo Cruz (VPPLR001-17)	Dr Maria Helena Féres Saad
Abstract:	<p>Background</p> <p>A previous study demonstrated pleural fluid (PF) IgA immunodominance for the fused MT10.3:MPT64 protein in pleural tuberculosis (PLTB) cases. However, no clue on the role of IgA and IgG against this and other antigens in PF and serum concerning improved diagnosis is available. Thus, the aim of the present study was to validate PF IgA-MT10.3:MPT64 and evaluate PF and serum IgA and IgG reactivity against this protein, its peptides (F2) and single MPT64, MT10.3 and the PPE59 mycobacterial specific antigens. IgA and IgG ELISA were measured against the antigen in PLTB (n=29) and other non-TB pleurisy (n=39) patient samples.</p> <p>Results</p> <p>The immunodominance of PF IgA-MT10.3:MPT64 was confirmed in PLTB (86.2%) followed by PPE59 (62%), while serum IgA-F2 exhibited 51.7% sensitivity. PF and serum IgG-MT10.3:MPT64 led to 65.5% and 51.7% sensitivity, respectively. However, MT10.3 and MPT64 displayed overall lower sensitivity (≤ 34.5) for both antibodies. All results displayed 95% specificity. Combinatory results indicated 93.1% sensitivity for PF IgA-MT10.3:MPT64/PPE59 and IgA/IgG-MT10.3:MPT64 at 92.3% specificity, followed by IgA-MT10.3:MPT64/-MPT64 or -F2 (89.6%) without jeopardizing specificity (94.9%). The combinatory results of the PF adenosine deaminase test (ADA) and IgA-MT10.3:MPT64/-F2 demonstrated the highest sensitivity (96.6%), with a specificity of 92.3%.</p> <p>Conclusions</p> <p>The PF IgA-MT10:MPT64 immune dominance was validated in PLTB, and its combinatory results with PPE59 or MPT64 or F2 antigens as well as with IgG, are reported herein for the first time, improving their potential to assist diagnosis. Combining PF-ADA and IgA-MT10.3:MPT64/-F2 results achieved better accuracy. Moreover, serum IgG, although less accurate, displays potential beyond microbiological tests.</p>	
Corresponding Author:	Maria Helena Féres Saad, Phd Fundacao Oswaldo Cruz Rio de janeiro, Rio de janeiro BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Fundacao Oswaldo Cruz	

Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Renan Jeremias da Silva
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Renan Jeremias da Silva
	Raquel da Silva Corrêa, Master
	Isabela Gama Sardella, Doctor
	Ana Carla de Paulo Mulinari, Master
	Thiago Thomaz Mafort, Doctor
	Ana Paula Santos, Dcotor
	Rogério Rufino, Doctor
	Luciana Silva Rodrigues, Doctor
	Maria Helena Féres Saad, Phd
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

IgA and IgG antibody detection of mycobacterial antigens in pleural fluid and serum from pleural tuberculous patients

Renan Jeremias da Silva ¹ (renanjeremias@hotmail.com);

Raquel da Silva Corrêa ² (raq.uerj@yahoo.com.br);

Isabela Gama Sardella ¹ (ibgama@cruiser.com.br);

Ana Carla de Paulo Mulinari ¹ (mulinaricarla@gmail.com);

Thiago Thomaz Mafort ³ (tmafort@gmail.com);

Ana Paula Santos ³ (dra.anapsantos@globo.com);

Rogério Rufino ³ (rrufino.uerj@gmail.com);

Luciana Silva Rodrigues ² (lrodrigues.uerj@gmail.com);

Maria Helena Féres Saad ^{1#} (saad@ioc.fiocruz.br)

¹ Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

² Laboratório de Immunopatologia (LIP), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Serviço de Pneumologia e Tisiologia, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Rio de Janeiro (HUPE)/UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Running title: Humoral immune response in tuberculous pleuritis

#Corresponding author: Dr. Maria Helena Féres Saad. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Microbiologia Celular, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro - 20045-360, Brasil, Tel./Fax. +55.21.25621598, e-mail: saad@ioc.fiocruz.br

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ABSTRACT

Background: A previous study demonstrated pleural fluid (PF) IgA immunodominance for the fused MT10.3:MPT64 protein in pleural tuberculosis (PLTB) cases. However, no clue on the role of IgA and IgG against this and other antigens in PF and serum concerning improved diagnosis is available. Thus, the aim of the present study was to validate PF IgA-MT10.3:MPT64 and evaluate PF and serum IgA and IgG reactivity against this protein, its peptides (F2) and single MPT64, MT10.3 and the PPE59 mycobacterial specific antigens. IgA and IgG ELISA were measured against the antigen in PLTB (n=29) and other non-TB pleurisy (n=39) patient samples.

Results: The immunodominance of PF IgA-MT10.3:MPT64 was confirmed in PLTB (86.2%) followed by PPE59 (62%), while serum IgA-F2 exhibited 51.7% sensitivity. PF and serum IgG-MT10.3:MPT64 led to 65.5% and 51.7% sensitivity, respectively. However, MT10.3 and MPT64 displayed overall lower sensitivity (≤ 34.5) for both antibodies. All results displayed 95% specificity. Combinatory results indicated 93.1% sensitivity for PF IgA-MT10.3:MPT64/-PPE59 and IgA/IgG-MT10.3:MPT64 at 92.3% specificity, followed by IgA-MT10.3:MPT64/-MPT64 or /-F2 (89.6%) without jeopardizing specificity (94.9%). The combinatory results of the PF adenosine deaminase test (ADA) and IgA-MT10.3:MPT64/-F2 demonstrated the highest sensitivity (96.6%), with a specificity of 92.3%.

Conclusions: The PF IgA-MT10.3:MPT64 immune dominance was validated in PLTB, and its combinatory results with PPE59 or MPT64 or F2 antigens as well as with IgG, are reported herein for the first time, improving their potential to assist diagnosis. Combining PF-ADA and IgA-MT10.3:MPT64/-F2 results achieved better accuracy. Moreover, serum IgG, although less accurate, displays potential beyond microbiological tests.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, pleural tuberculosis, IgA, IgG, ELISA, ADA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

BACKGROUND

Pulmonary tuberculosis is the most common clinical manifestation of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infection, although the disease may also affect other organs, leading to the development of extrapulmonary presentations, among which pleural tuberculosis (PLTB) is the most frequent in many countries [1-3]. Moreover, PLTB is the major cause of pleural effusions, responsible for approximately 50% of all related diagnoses in Brazil [4, 5]. The disease generally affects immunocompetent young adults, but, although patients may spontaneously heal, there is a risk of developing active tuberculosis (TB) in the absence of specific drug administration. Thus, early diagnosis and adequate treatment are required to avoid PLTB evolution to tuberculous empyema or pleural fibrosis [6, 7].

Traditional microbiological methods depend on the presence of bacilli in clinical specimens, therefore displaying low sensitivity in paucibacillary cases, like PLTB patients. The use of molecular techniques is costly and restricted to centers with adequate structure and specialized professionals. Histopathological examination of pleural biopsy samples comprises the standard PLTB confirmation test, but exhibits variable sensitivity, is expensive, time-consuming, requires skilled personnel and is an invasive procedure [8, 9]. Serological tests based on antibody (Ab) response may be an attractive alternative as a diagnostic method, as they are simple, fast and easy to operate, allowing their application in the public health system, where the diagnostic demand is high. In addition, they are not dependent on the presence of the bacilli in clinical specimens. In a previous study, Araujo *et al.* [10] demonstrated that the MT10.3:MPT64 fused antigen is recognized by immunoglobulin A (IgA) in the pleural fluid (PF) of PLTB patients, at high sensitivity (81.4%) and specificity (95.5%). Furthermore, the cloned fusion protein based on MPT64 and MT10.3 epitopes, termed F2 (MT10.3_(1M-40S):MPT64_{m(91L-205A)}:MT10.3_(41S-96)), was described to be predominantly recognized by serum IgA in pulmonary TB [11]. Moreover, previous studies have suggested that proteins belonging to

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

the mycobacterial PPE family are involved in many aspects of TB pathogenesis, including bacterial attachment to host cells, immunomodulation, antibody recognition and bacilli persistence ability in granulomas [12-16]. High IgA-PPE59 and lower IgG reactivity in pulmonary TB patient sera have been demonstrated [16]. However, no clues on the reactivity of these antigens (Ags) in PF and/or serum of PLTB cases are available. Serum would be a more promising clinical specimen to use in immune enzymatic tests, as it is comparatively less invasive and operationally simpler to obtain than PF. Thus, evaluating the immunoreactivity of IgA and other Ab to these proteins is an approach that could bring benefits to aid in the faster diagnosis of PLTB cases.

On the other hand, the use of adenosine deaminase (ADA) may contribute to a more efficient and differential diagnosis in PLTB cases [1, 17-19]. Although it is a fast, cheap, reproducible and easy to perform assay [8, 9], it presents limitations, such as the fact that its predictive value depends on the local TB prevalence and it presents low sensitivity in immunocompromised patients and false-positive results due to cross-reactivity with other diseases presenting with pleural effusion, such as lymphoma, vascular collagen diseases and bacterial empyema. Furthermore, it presents a wide range of results from region to region and should be used with caution in countries with low TB incidence [20-22]. Therefore, identification of new biomarkers and, consequently, the development of diagnostic test that differentiate PLTB from other pathologies presenting exudative pleural effusion may have a significant impact on primary care.

In this context, the present study investigated potential PLTB biomarkers, validating and/or evaluating the accuracy of dosing IgA and IgG, against mycobacterial single Ags MT10.3, MPT64 and PPE59, fusion proteins, such as MT10.3:MPT64 and the novel F2, in PF and serum samples of the same patients presenting PLTB and others presenting non-TB pleurisy.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RESULTS

Participant characteristics

A total of 68 subjects with pleural effusion and attended at the Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) were enrolled in this study for 24 months, of which 29 (42.6%) were diagnosed with PLTB and 39 (57.4%) with other non-tuberculous pleurisy (OPL). Table 2 depicts the main clinical, laboratory, and epidemiological data. Subjects differ in age, as OPL patients were older ($p < 0.001$). Cancer pathology was dominant (64.1%), and the majority of PLTB were males (72.5%), although no significant difference compared to OPL was observed ($p = 0.12$). Few participants reported past TB treatment (4/68, 5.8%), including two OPL patients. Concerning patients whose samples underwent conventional and ADA diagnostic tests, the PF-ADA investigation elicited adequate sensitivity and high specificity (79.3%, 23/29 and 94.9%, 37/39), followed by pleural biopsy histopathology suggestive of TB (69.2%, 9/13 and 76.2%, 16/21), respectively. Lower sensitivity and high specificity were obtained for the pleural biopsy (25%, 1/5 and 100%, 3/3) and PF culture (14.3%, 4/28 and 100%, 36/36) and acid fast bacilli (AFB) smears (0%, 0/28 and 100%, 35/35), respectively.

Pleural fluid and serum IgA and IgG antibodies against MT10.3:MPT64, F2, PPE59, MT10.3 and MPT64

All enrolled participants had *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) serum and PF examined for specific Ab in response to the five proposed antigens. Figures 1a and 1b detail individual reactivity. The significantly high mean levels in PLTB compared to OPL for all Ab and antigens ($p \leq 0.031$) except IgG (MPT64, PPE59 and F2) and IgA (MT10.3) at different serum dilutions ($p \geq 0.057$) are displayed. According to the receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, when fixing specificity at 95%, a high positivity

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

of PF IgA-MT10.3:MPT64 was confirmed registering the best sensitivities at of 1:50 and 1:200 specimen dilutions (86.2%), followed by 82.8%, at 1:400. PF IgA-PPE59 (62.1%) and -F2 (44.8%) elicited moderate and low sensitivities, at 1:100 and 1:50 dilutions, respectively. All tests showed AUC>0.904, except for F2. Serum IgA-F2 reached the best positivity (51.7%) at both 1:25 and 1:50 dilutions and AUC <0.844. The only antigen to detect PLTB patients with high AUC (0.952) was the MT10.3:MPT64 fusion protein, with sensitivity of 65.5% in PF at a 1:200 dilution, decreasing to 51.7% in serum at a 1:50 dilution and AUC=0.809 (Table 3).

It is noteworthy that, when combining the PF IgA-MT10.3:MPT64 (1:50) -MPT64 (1:100) or -F2 (1:50), or IgA-MT10.3:MPT64/-PPE59 (1:200/1:100, respectively) results, sensitivity improved to 89.6% without jeopardizing specificity (94.9%) (Table 4). These results were not obtained for any other tested Ags, although PF IgA-MT10.3:MPT64/-PPE59 (1:50/1:100) and IgA/IgG- MT10.3:MPT64 combinatory results elicited the highest sensitivity (93.1%), indicating a slight decrease in specificity (92.3%), while serum IgG (1:50/1:800 or 1:1600) led to the best combination result (55.1%) for both fusion proteins MT10.3:MPT64/F2, with the same specificity. Other IgA and/or IgG antigen combinatory results have reached moderate to high sensitivities (>68%), however, jeopardizing specificity (89.7%) (Table 4).

The overall cross reactivity was mainly associated with cancer (12/25), although only one PF at 1:50 dilution was associated to the IgA-MT10.3:MPT64 fusion protein, as well as one heart failure (3/5), which tested positive for the QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) assay (data not shown). Moreover, two samples plus a third heart failure also tested QFT-GIT positive with an unspecific histopathological exam and were positive for PF (1:50) IgA-F2. In fact, among all 18 OPL cases testing ELISA positive for any of the Abs, Ags and/or body fluids, four (22%) were QFT-GIT positive. These results may suggest latent tuberculosis infection (LTBI).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Comparison of standard conventional tests and ADA with immune responses in pleural tuberculosis diagnoses

Considering the best results for PF or serum IgG and IgA with different antigens, we hypothesized if they were more accurate in comparison with other tests used to diagnosis PLTB. As seen in Table 5, PF-ADA (S=79.3% and Sp=94.9%) or pleural biopsy histopathology (S=69.2%, 9/13 and Sp=76.2%, 16/21) were less accurate than PF IgA-MT10.3:MPT64 (1:50) and its combinatory results with /MPT64 (1:100) or /F2 (1:50), which elicited $S \geq 89.6\%$ and $Sp = 94.9\%$. Thus, PF-IgA ELISA produced similar positivity as conventional testing, but the immune test positivity among negative results provided by these conventional tests in PLTB is noteworthy. Although not all subjects were histopathologically examined, 15.3% were non-specific, positively identified by the immunotests, while positive PLTB cases without known histopathological exam were also noted (12/16, 75%). Thus, the ELISA resulted in an overall sensitivity of 86.2%, against 69.2% of the histopathological exam. On the other hand, most of the PLTB cases with negative ADA resulted in positive PF IgA-MT10.3:MPT64 diluted at a 1:50 ratio (5/6), as well as their combinatory results with /MPT64 diluted 1:100 or /F2 diluted 1:50 (5/6, respectively).

Among microbiological tests used for TB diagnosis, AFB is the flagship, as it is easy to apply, quick and cheap, although exhibiting low sensitivity, while cultures, despite more accurate, are cumbersome and time consuming. Although these tests were not performed in all samples, their performance was weak (>25%), as expected in paucibacillary cases, such as PLTB. However, the immune tests proposed herein provided significantly better detection (ranging from 51.7% to 89.6%) for IgG or IgA determined in serum (51.7% or 44.8%) or PF (65.5% or >86%, respectively), especially for the combinatory PF (1:50) IgA-MT10.3:MPT64/F2 results. None of the other combinatory results led to better accuracy (Tables 4, 5).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

One of the disadvantages of the Ab immune test is the heterogeneity of the immune response across patients [23-25]. As the present study evaluated a small number of antigens or their fused peptides, some of the patients did not respond. Thus, the immune test results combined with ADA were evaluated, as this was performed for all samples, aiming at diagnostic improvement. The combined results of PF (1:50) IgA-MT10.3-MPT64/-F2 and ADA provided the best sensitivity (96.6%, 28/29) for PLTB detection, at 92.3% specificity (36/39).

DISCUSSION

The PLTB frequency diagnosed in this study was lower than reported in other Brazilian studies [10, 26]. This difference may be associated with improvements of the TB control program in public health units, reflecting the decrease in TB cases in recent years. However, accurate diagnostic methods are still required for PLTB detection. For instance, the standard histopathological examination for pleural biopsy was virtually not performed in the present sampling as compared to Araújo *et al* [10]. On the contrary, the diagnosis herein relied on clinical suspicion and the ADA diagnostic test for all patients, reaching 79% sensitivity. However, PF IgA MT10.3:MPT64 (86.2%) and its combined results with /-MPT64 or /-F2 identified all, except one, PLTB negative ADA sample, and, despite missing three or two of the positive ADA PLTB patients, the immune tests developed herein improved pleurisy tuberculosis detection (89.6%). The combinatory results for PF (1:50) IgA MT10.3:MPT64/-F2 and ADA displays a double advantage, as, besides increasing sensitivity (96.6%), the PF can be used at the same dilution for both fused Ags when compared to the combinatory results of different PF dilutions used to obtain the same high sensitivity, thus making them suitable as a diagnosis test component to aid in PLTB diagnosis. Moreover, the combinations of tests results can obviate the need for a pleural biopsy during the initial diagnostic, and, as the immune

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

test and ADA are fast techniques displaying low costs, easy to operate and to apply in public health systems, they favor a rapid auxiliary PLTB diagnosis.

The ADA test is applied in the routine diagnostic of TBPL in the absence of positive microbiological or histopathological data with fair sensitivity and specificity [9, 27, 28]. Recently, authors have suggested the use of ADA in combination with other diagnostic tests, such as interferon-gamma (IFN- γ) release assays, and in the search for new biomarkers [17-19, 29-32]. The present study may provide a simpler alternative immune test for ADA combination.

The fused antigen MT10.3:MPT64 performed better for PF IgA in our study, corroborating previous studies [10], although the lower reactivity on single antigens MT10.3 (20.7%) and MPT64 (24.1%) was not expected and is in disagreement with to previous reports (72%) assessing populations carrying similar pleurisy morbidities to the present study [26]. One explanation could be antigen degradation, as the batches used herein were old and underwent several freezing and thawing cycles. On the other hand, for serum, the present results corroborate those reported by Silva *et al.* [33] where, even when evaluating pulmonary TB, both single antigens failed to show high sensitivity (< 34.5%). Nevertheless, reduced recognition of these antigens by serum IgA and IgG (including to PPE59) was also detected. Another possible explanation is that, herein, 64% of OPL cases presented cancer and higher mean IgA levels in both PF and serum, as well as PF IgG, compared to other OPL cases. False-positive ELISA results in patients with lung cancer have been reported by other authors [26, 34]. Brazilian estimates for 2018-2019 indicate the occurrence of about 600.000 new cancer cases, of which approximately 10% will present in the state of Rio de Janeiro [35]. In this study, a higher proportion of OPL cases by cancer was observed compared to previous reports [26]. This may be associated to the fact of HUPE is a tertiary hospital, which provide specialized health care in a large hospital after primary and secondary care referrals. Therefore, this is a hospital for major operations,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

consultations with sub-specialists and presenting sophisticated intensive care facilities, essential for cancer patients. Moreover, among other reasons, reduction in mortality and nativity rates that indicate prolongation of life expectancy and population aging, lead to increases in the incidence of chronic-degenerative diseases, especially cancer and cardiovascular diseases [36]. Coincidentally, OPL cases were older and cardiovascular disease was the second morbidity rate cause. Thus, to investigate markers with potential differentiation in PLTB and OPL cases aids in the search for new TB biomarkers with value for immune diagnosis.

It is well known that IgA is a predominant mucosal/serous immunoglobulin, also secreted in the pleural space [34, 37]. However, IgA against mycobacterial Ags has been found in pulmonary TB patient sera by several authors [11, 38-41]. Serum is obtained by less invasive methods and its application in a simple diagnostic test brings benefits, leading to faster diagnoses. Zhao *et al.* [42] suggested Ab-based tests in plasma to identify Beijing MTB infection. In the present study, IgG and IgA resulted in lower serum positivity compared to PF results. However, the frequency of positive results is higher than obtained in microbiological tests, therefore useful in their absence and other, less sensitive, conventional PLTB diagnostic tests. The use of recombinant fused antigens in diagnostic tests constitutes an interesting strategy to increase accuracy and simplicity. Fusion of different antigens may change reactivity according to gene position in their construction [10, 11, 43]. In this study, the higher sensitivity elicited by MT10.3:MPT64 may be related to this fact, since the fusion protein expressed by opposite genes according to that construction seems to display low stability and quality (personal communication).

As expected, histopathological examinations demonstrated higher sensitivity than the conventional microbiological methods for PLTB diagnosis, but lower compared to the developed ELISA. Nonetheless, among the patients with negative results or no information, the ELISA IgA-MT10.3:MPT64 was able to

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

identify most PLTB patients. The detection of specific antibodies for PLTB mycobacterial antigens in the absence of information or unspecific histopathological results could be supportive of the hypothesis that, in some cases, pleural effusion may also be caused by the possible entry of mycobacterial antigens into the pleural space, thereby stimulating the presence of IgA at this site [44]. Conversely, few OPL patients diagnosed by histopathology presented false-positive ELISA IgA-MT10.3:MPT64 results (1/16, 6.2%).

The F2 (MT10.3_(1M-40S):MPT64m_(91L-205A):MT10.3_(41S-96)) containing peptides of both antigens led to decreased mean levels of reactivity to almost half among PLTB cases (0.553 ± 0.230), but no change for OPL cases (0.351 ± 0.212) compared to the full fused genes (0.821 ± 0.213 or 0.387 ± 0.188 , respectively). However, F2 recognition by a PLTB group added sensitivity to the combinatory of results using both fusion antigens for PF IgA detection. This may be explained by exposure of other epitopes not available in the full gene construction or single antigens.

Until now, no publications associating the F2 protein chimera or PPE59 with IgA detection in PLTB patient PF are available. Despite their lower sensitivity compared to MT10.3:MPT64, sensitivity was higher to that found in AFB smear exams, although displaying higher specificity. Nevertheless, considering that the ELISA has the potential to be point of care (POC) test, results similar to those found in bacterioscopy assessments may be obtained quickly. Serum IgA-F2 elicited the best reactivity compared to the other antigens, detecting half of the PLTB cases (51.7%); although in pulmonary TB this positivity was also evidenced for IgG-F2 [11], a discrepancy which may be related to the different clinical TB forms. It is possible that the compliance of the fused protein, where the repositioning of the gene fragments led to the formation of new epitopes and, consequently, obfuscation of others, could positively affect IgA or IgG recognition in PL and pulmonary TB patient sera. The third single antigen used in this study, PPE59, performed similarly, at low reactivity for serum IgG in PLTB, as previously observed for pulmonary and different extrapulmonary TB cases (25% and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

0%, respectively) (unpublished data). However, a higher PF (1:100) IgA-PPE59 (62.1%) sensitivity compared to that unpublished data (54% and 28%, respectively) is described herein for the first time. To date, the actual function of this protein in metabolism or its evolutionary role in *Mycobacterium tuberculosis* is unknown. However, it is known to induce cell-mediated response by IFN- γ and interleukin-10 in pulmonary TB [12, 15] and, as a result of the present study, immunodominance of IgA and non-IgG in PLTB patient PF in endemic areas. Therefore, PPE proteins display potential as specific TB diagnosis markers and may assist in the diagnostic investigations performed in PLTB PF.

Some Bacille Calmette Guérin (BCG) vaccine strains, including the one used in Brazil, contain the gene coding for the MPT64 antigen and it has been hypothesized that tumor cells and the BCG strain may share antigens [10, 45, 46]. In the present study, cross-reactivity was observed, as in previous, similar, studies [10, 26, 47, 48]. This may be explained by a history of previously healed TB, or possible immune response disorders elicited in the course of non-tuberculous diseases, considering that most MTB antigens may share similarities with other mycobacterial species, such as BCG and atypical mycobacteria [26, 34]. It is important to note that the majority of participants were BCG vaccinated and, more important, clinical specimens from patients classified as OPL from Rio de Janeiro, a city with a high TB incidence rate, were used [49, 50]. Thus, it is possible the patients may have presented TB as undiagnosed co-morbidity or were LTBI. Lupus autoimmune disorder based diagnostics rely solely on clinical examination, negative for PF culture or AFB and positive for the ADA assay. Moreover, when an immune response is successful in controlling infection, MTB bacilli may be present in non-replicative form or latently replicate, defined as a clinically asymptomatic latent infection state. It is also noteworthy that positive OPL patients respond to different antigens in the ELISA. However, some patients presented QFT-GIT® positive results. It is possible that these patients had tuberculosis but were wrongly included in the OPL group, perhaps because not all

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

the available resources for TB diagnosis were applied or because the patients are LTBI. Further studies in which all specimens can be accurately investigated must be carried out, in order to confirm these data.

CONCLUSIONS

A successful ELISA for the detection of IgA and IgG in body fluids of relative invasive power, such as PF and serum against different mycobacterial antigens for PLTB diagnosis was described herein. In addition, the MT10:MPT64 fusion protein was validated as highly promising Ag as PF IgA ELISA in a new PLTB cohort, although presenting less sensitivity for IgG in serum, both with high specificity diagnostic potential. PPE59 as a single antigen recognized by PF and serum IgA at high sensibility and specificity compared to conventional microbiological assays was described for the first time. The combinatory results of PF (1:50) IgA MT-10:MPT64/-F2 performed better than conventional diagnostic tests, but their combination with ADA improved PLTB diagnostic, leading to significant impacts concerning the reduction of the number of deaths and contributing to the adequate treatment to avoid PLTB evolution to tuberculous emphysema or pleural fibrosis. Thus, ELISA PF IgA- MT10.3:MPT64, -PPE59 and IgA MT-10:MPT64/F2 deserves further standardization as a potential new and rapid diagnostic tool to aid in PLTB cases.

MATERIALS AND METHODS

Study Participants and Ethical Statement:

Serum and PF samples from 68 individuals attended by spontaneous demand and diagnosed with PLTB or OPL at the Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)/UERJ, were collected from March 2015 to March 2017. The inclusion criterion was the presence of pleural effusion with clinical indication for thoracentesis, as described elsewhere [26]. All participants were ≥ 18 years old. Exclusion criteria were, pregnant women,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

those who did not agree to participate or provide clinical specimens and those who refused to sign the informed consent form. The study population included: **i)** PLTB cases, presence of infectious clinical manifestations accompanied by ADA positivity (>40 U/L), and/or positive acid fast bacilli (AFB) staining and/or positive MTB culture in pleural fluid or tissue; and/or by granuloma findings in histopathological pleural tissue tests; and/or cytopathological PF investigations indicating lymphocytic exudate without malignancy; and/or diagnosed with clinical findings, such as fever, night sweats, lymphocytic exudative pleural effusion with a non-diagnostic pleural biopsy (with either positive or negative culture), and a good response to specific treatment; and **ii)** OPL cases, with diagnosis based on clinical manifestations accompanied by histopathological pleura examinations and PF cytopathology, compatible with pleurisy other than TB.

Most patients presented information regarding BCG vaccinations (62/68). PF samples underwent the ADA test based on Giusti's method [51], at the Hermes Pardini laboratory, a reference outsourced service provision diagnostic medicine center. Human immunodeficiency virus (HIV) infection status was determined using an immunohistochemical colorimetric method (Cobas®, Roche Molecular Systems Inc, CA, USA). Pleural tissue for biopsies and PF samples underwent AFB staining and culture in Lowenstein-Jensen's (LJ) medium, according to routine laboratory methods. Pleural biopsy fragments were taken for histopathological examinations and PF, for cytopathological investigations.

This study was approved by the Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE/UERJ Ethics Committee, no. 1.100.772. Sample donation was obtained only after written informed consent of all participants. Clinical, laboratory, and demographic data were obtained from medical records.

Antigens: The recombinant fused antigens MT10.3:MPT64, F2 (MT10.3_(1M-40S):MPT64_{m(91L-205A)}:MT10.3_(41S-96)), and PPE59 were engineered in our laboratory, as described elsewhere [10, 11, 16].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

LIONEX Diagnostics & Therapeutics GmbH (Braunschweig, Germany) kindly donated Ags MT10.3 and MPT64.

Clinical specimens and sample processing: Venous blood was collected in 10 milliliters (mL) tubes without anticoagulants (BD Biosciences, Mountain View, CA) and PF was collected in 50 mL conical Falcon tubes at the time of diagnosis, and immediately processed. Samples were centrifuged at 930 x g, low brake, for 10 minutes, at 25°C for serum or 4°C for PF. Supernatant aliquots were then stored at -80°C until use. PF samples with notable hemolysis were excluded from the study. All procedures follow international biosecurity standards.

IgA and IgG “in house” enzyme immunosorbent assay (ELISA): Flat-bottom polystyrene microtiter plates (C96 Maxisorp; Nunc, Swedesboro, NJ, USA) were coated and incubated for 2 hours (h) at 37°C with 50 microliter (µL)/well of an MTB antigen solution at concentrations previously determined for the different MTB antigens in carbonate-bicarbonate buffer (CBB, pH 9.6; Na₂CO₃ 15 mmol.L⁻¹, NaHCO₃ at 15 mmol.L⁻¹). The plates were washed three times with 200 µL of phosphate buffered saline (pH 7.4) with 0.01% tween (PBSt 0.01%) pH=7.4 (Na₂HPO₄ 90 mmol.L⁻¹; NaH₂PO₄ 18.98 mmol.L⁻¹; NaCl 9.92 mmol.L⁻¹; 0.01% Tween 20). Nonspecific binding was blocked by adding 100 µL/well of phosphate buffered saline (pH 7.4) with 0.01% tween (PBSt) pH = 7,4 (Na₂HPO₄ 90 mmol.L⁻¹; NaH₂PO₄ 18.98 mmol.L⁻¹; NaCl 9.92 mmol.L⁻¹; 0.01% Tween 20) containing 5% bovine serum albumin (BSA-PBSt; US Biological, MA) and incubated, as described above. After washing, the plates were immediately used or stored at 4°C (> 2 weeks). Each 50 µL of serial 2-fold dilutions of PF and serum samples in PBSt containing 1 % BSA were added to the respective wells and incubated at 37°C for 1 h. After washing the plates, incubation was carried out for 1 h with 50 µL solution of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgA or IgG monoclonal antibodies (HRP, Pierce, Rockford, IL) at different dilutions in 1% BSA-PBSt. After a final

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

washing, HRP activity was detected adding 50 μL /well of the chromogenic 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution (TMB; Pierce, Rockford, IL), and leaving the plate in the dark at room temperature for 20 min. Reactions were stopped using 50 μL /well of 2 mol.L⁻¹ H₂SO₄, and absorbance values were determined at 450 nm on an ELISA reader (SpectraMax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). All tests were performed in duplicate, and, pooled positive and negative controls (previously determined concentration) were used as references in each set of experiments. To estimate IgG-MT10.3:MPT64 immunoreactivity, the same procedure described above was used, with, washings and dilutions of the samples and conjugates carried out, respectively, with PBSt 0.1%, and PBSt 0.1% plus 0.3 mol.L⁻¹ NaCl as suggested by Araujo *et al.* [10]. Table 1 exhibits the antigen, sample and conjugate standardizations and parameterizations for the ELISA tests.

Statistical analyses: *M. tuberculosis* protein immunoreactivity was determined by optical density (OD). Results are expressed as means \pm standard deviation (SD), and groups were compared using the nonparametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test. The chosen cutoff value was calculated for each antigen according to a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for each PF and serum dilution, fixing specificity at 95%, based on all PLTB and OPL subjects. The diagnostic value of the ELISA was evaluated in terms of sensitivity (S) and specificity (Sp). A *p* value (*p*) of ≤ 0.05 was considered statistically significant. A combinatory analysis of the results of the different proteins with test results used for routine diagnosis was carried out. Statistical analyses were performed using the *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) v. 20 (SPSS Inc., Chicago, IL) and Prism6 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA) softwares.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

LIST OF ABBREVIATIONS

°C – graus Celsius

Ab - antibody

AFB - Acid Fast Bacilli stain

ADA - adenosine deaminase

Ags - Antigenes

BCG - Bacille Calmette Guérin

BSA - bovine serum albumin

CBB - carbonate-bicarbonate buffer

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

ELISA - Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay

FAPERJ - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

F2 - protein chimera MT10.3(1M-40S):MPT64M(91L-205A):MT10.3(41S-96)

FIOCRUZ - Oswaldo Cruz institution

h - Hours

HIV - Human immunodeficiency virus

HUPE - Hospital Universitário Pedro Ernesto

IFN- γ - Interferon-gamma

IgA - Immunoglobulin A

IgG – Immunoglobulin G

LIP – Laboratório de Imunopatologia

LJ - Lowenstein-Jensen's medium

1
2
3
4 LTBI - Latent tuberculosis infection
5
6 ml – milliliter
7
8
9 μ l - microliter
10
11 MTB - Mycobacterium tuberculosis
12
13 MT10.3 (ES6.9, TB10.3, Rv3019c) - MTB antigen (10kDa) encoded by genes of the difference region 2
14
15 MPT64 (Rv1980c) - MTB antigen (24kDa) encoded by genes of the difference region 2
16
17
18 MT10.3:MPT64 – MTB antigens fusion MT10.3 and MPT64
19
20
21 NaCl - Sodium chloride
22
23 nm - nanometer
24
25
26 OD - optical density
27
28
29 OPL - other non-tuberculous pleurisy
30
31 PBSt - phosphatebuffered saline with tween
32
33
34 PF - pleural fluid
35
36 PLTB - Pleural tuberculosis
37
38
39 POC - point of care test
40
41 PPE59 – MTB antigens encoded by RD11. PE (Pro-Glu) e PPE (Pro-Pro-Glu) Family
42
43 Prism6 - Prism Graph-Pad Software
44
45 QFT-GIT - QuantiFERON®-TB Gold In-Tube assay
46
47
48 RJ – Rio de Janeiro
49
50
51 ROC - receiver operating characteristic
52
53 S - sensitivity
54
55 SD - standard deviations
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Sp - specificity

SPSS - Statistical Package for Social Sciences software

TB – Tuberculosis

TMB - 3,3 ,5,5-tetramethylbenzidine substrate solution

p – p valor

UERJ – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

x g - g Force

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate: This study was approved by the Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE/UERJ Ethics Committee, number: 1.100.772. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Consent for publication: Written informed consent was obtained from all individual participants included in this study.

Availability of data and material: The dataset that support the findings of this study are available from the authors but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study and so are not publicly available. Data are however available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Funding: The study was supported by funds from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the FioTB network at the Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz.

Authors' contributions: RJS conducted immunological experiments in the laboratory; analyzed and interpreted all patient data, and was a major contributor in writing the manuscript.

RSC contributed to the recruitment and collection of samples of participant groups at Pedro Ernesto Hospital, belonging to the Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Was also responsible for processing and sending the samples to LAMICEL. Contributed with collected patient data.

IGS contributed with immunological experiments, and analyzed and interpreted all patient data.

ACPM contributed by analysing and interpreting all patient data.

TTM contributed by performing thoracentesis and collecting the samples of participant groups at the Pedro Ernesto Hospital, belonging to Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

APS contributed to recruitment of participant groups at the Pedro Ernesto Hospital, belonging to Universidade do Estado do Rio de Janeiro, and was also responsible for the collected clinical, laboratory, and demographic data, and for updating the patient database from medical records.

RR coordinated the Pulmonary and Tisiology Service at at the Pedro Ernesto Hospital, belonging to Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

LSR coordinated the recruitment and collection of participant groups samples at the Pedro Ernesto Hospital, belonging to Universidade do Estado do Rio de Janeiro; coordinated sending the samples from LIP to LAMICEL, and coordinated patient data collection. In addition, she also the medical records and was a major contributor in writing the manuscript.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

MHFS coordinated the project and immunological experiments at the Cellular Microbiology Laboratory (IOC/FIOCRUZ), analyzed and interpreted all patient data and was a major contributor in writing the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the FioTB network at the Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz. The authors would like to thank all professionals at HUPE whose collaboration allowed this study, as well as all those who participated in the study.

REFERENCES

1. Light RW. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2010, doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01723.x.
2. Dong X, Yang J. High IL-35 Pleural expression in patients with tuberculous pleural effusion. *Med Sci Monit* 2015, doi: <http://doi.org/10.12659/MSM.892562>.
3. WHO Report: World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2015*. 20th ed. Geneva: World Health Organization. 192 p. <http://www.who.int/iris/handle/10665/191102> (2015). Accessed 20 jan 2016.
4. Neves DD, Dias RM, Cunha AJ. Predictive model for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Braz J Infect Dis* 2007, doi: <http://doi.org/10.1590/S1413-86702007000100019>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

5. Sales RK, Vargas FS, Capelozz, VL, Seiscento M, Genofre EH, Teixeira LR, Antonangelo L. Predictive models for diagnosis of pleural effusions secondary to tuberculosis or cancer. *Respirology* 2009, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01621.x>.

6. Candela A, Andujar J, Hernández L, Martín C, Barroso E, Arriero JM, Romero S. Functional sequelae of tuberculous pleurisy in patients correctly treated. *Chest* 2003, doi: <https://doi.org/10.1378/chest.123.6.1996>.

7. Sonmezoglu Y, Turna A, Cevik A, Demir A, Sayar A, Dincer Y, Bedirhan MA, Gurses A. Factors affecting morbidity in chronic tuberculous empyema. *Thorac Cardiovasc Surg* 2008, doi: <https://doi.org/10.1055/s-2007-965301>.

8. Kataria YP, Khurshid I. Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Chest* 2001, doi: <https://doi.org/10.1378/chest.120.2.334>.

9. Morisson P, Neves DD. Avaliação da adenosina desaminase no diagnóstico da tuberculose pleural: uma metanálise brasileira. *J Bras Pneumol* 2008, doi : <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132008000400006>.

10. Araujo LS, Maciel RM, Trajman A, Saad MH. Assessment of the IgA immunoassay diagnostic potential of the *Mycobacterium tuberculosis* MT10.3-MPT64 fusion protein in tuberculous pleural fluid. *Clin Vaccine Immunol* 2010, doi: <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00372-10>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

11. Sardella IG, Mulinari ACP, Fonseca LS, Saad MHF. Cloning, Expression and Characterization of Fusion Proteins Based on Peptides of Rv1980c Disrupting Rv3019c Sequence and Evaluation of its Potential Immunoreactivity in Pulmonary Tuberculosis Sera. *Mycobact Disv* 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1068.1000183>.

12. Al-Attayah R, Mustafa AS. Characterization of human cellular immune responses to novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens encoded by genomic regions absent in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 2008, doi: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00199-08>.

13. Cole ST, Barrell BG. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found Symp* 1998(discussion 172–167), doi: <https://doi.org/10.1002/0470846526.ch12>.

14. Karboul A, Mazza A, Gey Van Pittius NC, Ho JL, Brousseau R, Mardass IH. Frequent homologous recombination events in *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE multigene families: potential role in antigenic variability. *J Bacteriol* 2008, doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00827-08>.

15. Chen J, Su X, Zhang Y, Wang S, Shao L, Wu J, Wang F, Zhang S, Wang J, Weng X, Wang H, Zhang W. Novel recombinant RD2- and RD11-encoded *Mycobacterium tuberculosis* antigens are potential candidates for diagnosis of tuberculosis infections in BCG-vaccinated individuals. *Microbes Infect* 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.008>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

16. Mulinari ACP (2016) Obtenção da proteína codificada pelo gene RV3429 de *Mycobacterium tuberculosis* e avaliação da reatividade imune humoral. Masters Dissertation. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro – RJ. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/22982>

17. Dheda K, Van Zyl-Smit RN, Sechi LA, Badri M, Meldau R, Meldau S, Symons G, Semple PL, Maredza A, Dawson R, Wainwright H, Whitelaw A, Vallie Y, Raubenheimer RP, Bateman ED, Zumla A. Utility of quantitative T-cell responses versus unstimulated interferon- γ for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Eur Respir J* 2009,, doi: <https://doi.org/10.1183/09031936.00005309>.

18. Li M, Wang H, Wang X, Huang J, Wang J, Xi X. Diagnostic accuracy of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, interleukin-10 and adenosine deaminase 2 in differential diagnosis between tuberculous pleural effusion and malignant pleural effusion. *J Cardiothorac Surg* 2014, doi: <https://doi.org/10.1186/1749-8090-9-118>.

19. Shu CC, Wang JY, Hsu CL, Keng LT, Tsui K, Lin JF, Lai HC, Yu CJ, Lee LN, Luh KT. Diagnostic role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and effector molecules of cytotoxic T lymphocytes in tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2015, doi: <https://doi.org/10.1111/resp.12414>.

20. Trajman A, Kaisermann C, Luiz RR, Sperhake RD, Rossetti ML, Saad MHF, Sardella IG, Spector N, Kritsk, AL. Pleural fluid ADA, IgA-ELISA and PCR sensitivities for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2007, doi: <https://doi.org/10.1080/00365510701459742>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

21. Ogata Y, Aoe K, Hiraki A, Murakami K, Kishino D, Chikamori K, Maeda T, Ueoka H, Kiura K, Tanimoto M. Is adenosine deaminase in pleural fluid a useful marker for differentiating tuberculosis from lung cancer or mesothelioma in Japan, a country with intermediate incidence of tuberculosis? *Acta Med. Okayama* 2011, doi: <http://dx.doi.org/10.18926/AMO/46851>.

22. Kashiwabara K, Okamoto T, Yamane H. When pleural potassium exceeds 5.0 mEq/L, high pleural adenosine deaminase levels do not necessarily indicate tuberculous pleuritis. *Respirology* 2012, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2011.02053.x>.

23. Samanich K, Belisle JT, Laal S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immun* 2001, doi: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.7.4600-4609.2001>.

24. Abebe F, Holm-Hansen C, Wiker HG, Bjune G. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol* 2007, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01978.x>.

25. Pathakumari B, Prabhavathi M, Anbarasu D, Paramanandhan P, Raja A. Dynamic IgG antibody response to immunodominant antigens of *M. tuberculosis* for active TB diagnosis in high endemic settings. *Clin Chim Acta* 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.06.033>.

26. Kaisermann M, Sardella I G, Jonas F, Kampfer S, Singh M, Trajmann A, Saad MHF. IgA response to *Mycobacterium tuberculosis* recombinants MPT64 e MT-10.3 antigens in fluid pleural of patients with tuberculous pleurisy. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2005;9(4):461-6.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

27. Porcel JM. Advances in the diagnosis of tuberculous pleuritic. *Ann Transl Med* 2016, doi: <https://doi.org/10.21037/atm.2016.07.23>.

28. Mollo B, Jouveshomme S, Philippart F, Pilmis B.. Biological markers in the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Ann Biol Clin (Paris)* 2017, doi: <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1201>.

29. He Y, Zhang W, Huang T, Wang X, Wang M. Evaluation of a diagnostic flow chart applying medical thoracoscopy, adenosine deaminase and T-SPOT.TB in diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 2015;19:3563-8.

30. Li D, Shen Y, Fu X, Li M, Wang T, Wen F. Combined detections of interleukin-33 and adenosine deaminase for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Int J Clin Exp Pathol.*, 2015,1:888-893.

31. Kim MC, Kim SM, Lee SO, Choi SH, Kim YS, Woo JH, Kim SH. A diagnostic algorithm for tuberculous pleurisy using the ELISPOT assay on peripheral blood and pleural effusion. *Infect Dis (Lond)* 2016, doi: <https://doi.org/10.1080/23744235.2016.1183816>.

32. Liu Y, Ou Q, Zheng J, Shen L, Zhang B, Weng X, Shao L, Gao Y, Zhang W. A combination of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay and the detection of adenosine deaminase improves the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Emerg Microbes Infect* 2016, doi: <https://doi.org/10.1038/emi.2016.80>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

39. Wilsher ML, Hagan C, Prestidge R, Wells AU, Murison G. Human *in vitro* immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberc. Lung Dis 1999, doi: <https://doi.org/10.1054/tuld.1999.0223>.

40. Glatman-Freedman A. Advantages in antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy. FEMS Immunol. Med Microbiol 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00172-X](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00172-X).

41. Bezerra JM, Beck ST, Kanunfre KA, Leite OM, Ferreira AW. A study of IgA antibody response to different *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the diagnosis and monitoring of pulmonary tuberculosis. Braz J Infect Dis 2009, doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702009000100012>.

42. Zhao J, Shiratori B, Okumura M, Yanai H, Matsumoto M, Nakajima C, Mizuno K, Ono K, Oda T Chagan-Yasutan H, Ashino Y, Matsuba T, Yoshiyama T, Suzuki Y, Hattori T. Difference in Antibody Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Antigens in Japanese Tuberculosis Patients Infected with the Beijing/Non-Beijing Genotype. J Immunol Res 2017, doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/4797856>.

43. 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, doi: <https://doi.org/10.1086/520662>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

44. Seiscento M, Conde MB, Dalcolmo MMP. Tuberculose Pleural. J Bras Pneumol 2006, 32(Sulp 4):S174-S181. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132006000900003>.

45. Minden P, Jarrett C, Mcclatchy JK, Gutterman JU, Hersh EM. Antibodies to melanoma cell and BCG antigens in sera from tumourfree individuals and from melanoma patients. Nature 1976, doi: <http://doi.org/10.1038/263774a0>.

46. Maver C, Kausel C, Lininger L, Mckneally M. Intrapleural BCG immunotherapy of lung cancer patients. Recent Results Cancer Res 1982, doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-81685-7_36.

47. Dhand R, Ganguly NK, Vaishnavi C, Gilhotra R, Malik SK. False-positive reactions with enzyme-linked immunosorbent assay of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in pleural fluid. J Med Microbiol 1988,. doi: <https://dx.doi.org/10.1099/00222615-26-4-241>

48. She RC, Litwin CM. Performance of a Tuberculosis Serologic Assay in Various Patient Populations. Am J Clin Pathol 2015, doi: <https://dx.doi.org/10.1309/AJCP22DBRYZQGRBI>

49. Oliveira GP, Torrens AW, Bartholomay P, Barreira D. Tuberculosis in Brazil: last ten years analysis – 2001–2010. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2013, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.01.005>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

50. Rodrigues NCP, Andrade MKN, O'Dwyer G, Flynn M, Braga JU, Almeida AS, Bastos LS, Lino VTS.
Distribution of pulmonary tuberculosis in Rio de Janeiro (Brazil): a spatial analysis. Cien Saude Colet 2017,
doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172212.0143016>.

51. Giusti G, Galanti B. Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim: VerlagChemie; 1984. p. 315.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

TABLES AND LEGENDS

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Distribution of individual humoral responses of (a) IgA and (b) IgG antibodies against MT10.3, MPT64, PPE59 and the MT10.3:MPT64 and the F2 fusion proteins, at different pleural fluid (PF) and serum dilutions from patients presenting pleural tuberculosis (PLTB) or other non-TB pleurisies (OPL)

Note: Short bars, mean ODs. ****, $p \leq 0.0001$; ***, $p \leq 0.0009$; **, $p \leq 0.001$; *, $p \leq 0.05$

Fig. 2 ROC curve of the IgA and IgG antibodies against MT10.3, MPT64, PPE59, and the MT10.3:MPT64 and the F2 fusion proteins, at different pleural fluid (PF) and serum dilutions from patients presenting pleural tuberculosis (PLTB) or other non-TB pleurisies (OPL)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

TABLES

Table 1 - Standardization and parameterization of antigen concentrations, samples and conjugate dilutions for IgA and IgG ELISA detection in pleural fluid (PF) and serum samples from patients presenting pleural tuberculosis (PLTB) and other non-TB pleuritis (OPL).

	IgA	IgG	Standardization
PPE59 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,5	1,0	Mulinari, 2016
Serum (dilution)	1:50 and 1:100	1:50 and 1:100	
Secondary antibody	1:2.500	1:10.000	
PPE59 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,0		present study
PF (dilution)	1:100	X	
Secondary antibody	1:5.000		
F2 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,5	1,5	Sardella <i>et al.</i> , 2014
Serum (dilution)	1:25 to 1:200	1:200 to 1:1600	
Secondary antibody	1:5.000	1:20.000	
F2 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,5		present study
PF (dilution)	1:50	X	
Secondary antibody	1:5.000		
MT10.3:MPT64 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,05	1,0	present study
Serum (dilution)	1:50	1:50	
Secondary antibody	1:2.500	1:10.000	
MT10.3:MPT64 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,5	1,0	Araújo <i>et al.</i> , 2010 (IgA); present study (IgG)
PF (dilution)	1:50 to 1:800	1:200	
Secondary antibody	1:5.000	1:10.000	
MT10.3 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,0	1,0	Silva <i>et al.</i> 2008
Serum (dilution)	1:50 a 1:400	1:400	
Secondary antibody	1:1.500	1:2.000	
MT10.3 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,0		Kaisermann <i>et al.</i> , 2005
PF (dilution)	1:100	X	
Secondary antibody	1:5.000		
MPT64 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,5	1,0	Silva <i>et al.</i> 2008
Serum (dilution)	1:50 a 1:400	1:400	
Secondary antibody	1:2.500	1:2.000	
MPT64 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,0		Kaisermann <i>et al.</i> , 2005
PF (dilution)	1:100	X	
Secondary antibody	1:5.000		

X: represent non-possible ELISA standardization parameters

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 2 – Clinical and socioeconomic data of participants presenting pleural tuberculosis (PLTB) and other, non-TB, pleural diseases (OPL).

Variables	PLTB n=29 (42.6%)	OPL n=39 (57.4%)
Age (mean ± SD)	43.07±16.59	62.5±18.63 *
< 50 years	22 (75.9)	10 (25.6)
> 50 years	7 (24.1)	29 (74.4)
<i>Gender</i>		
Male	21 (72.5)	21 (53.8)
<i>Ethnicity</i>		
White	6 (20.7)	18 (46.2)
Black	6 (20.7)	10 (25.6)
Pardo (Brown)	17 (55.2)	11 (28.2)
<i>BCG vaccination:</i>		
Positive (scar)	20 (55.2)	20(48.7)
No Information	1 (3.4)	5 (12.8)
<i>ADA (mean ± SD) ¹</i>	61.15±32.71 *	19.54±31.29
Positive	23 (79.3)	2 (5.1)
<i>PF AFB</i>		
Negative	28	35
No Information	1 (3.4)	4 (10.3)
<i>Pleural biopsy specimen AFB</i>		
Negative	6	4
No Information	23 (79.3)	35 (89.7)
<i>Culture (PF)</i>		
Positive	4 (13.8)	0
No Information	1 (3.4)	3 (7.7)
<i>Pleural biopsy specimen culture</i>		
Positive	1 (3.4)	0
No Information	24 (82.8)	36 (92.3)
<i>Cytopathology (PF)</i>		
Suggestive of TB	17 (58.6)	3 (7.7)
Nonspecific	0	0
No Information	4 (13.8)	6 (15.4)
<i>Histopathology of pleural biopsy</i>		
Suggestive of TB	9 (31)	0
Nonspecific	2 (6.9)	5 (12.8)
No Information	16 (55.2)	18 (46.2)
<i>Previous TB</i>		
Positive	2 (6.9)	2 (5.2)
No Information	0	2 (5.1)

32

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

<i>Other morbidity</i>		
Cancer	0	25 (64.1)
Heart failure	0	5 (12.8)
Renal failure	0	4 (10.2)
SLE	0	2 (5.1)
Hepatitis, Empyema, Chylothorax	0	3 (7.5)
<i>Previous TB treatment</i>		
Free	28 (96.6)	37 (94.8)
>1 month	3 (10.3)	2 (5.1)
<i>Human immunodeficiency virus (HIV) status</i>		
Positive	1 (3.4)	2 (5.1)
No Information	5 (17.3)	14 (35.9)

* p<0.05. SD - Standard Deviation.¹ ADA – adenosine deaminase *cutoff of > 40 U/L*, PLTB: pleural tuberculosis patients; OPL: patients presenting other, non-TB, pleural diseases. SLE: Systemic lupus erythematosus. Note: In Brazil, pardo (brown) means a mixture of European, Black and Amerindian ethnicities.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 3 – ELISA validity parameters for the detection of IgA and IgG antibodies against mycobacterial antigens MT10.3, MPT64, PPE59, and the MT10.3:MPT64 and the F2 fusion proteins, at different pleural fluid (PF) and serum dilutions.

ELISA tests (samples dilutions)	PL-TB (n=29)	OPL (n=39)	p valor [†]	Cut off	AUC	Sensitivity (%) (Number +)	Specificity (%) (Number-)
	Mean ± SD	Mean ± SD					
IgA-(PF)							
MT10.3 (1:100)	0.983 ± 0.336	0.548 ± 0.321	*	1.278	0.852	20.7 (6)	95 (37)
MPT64 (1:100)	1.164 ± 0.350	0.606 ± 0.352	*	1.505	0.887	24.1 (7)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:50)	0.821 ± 0.213	0.387±0.188	*	0.658	0.949	86.2 (25)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:100)	0.667 ± 0.195	0.302±0.138	*	0.598	0.950	65.5 (19)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:200)	0.542 ± 0.154	0.232±0.093	*	0.385	0.968	86.2 (25)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:400)	0.433 ± 0.126	0.185±0.060	*	0.315	0.980	82.8(24)	95 (37)
MT10.3-MPT64 (1:800)	0.323 ± 0.125	0.209±0.094	*	0.404	0.823	27.6 (8)	95 (37)
PPE59 (1:100)	0.696 ± 0.186	0.392 ± 0.155	*	0.639	0.904	62.1 (18)	95 (37)
F2 (1:50)	0.553 ± 0.230	0.351 ± 0.212	*	0.542	0.774	44.8 (13)	95 (37)
IgA-(serum)							
MT10.3 (1:50)	0.996 ± 0.282	0.865 ± 0.279	0.081	1.282	0.625	20.7 (6)	95 (37)
MT10.3 (1:100)	0.888 ± 0.281	0.714 ± 0.228	0.012	1.018	0.678	27.6 (8)	95 (37)
MT10.3 (1:200)	0.760 ± 0.263	0.634 ± 0.209	0.057	0.962	0.636	13.8 (4)	95 (37)
MT10.3 (1:400)	0.622 ± 0.216	0.528 ± 0.172	0.130	0.799	0.608	13.8 (4)	95 (37)
MPT64 (1:50)	1.109 ± 0.341	0.843 ± 0.371	0.003	1.462	0.708	20.7 (6)	95 (37)
MPT64 (1:100)	1.045 ± 0.323	0.757 ± 0.308	*	1.220	0.729	27.6 (8)	95 (37)
MPT64 (1:200)	0.959 ± 0.347	0.693 ± 0.258	0.002	1.048	0.717	34.5 (10)	95 (37)
MPT64 (1:400)	0.860 ± 0.338	0.630 ± 0.231	0.006	1.012	0.695	27.6 (8)	95 (37)
MT10.3:MPT64 (1:50)	1.176 ± 0.338	0.621±0.282	*	1.267	0.905	44.8 (13)	95 (37)
PPE59 (1:50)	0.868 ± 0.204	0.706 ± 0.206	*	1.042	0.736	13.8 (4)	95 (37)
PPE59 (1:100)	0.841 ± 0.189	0.663 ± 0.190	*	1.043	0.785	13.8 (4)	95 (37)
F2 (1:25)	0.963 ± 0.304	0.624±0.195	*	0.957	0.837	51.7 (15)	95 (37)
F2 (1:50)	0.810 ± 0.271	0.507±0.165	*	0.772	0.844	51.7 (15)	95 (37)
F2 (1:100)	0.698 ± 0.282	0.414±0.134	*	0.670	0.847	48.3 (14)	95 (37)
F2 (1:200)	0.619 ± 0.252	0.443±0.188	*	0.591	0.879	44.8 (13)	95 (37)
IgG-(PF)							
MT10.3-MPT64 (1:200)	0.840 ± 0.352	0.347±0.126	*	0.616	0.952	65.5 (19)	95 (37)
IgG-(serum)							
MT10.3:MPT64 (1:50)	0.863 ±0.196	0.636±0.195	*	0.891	0.809	51.7 (15)	95 (37)
MT10.3 (1:400)	1.409 ± 0.218	1.190 ± 0.261	*	1.641	0.739	17.2 (5)	95 (37)
MPT64 (1:400)	1.256 ± 0.201	1.173 ± 0.213	0.129	1.490	0.609	10.3 (3)	95 (37)
PPE59 (1:50)	0.918 ± 0.252	0.789 ± 0.327	0.204	1.370	0.591	3.4 (1)	95 (37)
PPE59 (1:100)	0.898 ± 0.346	0.709 ± 0.279	0.003	1.181	0.711	17.2 (5)	95 (37)
F2 (1:200)	0.604 ± 0.319	0.499 ± 0.313	0.087	1.084	0.622	6.9 (2)	95 (37)
F2 (1:400)	0.467 ± 0.267	0.387 ± 0.232	0.127	0.787	0.609	10.3 (3)	95 (37)
F2 (1:800)	0.369 ± 0.180	0.289 ± 0.161	0.024	0.552	0.660	13.8 (4)	95 (37)
F2 (1:1600)	0.271 ± 0.127	0.223 ± 0.123	0.031	0.427	0.663	10.3 (3)	95 (37)

IgA and IgG mean level results in optical density and their standard deviations (SD). [†] Significant difference of IgA/IgG production between groups and between tested antigen were calculated by the Mann Whitney test (p<0.001*). PLTB: pleural tuberculosis patients; OPL: patients with other, non-TB, pleural diseases; AUC: area under the curve

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 4 –Sensitivity (S) and specificity (Sp) of the combinatory results of IgA and/or IgG-MT10.3:MPT64 with PPE59, MT10.3, MPT64 and F2, in pleural fluid and serum of pleural tuberculosis patients (PLTB) and other non-TB pleurisies (OPL) at different dilutions.

MT10.3:MPT64 Combination results (sample dilutions)	PLTB (N=29) N. Positive S (%)	OPL (N=39) N. Negative Sp (%)
Pleural Fluid IgA		
(1:50) / PPE59 (1:100)	27 (93.1)	36 (92.3)
(1:100)/ PPE59 (1: 100)	24 (82.7)	37 (94.8)
(1:200) / PPE59 (1:100); (1:50) / MPT64 (1:100); (1:50) / F2 (1:50)	26 (89.6)	37 (94.8)
(1:400)/ PPE59 (1:100); (1:50) or /(1:200) or/(1:400) / MT10.3 (1:100)	26 (89.6)	36 (92.3)
(1:800) / PPE59 (1:100); (1:100) / MT10.3 (1:100)	21 (72.4)	36 (92.3)
(1:800) / MT10.3 (1:100)	12 (41.3)	35 (89.7)
(1:100) / MPT64 (1:100)	20 (68.9)	36 (92.3)
(1:200) / MPT64 (1:100) or / F2 (1:50) or / MT10.3:MPT64.serum1.50	25 (86.2)	36 (92.3)
(1:400) / MPT64 (1:100) or / F2 (1:50)	24 (82.7)	36 (92.3)
(1:800) / MPT64 (1:100)	14 (48.2)	35 (89.7)
(1:100) / F2 (1:50)	22 (75.8)	36 (92.3)
(1:800) / F2 (1:50)	18 (62)	35 (89.7)
(1:50) / MT10.3-MPT64.serum1.50	26 (93.1)	35 (89.7)
(1:1000) / MT10.3-MPT64.serum1.50	19 (65.5)	36 (92.3)
(1:400) / MT10.3:MPT64.serum1.50	25 (86.2)	35 (89.7)
(1:800) / MT10.3:MPT64.serum1.50	15 (51.7)	36 (92.3)
Serum IgA		
(1.50) / PPE59 (1.50 or 1:100) or / MPT64 (1:400)	13 (44.8)	35 (89.7)
(1.50) / MT10.3 (1:50 or 1:100 or 1:200); or / MPT64 (1:100)	14 (48.2)	35 (89.7)
(1.50) / MT10.3 (1:400)	15 (51.7)	35 (89.7)
(1.50) / MPT64 (1:50)	13 (44.8)	36 (92.3)
(1.50) / MPT64 (1:200)	14 (48.2)	36 (92.3)
(1.50) / F2 (1:25)	20 (68.9)	35 (89.7)
(1.50) / F2 (1:50 or 1:100)	19 (65.5)	35 (89.7)
(1.50) / F2 (1:200)	17 (58.6)	35 (89.7)
Serum IgG		
(1:50) / MT10.3-MPT64 (1:200)	21 (72.4)	35 (89.7)
(1:50) / PPE59 (1:50) or / F2 (1:200)	15 (51.7)	35 (89.7)
(1:50) / PPE59 (1:100) or / MPT64 (1:400)	16 (55.1)	35 (89.7)
(1:50) / MT10.3 (1:400)	18 (62)	35 (89.7)
(1:50) / F2 (1:400)	15 (51.7)	36 (92.3)
(1:50) / F2 (1:800 or 1:1600)	16 (55.1)	36 (92.3)
Pleural Fluid IgA/IgG		
(1:50)/ MT10.3:MPT64 (1:200)	27 (93.1)	36 (92.3)
(1:100)/MT10.3-MPT64 (1:200)	24 (82.7)	35 (89.7)

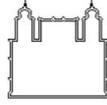
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(1:200)/ MT10.3-MPT64 (1:200)	27 (93.1)	35 (89.7)
(1:400)/ MT10.3-MPT64 (1:200)	28 (96.5)	35 (89.7)
(1:800)/ MT10.3-MPT64 (1:200)	21 (72.4)	35 (89.7)
Serum - IgA		
(1:50) / IgG-MT10.3:MPT64 (1:50)	22 (75.9)	35 (89.7)

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 5. The best ELISA results compared with conventional microbiological, histopathological and adenosine d-aminase (ADA) tests determined in pleural fluid (PF) and/or pleural biopsy (PB) samples for tuberculous pleural infection (PLTB) diagnosis.

Diagnostic tests	Number (%)	PLTB (n=29)								Number (%)	OPL (n=39)													
		ELISA MT10.3:MPT64 (Number of positive %)									ELISA MT10.3:MPT64 (Number of positive %)													
		IgA				IgG					IgA				IgG									
PF (1:50) ¹	Serum (1:50) ¹	Combinatory with MPT64 ²	Combinatory with F2 ²	PF (1:200) ¹	Serum (1:50) ¹	PF (1:50) ¹	Serum (1:50) ¹	PF (1:50) ¹	Serum (1:50) ¹	Combinatory with MPT64 ²	Combinatory with F2 ²	PF (1:200) ¹	Serum (1:50) ¹											
ADA PF																								
Positive	23 (79.3)	20	86.2	12	44.8	21	89.6	21	89.6	17	65.5	12	3	51.7	2	5.1	1	5.1	1	5.1	0	5.1	0	5.1
Negative	6 (20.7)	5		1		5		5		2		3		51.7	37	(94.9)	2		1		2		2	
AEB PF																								
Positive	0	0		0		0		0		0		0		51.7	0		0		0		0		0	
Negative	28 (96.6)	24	86.2	12	44.8	25	89.6	25	89.6	19	65.5	15	3	51.7	35	(100)	2	7.6	2	5.1	2	5.1	2	5.1
No Information	1 (3.4)	1		1		1		1		0		0		51.7	4	(10.3)	1		0		0		0	
Pleural biopsy AEB																								
Positive	0	0		0		0		0		0		0		51.7	0		0		0		0		0	
Negative	6 (100)	6	86.2	4	44.8	6	89.6	6	89.6	4	65.5	3	3	51.7	4	(100)	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1
No Information	23 (79.3)	19		9		20		20		15		12		51.7	35	(89.7)	2		2		2		2	
Culture (PF)																								
Positive	4 (14.3)	3		2		3		3		3		2		51.7	0		0		0		0		0	
Negative	24 (85.7)	21	86.2	10	44.8	22	86.2	22	86.2	16	65.5	13	3	51.7	36	(100)	1	5.1	2	5.1	2	5.1	2	5.1
No Information	1 (3.4)	1		1		1		1		0		0		51.7	3	(7.7)	1		0		0		0	
Pleural biopsy specimen culture																								
Positive	1 (25)	1		0		1		1		1		1		58.6	0		0		0		0		0	
Negative	4 (80)	4	86.2	3	44.8	4	86.2	4	86.2	2	55.2	1	4	58.6	3	(100)	0	5.1	0	5.1	0	5.1	0	5.1
No Information	24 (82.8)	20		10		21		21		13		16		58.6	36	(92.3)	2		2		2		2	
Pleural biopsy																								

[Click here to view linked References](#)1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz**Cover Letter**

Rio de Janeiro, November 18, 2018.

Dear Editor,

Please find enclosed herewith a research paper to be considered for publication in the "CMB Immunology", as a "Research article" entitled: "IgA and IgG antibody detection of mycobacterial antigens in pleural fluid and serum from pleural tuberculous patients" authoring: 1) Renan Jeremias da Silva, 2) Raquel da Silva Corrêa, 3) Isabela Gama Sardella, 4) Ana Carla de Paulo Mulinari, 5) Thiago Thomaz Mafort, 6) Ana Paula Santos, 7) Rogério Rufino, 8) Luciana Silva Rodrigues and 9) Maria Helena Féres Saad. We confirm that this work is original and has not been published elsewhere, nor is it currently under consideration for publication elsewhere.

The serious tuberculosis (TB) situation in the world is reflected in the high annual mortality rates. TB control depends on rapid patient diagnosis and prompt treatment. Among extrapulmonary forms, pleural TB (TBPL) is the most frequent, and clinicians face poor accuracy and availability diagnostic tests. Investigations on new markers and biomarkers to aid in the rapid diagnosis of TB are required. Thus, our goal was investigated potential PLTB biomarkers, validating and/or evaluating the accuracy of dosing IgA and IgG, against mycobacterial single Ags MT10.3, MPT64 and PPE59, fusion proteins, such as MT10.3:MPT64 and the novel F2, in PF and serum samples of the same patients presenting PLTB and others presenting non-TB pleurisy.

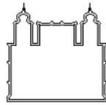
The ELISA proposed in this study with different antigens, based on antibody recognition of body fluids of relative invasive power, PF and serum, demonstrated:

- i) high sensitivity and specificity in TBPL diagnosis.
- i) The PF IgA-MT10:MPT64 immune dominance was validated in PLTB, and its combinatory results with PPE59 or MPT64 or F2 antigens as well as with IgG, are reported herein for the first time, improving their potential to assist diagnosis,
- ii) Combining PF-ADA and IgA-MT10.3:MPT64/-F2 results achieved better accuracy.
- lii) Moreover, serum IgG, although less accurate, displays potential beyond microbiological tests.

As ELISA test can be formatted as a point of care test, the proposed antibody-based test is promising to aid clinical practice.

Last, despite to be a small-scale study, the data are enlightening, and deserve to be shared as support for future investigations, evaluating immune response in TBPL for different mycobacterial antigens and in the search for new TB biomarkers with value for immune diagnosis.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

We also declare that there is none conflict of interest, the study was approved by the Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE/UERJ Ethics Committee, number: 1.100.772, and all of the authors had made significant contributions and are responsible for the manuscript contents. I accept all the terms and conditions displayed in MMI journal site to the best of my knowledge.

First author: Renan Jeremias da Silva;

Renan Jeremias da Silva;

Address: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Microbiologia Celular, Pavilhão Hanseníase S.12/14.

Av. Brasil, 4365 - 20245-900 - Rio de Janeiro - Brazil. Telephone +55 21 2562-1598. E-mail: renanjeremias@gmail.com

Corresponding author: Maria Helena F. Saad;

Address: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Microbiologia Celular, Pavilhão Hanseníase S.12/14.

Av. Brasil, 4365 - 20245-900 - Rio de Janeiro – Brasil. Telephone: +55.21.25621598. E-mail: saad@ioc.fiocruz.br ou maria.saad03@gmail.com

Sincerely yours,

Maria Helena Féres Saad

Figure 1

[Click here to download Figure BMC-figure1.tif](#)

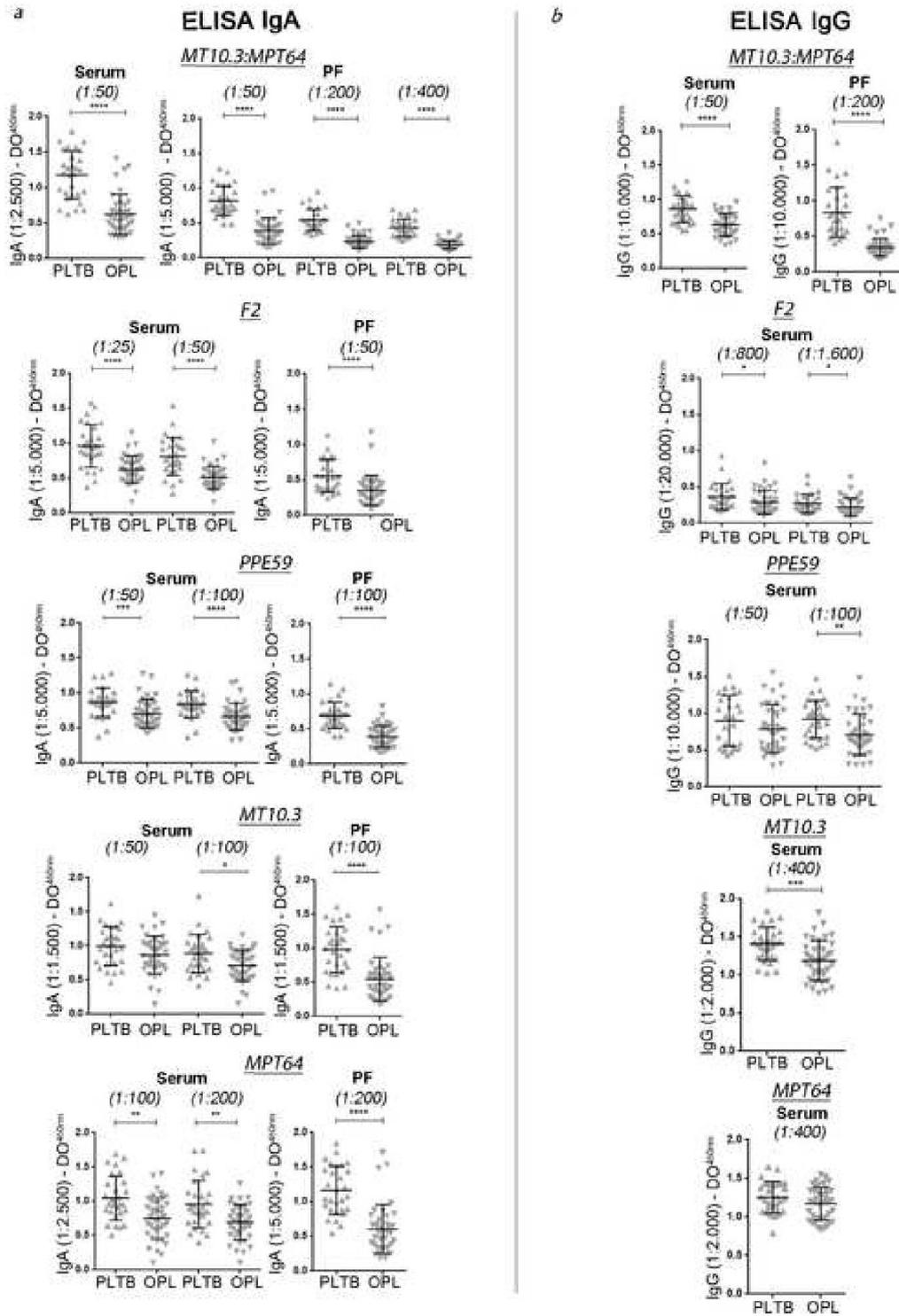
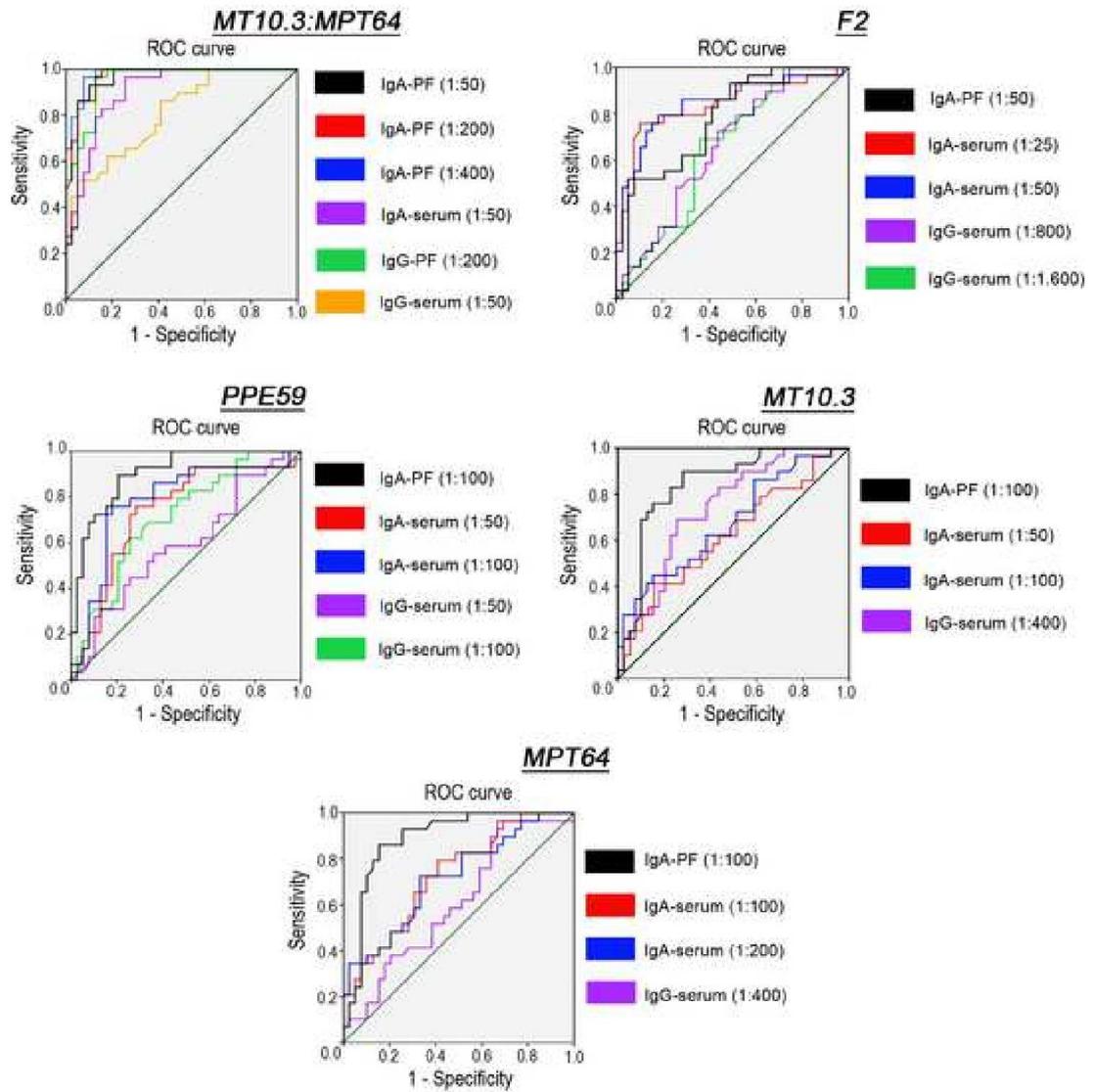


Figure 2

[Click here to download Figure BMC-figure2.tif](#)



10 ANEXO 1: PARECER DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Busca de novos marcadores para o diagnóstico da Tuberculose Pleural

Pesquisador: Luciana Silva Rodrigues

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45780115.6.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.100.772

Data da Relatoria: 10/06/2015

Apresentação do Projeto:

A tuberculose (TB) é a principal causa de morte em adultos, por doença infecciosa única, nos países em desenvolvimento. Seu agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) infecta um terço da humanidade e são diagnosticados anualmente cerca de 9 milhões de novos casos de TB, com um milhão e meio de mortes em todo o mundo (Organização Mundial da Saúde, 2014). A TB Pleural é a manifestação extrapulmonar mais frequente da TB no adulto. Atualmente, há uma grande dificuldade no diagnóstico da doença devido à confirmação bacteriológica estar somente presente em apenas um quarto dos casos. Esta dificuldade é caracterizada pela maioria dos casos serem paucibacilares, sendo a positividade da baciloscopia em líquido pleural variando de 0 a 5% e a positividade cultura do tecido em torno de 40% (Gopi et al., 2006). Além das análises microbiológicas e histológicas, níveis superiores a 40UI/L de adenosina deaminase (ADA) no líquido pleural são fortemente sugestivos de TB Pleural (Sharma et al., 2005). No entanto, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos constitui uma necessidade premente, uma vez que

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

Continuação do Parecer: 1.100.772

os resultados da análise do líquido pleural, atualmente empregadas, raramente confirmam o diagnóstico de TB Pleural – visto que uma neoplasia, por exemplo, também pode causar um derrame pleural exsudativo com predominância de linfócitos e atividade aumentada de ADA. Além disso, cabe salientar que atrasos no diagnóstico e, por conseguinte, no início da terapia estão associados à mortalidade elevada. O presente estudo se propõe a utilizar uma série de estratégias altamente inovadoras, como a transcriptômica, metabolômica, proteômica quantitativa e citometria de fluxo multiparamétrica na busca de novos biomarcadores que auxiliem não apenas para o diagnóstico da TB Pleural, como também no controle da doença em nosso país.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar biomarcadores circulantes e no líquido pleural capazes de auxiliar no diagnóstico diferencial da TB Pleural, bem como buscar indicadores pró-fibróticos e do grau de severidade da doença.

Objetivo Secundário:

Traçar a composição metabólica, assim como o perfil proteômico do líquido pleural de pacientes com TB Pleural e com outros diagnósticos exsudativos. Correlacionar estes dados aos achados clínicos, radiológicos e laboratoriais de forma a definir biomarcadores que possibilitem o diagnóstico diferencial de TB Pleural. Pretendemos, ainda, identificar e caracterizar funcionalmente subpopulações leucocitárias M. tuberculosis específica no líquido pleural. E, finalmente, comparar os níveis de marcadores pró-fibróticos em sangue periférico e líquido pleural com dados radiológicos, clínicos e histopatológicos no diagnóstico da TB pleural.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos potenciais conhecidos são aqueles pertinentes ao procedimento de punção torácica e biópsia pleural realizados como ferramenta diagnóstica, descritos no termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), bem como no termo de responsabilidade apresentado aos pacientes.

Estes procedimentos são realizados como rotina no ambulatório para o diagnóstico das doenças com derrame pleural e conta com uma equipe de médicos e enfermeiros capacitados e bem treinados. As amostras coletadas serão manipuladas em

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.100.772

cabine de segurança biológica classe II B2 e a equipe utilizará equipamentos de proteção individual adequados, não oferecendo riscos aos profissionais. Benefícios: A identificação de novos alvos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de métodos diagnósticos que diferenciem a TB Pleural de outras patologias com derrame pleural exsudativo, podem impactar de maneira significativa a assistência primária aos pacientes com TB, permitindo acesso rápido à terapia vigente, diminuição do número de óbitos e contribuindo para a interrupção da cadeia de transmissão da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos os dados necessários para apreciação ética. Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos eminentes ao participante de pesquisa envolvido.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O trabalho pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.100.772

a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais e anuais referentes ao andamento da pesquisa ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 10 de Junho de 2015

Assinado por:
MICHELLE QUARTI MACHADO DA ROSA
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

Página 04 de 04