

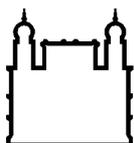
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**OBTENÇÃO DA PROTEÍNA CODIFICADA PELO GENE *RV3429* DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNE  
HUMORAL**

**ANA CARLA DE PAULO MULINARI**

Rio de Janeiro  
Junho de 2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

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

*Ana Carla de Paulo Mulinari*

Obtenção da proteína codificada pelo gene *rv3429* de *Mycobacterium tuberculosis* e avaliação da reatividade imune humoral

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

**Orientadora:** Prof. Dr. Maria Helena Féres Saad

**Co-orientadora:** Dr<sup>a</sup> Isabela Gama Sardella

**RIO DE JANEIRO**

Junho de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M957 Mulinari, Ana Carla de Paulo

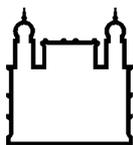
Obtenção da proteína codificada pelo gene *RV3429* de  
*Mycobacterium tuberculosis* e avaliação da reatividade imune humoral /  
Ana Carla de Paulo Mulinari. – Rio de Janeiro, 2016.  
xvii, 80 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Medicina Tropical, 2016.

Bibliografia: f. 71-80

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. PPE59. 3. Imunodiagnóstico. I.  
Título.

CDD 616.9294



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

***AUTOR: ANA CARLA DE PAULO MULINARI***

**Obtenção da proteína codificada pelo gene *rv3429* de *Mycobacterium tuberculosis* e  
avaliação da reatividade imune humoral**

**ORIENTADORA: Prof. Dr. Maria Helena Féres Saad**

**CO- ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Isabella Gama Sardella**

**Aprovada em: 29/06/2016**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Roberta Olmo Pinheiro - Presidente (LAHAN/IOC/FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Fernanda Carvalho Queiroz Mello (Instituto de Doenças do Tórax/UFRJ)**

**Prof. Dr. Anna Cristina Calçada Carvalho (LITEB/IOC/FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas (LIC/IOC/FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Amanda Nogueira Brum Fontes (LBMAM/IOC/FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 29 de junho de 2016.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

## DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que Ana Carla de Paulo Mulinari, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Féres Saad e coorientada pela Dr<sup>a</sup>. Isabela Gama Sardella, foi aprovada em 29/06/2016, em sua defesa de dissertação de mestrado intitulada: “**Obtenção da proteína codificada pelo gene rv3429 de *Mycobacterium tuberculosis* e avaliação da reatividade imune humoral**”, área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr<sup>a</sup>. Anna Cristina Calçada Carvalho - IOC/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Fernanda Carvalho de Queiroz Mello - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr. Paulo Renato Zuquim Antas - IOC/FIOCRUZ Dr<sup>a</sup>. Amanda Nogueira Brum Fontes - IOC/FIOCRUZ.

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 5 (cinco) 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, 29 de junho de 2016.

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-1924/16 no livro nº I, folha 29 em 29/06/2016.

Dedico este trabalho a todos os jovens cientistas do Brasil, que entre tantas dificuldades ainda permanecem lutando pelo desenvolvimento científico do país.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Agradeço especialmente a Isabela Gama Sardella pela imensa ajuda que me ofertou ao longo do meu desenvolvimento acadêmico. Nossa parceria iniciou dentro do laboratório e estendeu-se para fora dele. Nós não temos apenas um vínculo de trabalho ou estudos, criamos um laço de amizade que pretendo levar por muitos anos. Não existem palavras suficientes que consigam agradecer o quanto me ajudou. Muito obrigada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus queridos pais que nunca me deixaram pensar em desistir, sempre me passaram força e sempre estavam ao meu lado dizendo que eu era capaz.

Agradeço a minha orientadora Dra. Maria Helena Saad. Seus ensinamentos foram cruciais para o meu desenvolvimento acadêmico. Agradeço as horas dedicadas na elaboração do meu trabalho e a paciência ofertada ao longo dessa jornada.

Agradeço ao meu namorado Renato Vasconcellos do Monte que sempre acreditou na minha capacidade e esteve ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço aos meus companheiros e equipe do Laboratório de Microbiologia Celular, Nidai de Barbara Moreira Lins, Leonardo Araújo, Pedro Henrique, Carol Macaíba, Marisa Signorelli, Renan Jeremias, Adolfo Barreto e Silvia Maria, que sempre estavam dispostos a ajudar.

Agradeço aos meus amigos que me acompanham desde a faculdade: Jessica Oliveira, Rayane Ferreira, Monique Souza e Bruno Souza. Estavam ao meu lado em mais um desafio e foram essenciais nos momentos de descontração.

Agradeço ao Instituto Oswaldo Cruz e a CAPES por disponibilizarem infraestrutura e financiarem o desenvolvimento e a realização deste trabalho.

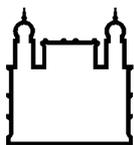
Agradeço a Pós-Graduação em Medicina Tropical e toda sua equipe por proporcionar um ambiente saudável para que os alunos consigam desenvolver seus projetos.

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

Obrigada!

**“Educação não transforma o mundo.  
Educação muda as pessoas. Pessoas  
transformam o mundo.”**

**Paulo Freire**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

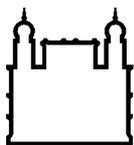
### Obtenção da proteína codificada pelo gene *rv3429* de *Mycobacterium tuberculosis* e avaliação da reatividade imune humoral

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

**Ana Carla de Paulo Mulinari**

Introdução: A demora no diagnóstico da tuberculose (TB) é um importante fator para a manutenção desta endemia. Estudos recentes têm demonstrado que a família de proteínas PE/PPE tem importante papel na patogênese, virulência e evasão de *M. tuberculosis*, agente etiológico da TB, durante a infecção e, essas duas famílias, são também responsáveis por induzir resposta imune humoral e celular. O gene *rv3429* codifica a proteína PPE59, que ainda não foi explorada quanto a sua capacidade de ser reconhecida por anticorpos do soro de pacientes com TB. Assim, este estudo tem por objetivos expressar a proteína PPE59 e avaliar sua imunorreatividade em populações de áreas geográficas diferentes. Metodologia: O sistema de expressão gênica foi o heterólogo *Escherichia coli* (Dh5 $\alpha$ ). A avaliação da imunorreatividade foi realizada por técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para IgA e IgG em pacientes com TB pulmonar provenientes do Brasil (TBpul<sup>BR</sup>), bem como em pacientes com TB pulmonar (TBpul<sup>IT</sup>) e extrapulmonar (TBExp<sup>IT</sup>) imigrados na Itália. Resultados: PPE59 foi expressa com sucesso e sem a presença de corpos de inclusão, que favorece melhor rendimento e estabilidade da proteína expressa. Foram utilizados neste estudo, 202 indivíduos. 123 brasileiros e 79 imigrantes na Itália. Os resultados do ELISA, expressos em medianas, foram mais elevados entre os brasileiros, do que entre os imigrantes, porém com diferença significativa apenas para IgG, quando foram comparadas as diferentes áreas geográficas. A análise de reatividade demonstrou ser a IgA mais sensível (53 % e 38 %) do que a IgG (26 % e 4 %) para a população do Brasil e Itália, respectivamente, e mais específica para as Ig (97 % e 86 %), respectivamente. O grupo TBExp<sup>IT</sup>, mostrou as menores sensibilidades (IgA: 28% e IgG: 0%). A análise bi e multivariada associou a positividade de IgA em TBpul<sup>BR</sup> com alcoolismo, imagem de Raio-X de tórax com alta probabilidade de TB e o sexo masculino ( $p < 0,04$ ). Conclusões: Foi possível estabelecer um protocolo de expressão heteróloga para a proteína PPE59 sem a presença de corpos de inclusão. PPE59 mostrou imunodominância para IgA. Devido à alta especificidade da PPE59 sua combinação com outros antígenos específicos pode levar a um imunoteste de maior sensibilidade.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Obtaining the protein encoded by *Mycobacterium tuberculosis* rv3429 gene and evaluation of the humoral immune reactivity**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL**

**Ana Carla de Paulo Mulinari**

**Introduction:** The delay in the diagnosis of tuberculosis (TB) is an important factor for the maintenance of this endemic disease. Recent studies have shown that the family of PE / PPE protein plays an important role in the pathogenesis, virulence and avoidance of *M. tuberculosis*, the etiologic agent of TB during infection, these two families are also responsible for inducing humoral and cellular immune response. The rv3429 gene encoding the protein PPE59, which has not yet been explored for their ability to be recognized by serum antibodies from patients with TB. This study aims to express the protein PPE59 and evaluate its immunoreactivity in populations of different geographical areas. **Methods:** The gene expression system was the heterologous *E. coli* (Dh5 $\alpha$ ). The evaluation of immunoreactivity was performed by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) IgA and IgG in patients with pulmonary TB from Brazil (TBpul<sup>BR</sup>) as well as in patients with TB pulmonary (TBpul<sup>IT</sup>) and extrapulmonary (TBExp<sup>IT</sup>) from Italy. **Results:** PPE59 was successfully expressed and without the presence of inclusion bodies, which favors better yield and stability of the expressed protein. They were used in this study, 202 individuals. 123 Brazilian and 79 from Italy. EIA results, expressed as medians were higher among Brazilians, of the you come from Italy, but with a significant difference only for IgG, when the different geographical areas were compared. The reactivity analysis proved to be the more sensitive and specific IgA (53 % e 38 %) than IgG (26 % e 4 %) for the population of Brazil and Italy, respectively, and more specific for Ig (97% and 86%), respectively. The group TBExp<sup>IT</sup> from Italy, showed the lowest sensitivities (IgA: IgG 28% and 0%). The bivariate and multivariate analysis associated IgA positivity among TBpul<sup>BR</sup> with alcoholism, X-ray image of the chest with a high probability of TB and males ( $p < 0.04$ ). **Conclusions:** It was possible to establish a heterologous expression protocol for PPE59 protein without the presence of inclusion bodies. PPE59 showed immunodominance IgA. Due to the high specificity of PPE59 its combination with other specific antigens may lead to an immunoassay of enhanced sensitivity.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>2</b>
História da Tuberculose .....	2
História da Tuberculose no Brasil.....	3
Evolução de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	4
Características Gerais de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
Patogenia e Imunopatologia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	8
Epidemiologia.....	12
Programas de controle da tuberculose.....	14
Diagnóstico da tuberculose.....	15
Testes imunoenzimáticos como ferramenta de diagnóstico para tuberculose.....	18
Proteínas da Família PE/PPE.....	18
Justificativa.....	23
<b>2 Objetivos</b>	<b>24</b>
Objetivo Geral.....	24
Objetivos Específicos .....	24
<b>3 Material e Métodos</b>	<b>25</b>
Tipo de estudo.....	25
Expressão e purificação da proteína.....	25
Expressão da proteína PPE59 por indução de IPTG.....	25
Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).....	26
Western Blot.....	26
Cultivo do clone de <i>E.coli</i> Dh5 $\alpha$ para a purificação da proteína PPE59.....	27
Lise Bacteriana de <i>E.coli</i> Dh5 $\alpha$ em condições desnaturantes.....	27
Purificação da proteína recombinante através da cromatografia de resina de níquel.....	28

	Diálise da proteína recombinante purificada.....	28
	Quantificação da proteína recombinante.....	29
	Caracterização da imunorreatividade da proteína.....	29
	Considerações éticas.....	29
	População de estudo.....	30
	Padronização do ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) <i>in house</i> .....	31
	Análises estatísticas.....	32
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>34</b>
	Expressão da proteína recombinante PPE59 .....	34
	Avaliação da imunorreatividade da proteína PPE59.....	35
	Características da população de estudo cujos soros foram avaliados.....	35
	Padronização do ELISA ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ) <i>in house</i> .....	38
	Avaliação da imunorreatividade da proteína recombinante PPE59 com soros individualizados.....	39
	Avaliação da imunorreatividade da proteína recombinante PPE59 de acordo com as características demográficas e clínicas da população de estudo.....	44
	Avaliação da positividade da proteína recombinante PPE59 para os isotipos IgA e IgG.....	51
	Análises de correlação com o grupo TBpul <sup>BR</sup> para IgA e IgG.....	59
	Combinação dos resultados de ELISA-PPE59 com os de outros antígenos previamente estudados e publicados usando a mesma população brasileira.....	62
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Pespectivas futuras</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema da via evolucionária proposta para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , ilustrando as perdas de DNA em certas linhagens.....	6
<b>Figura 2:</b> Estrutura da parede celular das micobactérias.....	7
<b>Figura 3:</b> Os mecanismos pelos quais as células B formam a resposta imune a <i>M. tuberculosis</i> .....	11
<b>Figura 4:</b> Taxa de incidência estimada para TB em 2013.....	13
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da estrutura dos genes de membros das famílias PE e PPE.....	20
<b>Figura 6:</b> Fluxograma dos grupos de estudos analisados no presente estudo.....	31
<b>Figura 7:</b> Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose do fragmento Rv3429 amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase).....	34
<b>Figura 8:</b> Western Blot da proteína PPE 59 (Rv3429) após processo de purificação em condições desnaturantes.....	35
<b>Figura 9:</b> Resultados da padronização da proteína recombinante PPE 59 utilizando pools de indivíduos com tuberculose pulmonar (TB) e controles (PPD+ e PPD-, respectivamente).....	38
<b>Figura 10:</b> Distribuição da reatividade dos soros de pacientes com TB pulmonar do Brasil e Itália (TBpul <sup>BR/IT</sup> ) e extrapulmonar da Itália (TBExp <sup>IT</sup> ), pacientes com outros agravos respiratórios (OAR) e indivíduos sadios (S) em ensaios de ELISA IgA e IgG para o antígeno PPE-59.....	41/42
<b>Figura 11:</b> Distribuição da reatividade dos soros de pacientes com TB pulmonar do Brasil e Itália (TBpulBR/IT) e extrapulmonar da Itália (TBExpIT) com baciloscopia positiva (+) e negativa (-) para IgA (A) e IgG (B).....	42
<b>Figura 12:</b> Box plot dos resultados dos ensaios ELISA IgA-PPE59 e IgG-PPE59 para os grupos de pacientes com TB pulmonar do Brasil e Itália (TBpul <sup>BR/IT</sup> ), subdivido de acordo com a região de origem (África, Ásia ou Europa).....	43
<b>Figura 13:</b> <i>Receiver-operator characteristicis</i> (ROC) para ELISA-IgA e IgG PPE59 para identificação de melhor sensibilidade e especificidade.....	50
<b>Figura 14:</b> Análise de correlação utilizando o grupo de pacientes brasileiros com tuberculose pulmonar (TBpulBR) a partir dos resultados de densidade óptica obtidos no ELISA-PPE59 para IgA e IgG.....	58

**Figura 15:** Análise de correlação utilizando os pacientes com tuberculose pulmonar do Brasil e Itália (TBpulBR e TBpulIT) a partir dos resultados de densidade óptica obtidos no ELISA-PPE59 para IgA e IgG.....59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características de algumas proteínas da família PPE caracterizadas e estudadas na literatura até o momento.....	21
<b>Tabela 2:</b> Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos 202 indivíduos incluídos no estudo.....	37
<b>Tabela 3:</b> Condições definidas na padronização do ELISA-PPE59 para determinação da imunorreatividade da proteína PPE59.....	39
<b>Tabela 4:</b> Medianas das reatividades obtidas no teste de ELISA-IgA e IgG para a proteína PPE59.....	40/41
<b>Tabela 5:</b> Análise de reatividade de ELISA-IgA e IgG PPE59, expresso em média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ), para as características demográfica dos 202 indivíduos do estudo..	45
<b>Tabela 6:</b> Análise multivariada por regressão linear para as variáveis clínicas e demográficas da população de estudo para as reatividades de ELISA-IgA e IgG para o antígeno PPE59.....	46
<b>Tabela 7:</b> Sensibilidade e especificidade do de resposta imune humoral por ELISA-IgA e IgG PPE59 em pacientes com tuberculose pulmonar do Brasil e imigrantes na Itália ( $TB_{pul}^{BR/IT}$ e $TB_{Exp}^{IT}$ ) e de indivíduos controles.....	50
<b>Tabela 8:</b> Positividade encontrada para ELISA-PPE59 IgA e IgG utilizando os indivíduos com TB pulmonar de acordo com sua localidade de origem.....	51
<b>Tabela 9:</b> Positividade no ELISA PPE-59 para IgA e IgG em relação as variáveis clínicas, demográficas e laboratoriais do estudo.....	52/53
<b>Tabela 10:</b> Análise bivariada e multivariada por regressão linear entre a população de estudo.....	55/56/57/58
<b>Tabela 11:</b> Sensibilidade e especificidade do ELISA IgA e IgG PPE59 combinada com as dos antígenos ESAT-6, 16Kda, 38Kda, MT10.3 e MPT-64 em pacientes brasileiros com tuberculose pulmonar ( $TB_{pul}^{BR}$ ) e controles (outros agravos respiratórios e sadios) testados previamente (Silva et al. 2008).....	60

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µl	Microlitro
µm	Micrometro
A	Acurácia
aa	Aminoácido
Ab	Anticorpo
ABF	Azul de bromofenol
a.C.	antes de Cristo
APC	Célula apresentadora de antígeno
APS	Persulfato de Amônio
BAAR	Bacilos álcool ácidos resistentes
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Albumina sérica bovina
BR	Brasil
C	Citosina
CCL	“C-C <i>Motif</i> “ ou Quimiocinas da subfamília com resíduos de cisteínas
cm	centímetros
CMSHB	Centro Municipal de Saúde Heitor Beltrão
CXCL	Quimiocina (C-X-C <i>Motif</i> )
d.C.	depois de Cristo
DC	Células dendríticas
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DOTS	Tratamento diretamente observado de curto prazo
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensaio imunoenzimático
G	Glicina
g	Gramas
GM-CSF	“Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor” ou Factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos
H2SO4	Ácido sulfúrico
HBC	“High-Burden Country” ou países com alta carga bacilar

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC	Intervalo de confiança
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGRA	“Interferon gamma release assays” ou ensaios de liberação de IFN- $\gamma$
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-thiogalactopiranosídeo
IT	Itália
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico
LAM	Lipoarabinomanana
LB	Luria Bertani
LJ	Lowenstein Jensen
LM	Lipomanana
LTBI	“Latent TB infection” ou infecção TB latente
LT	Linfotoxina
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mM	Mili molar
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAAT	Teste de amplificação de ácidos nucleicos
NaCl	Cloreto de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monossódico
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NK	Células natural killer
nm	Nanômetros
OAR	Outros agravos respiratórios
OMS	Organização mundial da saúde
OR	“Odds Ratios” ou razão de chance

PAMPs	Padrão molecular associado a patógenos
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPD	Derivado proteico purificado
PE	Prolina-glutamato
PE-PGRS	“ <i>polymorphic GC-rich-repetitive sequence</i> ” ou sequencia polimórfica repetitiva rica em GC
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPE	Prolina-prolina-glutamato
PPE-MTR	“major polymorphic tandem repeat” ou Repetição tandem polimórfica maior
PRRs	Receptor de reconhecimento padrão
PT	Prova Tuberculínica
RD	Região de diferença
RIF	Rifampicina
RJ	Rio de Janeiro
rpm	Rotações por minuto
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
R-X	Raio X, nomeia-se comumente a radiografia de tórax
S	Sadios
SDS	Duodecil sulfato de sódio
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNP	“Single nucleotide polymorphism” ou polimorfismo de base única
TB	Tuberculose
TBMDR	Bacilo da tuberculose multidroga resistente
TBpulBR	Tuberculose pulmonar Brasil
TBpulIT	Tuberculose pulmonar Itália
TBExpIT	Tuberculose extrapulmonar Itália
TBXDR	Bacilo da tuberculose extremamente resistente as drogas
TC	Tomografia computadorizada
TCT	Teste cutâneo da tuberculina
T <sub>FH</sub>	Células T folicular auxiliares
TGF	Fator de transformação do crescimento
Th	T auxiliar
TEMED	Tetrametiletlenodiamina

TMB	3,3',5,5'- tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRIS-HCL	(hidroximetil) aminometano hidrocloreto
Tween 20	Polissorbato 20
USA	Estados Unidos da América
V	Volts
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
WHO	“World Health Organization”

# 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de grande impacto na saúde pública (Ali, 2014). Existem diversos fatores que influenciam a dinâmica da doença, como a genética humana, as mudanças no meio ambiente, os fatores sócio-econômicos, além do processo de globalização (Perrin 2015).

A progressão da TB conta com alguns eventos que contribuíram para o aumento da incidência mundialmente. Isso inclui a capacidade do patógeno sobreviver no hospedeiro por longos períodos de tempo sem causar a doença, limitada eficácia da vacinação BCG e a necessidade de administração prolongada de quimioterápicos (6-9 meses), favorecendo o abandono do tratamento. Por outro lado, há ainda os quadros de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) que, em conjunto com a falta de medidas sanitárias adequadas, condições socioeconômicas deficitárias de parte da população mundial, e a seleção de cepas micobacterianas multirresistentes às drogas, agravam o quadro de incidência da doença (Kanunfre 2007; Jeon et al. 2015).

Assim, a TB permanece um problema de saúde global e interromper a transmissão através do diagnóstico precoce e tratamento adequado do indivíduo doente, é uma das formas de controle e é importante em qualquer programa com esta finalidade (Abraham et al. 2013).

O desenvolvimento de testes de baixo custo, rápidos e acurados é fundamental para auxiliar na prevenção e controle da doença. Atualmente, os métodos de diagnóstico disponíveis são os mesmos utilizados há décadas: o teste tuberculínico (valor apenas de prognóstico), o exame radiológico, a baciloscopia e o padrão-ouro microbiológico (cultura), todos com suas respectivas vantagens e limitações (Abraham et al. 2013). O uso de testes rápidos é atraente, porém estes ainda não são adequados como alternativa a baciloscopia em países em desenvolvimento e, os testes sorológicos são promissores, devido à sua fácil operacionalidade, custo-benefício e poder ser adaptado para uso em campo ou na rotina clínica, permanecendo uma promessa para a detecção rápida da TB.

O ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tem potencial para detectar casos de TB pulmonar e extrapulmonar com baciloscopia negativa a partir do soro dos pacientes, pois é uma técnica sensível (Benavaliker 2000). Além de ser simples e de fácil operacionalidade, não necessitando de infraestrutura complexa para sua execução, pode ser adaptado para testes do tipo “*point of care*” com melhor aplicabilidade em campo, em populações vulneráveis como moradores de rua, usuários de drogas, moradores de comunidades de baixa renda e com dificuldade de acesso aos serviços públicos e imigrantes.

Estas populações apresentam maior risco para desenvolver a doença e, ainda não atendidas pelas metodologias onerosas, como as moleculares, que necessitam de espaço físico adequado e pessoal especializado, embora apresentem vantagens como resultados em menor tempo com alta especificidade e boa sensibilidade (Achkar et al. 2011; Steingart et al. 2011).

Existem muitos estudos relacionando a sensibilidade e a especificidade de antígenos específicos de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) na detecção da TB, tais como 38kDa, 16.3 kDa e MPT64, entre outros. Devido à heterogeneidade da resposta imune do hospedeiro frente aos diferentes antígenos micobacterianos e a sua variabilidade de acurácia em diferentes áreas geográficas, estes estudos não apresentaram resultados conclusivos (Lyashchenko et al. 1998; Harrington et al. 2000). Para vencer esta dificuldade, disponibilizar e avaliar diferentes antígenos ou peptídeos é uma estratégia em potencial e, explorar moléculas, ainda pouco estudadas, como as proteínas das famílias PE/PPE, específicas de *Mtb*, pode levar à identificação de marcadores específicos que, mesmo com moderada sensibilidade, poderiam ser combinados, de modo a serem reconhecidos por bioassinaturas imunológicas, elevando a sensibilidade do teste.

## **Revisão Bibliográfica**

### *História da Tuberculose*

Estudos genéticos evidenciam que *Mtb*, agente etiológico da TB, coexiste com a humanidade há pelo menos 15000 anos, e achados arqueológicos sugerem sua presença entre os hominídeos do Neolítico, portanto, a TB não é um problema atual (Kapur et al. 1994; Hershkovit 2008).

A TB foi denominada diferentemente por vários povos, de acordo com a característica da doença: “yakshma” (Hindu), “chiai nio” (China), “consumptione” (Latim) e “chakyonca” (Civilização Inca). Hipócrates (460-370 a.C.) denominou a tuberculose como tísica (do grego “phthisis”). Todas essas definições têm significado de consumpção, também assim conhecida no Império Romano e, segundo Hipócrates (Maltez et al. 2014; Rodrigues 2015):

*“Todo o tísico nasce de um tísico”.*

A dinâmica da infecção da TB é conhecida desde a época de Hipócrates e, de acordo com Filho (2001), os seus textos contêm as melhores informações sobre o assunto. Apesar dos gregos confundirem a TB com outras doenças do aparelho respiratório, Hipócrates estabeleceu fundamentos clínicos na sintomatologia básica, como a existência de sons

anormais advindos do peito, dor no tórax, tosse frequente, escarro espesso e purulento, dificuldade respiratória, voz rouca, rubor facial, inchaço dos pés e joelhos, sudorese, unhas curvas e diarreia intensa como presságio de morte para os indivíduos doentes, chamados na época de “doentes do peito” (Filho 2001).

Os romanos poucos contribuíram para os fundamentos da clínica na TB e acabaram por distorcer muitos fatos, como Galeno (129-200 d.C.), que em seus estudos concluiu que a TB era produzida por meios mecânicos ou traumáticos que laceravam os pulmões, originando uma inflamação que, se não tratada, evoluía para TB (Filho 2001). As concepções cristãs foram bastante influenciadoras quando afirmavam que as doenças eram de origem divina. A adenite tuberculosa – o mal das escrófulas- tinha como terapêutica o toque das mãos reais, fato este que teve grande popularidade na França e Inglaterra durante o século XVII (Filho 2001).

Na idade média os relatos de casos são mais escassos, provavelmente devido ao declínio da vida urbana na Europa. Entretanto, durante a revolução industrial, a incidência aumentou, principalmente, devido à péssima situação de moradia e qualidade de vida que os trabalhadores eram submetidos (Costa 1985). A partir de meados do século XIX, a TB foi definida como problema social e, em conjunto com a sífilis e alcoolismo, desafiaram a ordem social (Filho 2001).

A tuberculose frequentemente atinge a classe populacional de menor *status* social e grupos de maior vulnerabilidade, como os moradores de rua, pessoas acometidas com doenças imunodebilitantes, como é o caso do *diabetes mellitus* e a co-infecção com HIV. René Dubos (1901-1982), mesmo sem formação apropriada, sabiamente escreveu que a TB é um problema social, possui impacto econômico e causa dano ao corpo (Galdston 1954; Ali 2014).

### *História da tuberculose no Brasil*

A TB foi introduzida no Brasil pelos colonos portugueses e missionários jesuítas por volta de 1500 durante a colonização (Ruffino-netto 2002). Sugere-se que o Padre Manoel da Nóbrega, que chegou por volta de 1549, tenha sido o primeiro indivíduo com TB no nosso país. Estima-se que no período imperial a mortalidade por TB era de 1/150 habitantes. Por volta de 1870, devido às epidemias de TB, febre amarela, varíola e disenterias, diversas leis foram criadas para o enfrentamento das questões sanitárias. A TB no Brasil foi denominada “doença dos pobres”, pois estava associada às condições insalubres de vida das camadas menos favorecida da população (Campos & Pianta 2001; Maciel et al. 2012).

É curioso observar que a TB já teve uma visão romântica. Na metade do século XIX tinha certa excepcionalidade e até mesmo refinamento, tinha uma sensibilidade romântica e

era bem aceita entre os intelectuais e artistas da época. A doença, para os poetas, era um atributo que os deixava “interessantes” (Campos & Pianta 2001; Pôrto 2007; Maciel et al. 2012). Em uma carta de 1858 Casimiro de Abreu escreveu sobre seu desejo de contrair a doença (Citado por Montenegro 1971 p27):

*“Querida a tísica com todas as suas peripécias, queria ir definhando liricamente, soltando sempre os últimos cantos da vida e depois expirar no meio de perfumes debaixo do céu azulado da Itália, ou no meio dessa natureza sublime que rodeia o Queimado”.*

No início do século XX, a associação entre TB e criação literária termina quando a doença passa a ser vista como um problema de saúde pública e um novo cenário é estabelecido. A TB, que era considerada um mal romântico, passa a ser um mal social. Até o final da década de 40 foram registradas altas taxas de mortalidade e os medicamentos para TB começam a ser introduzidos na prática clínica no Brasil. A luta contra a TB, no âmbito do setor público brasileiro, começou com Oswaldo Cruz e, em 1920 com a Reforma Carlos Chagas, foi instituído o primeiro setor governamental de controle da TB. Em 1927, deu-se início à vacinação com a BCG em recém-nascidos e, em 1930, foi incluído o ensino de tisiologia nas faculdades de medicina (Maciel et al. 2012).

No cenário internacional, um importante marco na história da tuberculose foi o isolamento da bactéria responsável pela doença que foi feito pelo cientista alemão Robert Koch em 1882, que em sua homenagem, recebeu o nome de bacilo de Koch (Souza & Vasconcelos 2005).

Em 1943, houve um outro marco importante, envolvendo o tratamento para TB, com a descoberta por Selman Waksman do primeiro aminoglicosídeos, a estreptomina, com ação bactericida para *Mtb*. Nos anos seguintes outros fármacos foram introduzidos, como isoniazida e rifampicina e os esquemas terapêuticos foram implementados com o decorrer dos anos, impactando diretamente na mortalidade por TB (Hijjar et al. 2007 e Maciel et al. 2012).

### *Evolução de Mycobacterium tuberculosis*

Muito se tem investigado sobre a origem de *Mtb*, uma das espécies do gênero *Mycobacterium* e, como outros actinomicetos, inicialmente encontrados em solos, algumas espécies evoluíram para colonizar mamíferos (Smith 2003). A origem de *Mtb* permeia inúmeras discussões e a utilização de ferramentas genéticas e moleculares permitem entender melhor a origem e evolução deste microrganismo.

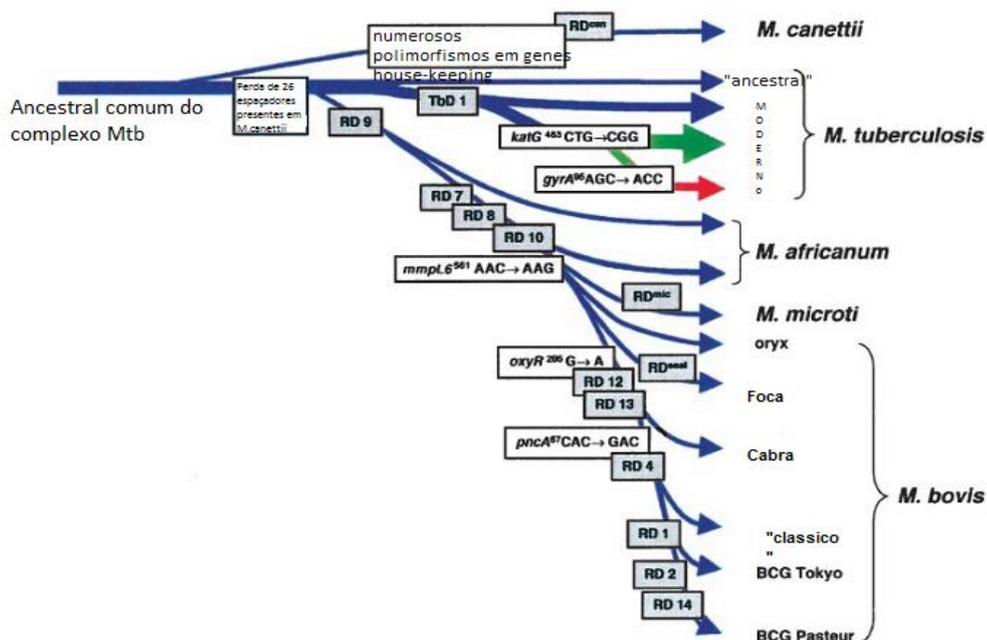
Acredita-se que *Mtb* tenha surgido na África há cerca de 70.000 anos e então disseminou-se fora do continente, através das migrações humanas. Hoje já é aceito que *Mtb* evoluiu de uma cepa ancestral ambiental. Essas cepas evoluíram através de um gargalo genético e para persistir em baixa densidade populacional mantinha-se em longos períodos de latência (Delogu et al. 2013).

A análise filogenética mais aceita sobre a origem de *Mtb* é baseada na análise de SNPs (*Single-nucleotide polymorphism*) e deleções de regiões de diferença (RDs). A ausência da RD9 é característica de cepas que estão adaptadas a hospedeiros animais, formando uma linhagem separada. As deleções das RDs foram um evento muito importante na história filogenética do complexo *Mtb* e análises de genética comparativa mostram que as regiões de diferenças são deleções no genoma de *M. bovis* e não inserções no de *Mtb*. Acredita-se que uma cepa que tenha RD9 deletada, similar ao *M. africanum*, tenha dado origem as cepas que são adaptadas a terem os animais como hospedeiro (Figura 1) (Rodriguez-Campos et al. 2014; Brosch et al. 2002).

Por muito tempo se especulou que *Mtb* teria evoluído de uma cepa *M. bovis* e, através da domesticação animal, o patógeno teria evoluído para infectar humanos. Esta hipótese foi contestada por ferramentas genéticas. Brosch et al. (2002) confirmam em seu estudo por meio de genética comparativa 14 regiões (RD 1-14) que estão ausentes na cepa *M. bovis* BCG Pasteur relativo ao *Mtb* H37Rv. Em paralelo, 6 regiões estão ausentes em *Mtb* H37Rv (RD 1-5) e, uma deleção específica de *Mtb* (tbD1) relativo a outros membros do complexo *Mtb*, mostrando assim que *M. bovis* sofreu várias deleções relativas ao *Mtb* tendo portanto, o genoma menor do que o de *Mtb*. Acredita-se então que *M. bovis* tenha ramificado de um progenitor proveniente de uma cepa ancestral de *Mtb* (Brosch et al. 2002; Perrin 2015; Hershkovit 2008; Nerlich & Lössch 2009). (Figura 1).

Acredita-se que a TB foi trazida para as Américas através do contato com europeus, mas dados bioarqueológicos indicam a presença de TB nas Américas antes da vinda dos colonizadores. A análise de DNA, de esqueletos pré-colombianos, identificou sequências intimamente associadas com o genoma de cepas isoladas de leões marinhos, hipotizando uma nova rota de entrada do complexo *Mtb* nas américas (Bos et al. 2014).

As doenças infecciosas humanas têm grande associação com a mudança na ecologia humana e as interações entre as populações. As mudanças no estilo de vida que ocorrem, com o passar do tempo, está claramente associada com o aparecimento das doenças como varíola, sarampo, malária, esquistossomose e tuberculose (Hershkovit 2008).



**Figura 1:** Esquema da via evolucionária proposta para *Mycobacterium tuberculosis* ilustrando as perdas de DNA em certas linhagens (caixas azul-claros). O esquema é baseado na presença ou ausência de regiões conservadas deletadas e na sequência de polimorfismo em 5 genes (caixas brancas). Adaptado de Brosch et al. 2002.

### Características Gerais de *Mycobacterium tuberculosis*

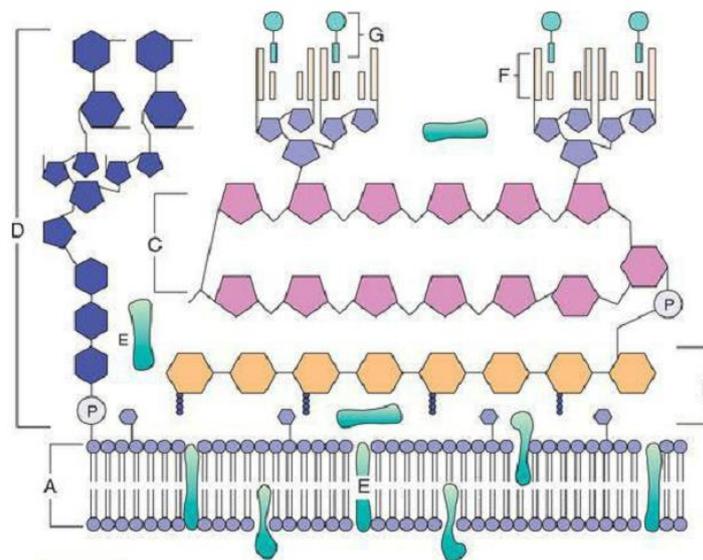
A palavra *Mycobacterium* vem do grego *Myces*, “fungo”; *bakterion*, um “bastão pequeno” (bastão semelhante a fungo) (Murray, 2009). O gênero *Mycobacterium* é o único da família *Mycobacteriaceae* que está inserido na sub-ordem *Corynebacteriaceae* e na ordem *Actinomycetales*. Até o presente momento, foram identificadas 174 espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>; Tortora 2012).

Apenas quatro estirpes são os principais agentes infecciosos de TB humana, pois levam a um padrão clínico idêntico, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* (raramente causa doença), que formam o Complexo *M. tuberculosis*, juntamente com as espécies *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 Asia), (Viana-Niero et al. 2004; Ocepek et al. 2005; Alexander et al. 2010; Ingen et al. 2012), pois apresentam similaridade de 99,9% na sequência nucleotídica da 16S rRNA (Boddinghaus et al. 1990; Sreevatsan et al. 1997; Brosch et al. 2002).

O gênero *Mycobacterium* é dividido, de acordo com a sua capacidade de multiplicação *in vitro*, em espécies de crescimento lento (complexo *M. tuberculosis*, complexo *M. avium*, *M.*

*kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. ulcerans*, *M. scrofulaceum* e *M. xenopi*), de crescimento rápido, isto é, cresce com <7 dias (*M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. mucogenicum*) e que não crescem in vitro (*Mycobacterium leprae*) (Soolingen et al. 1997; Tortora 2012; Murray 2009). As micobactérias não tuberculosas, atípicas ou ambientais, tais como *M. avium* e *M. kansasii*, também podem induzir com frequência a infecção pulmonar granulomatosa, mas não exclusivamente, em pacientes imunocomprometidos, como em indivíduos infectados pelo HIV (Nerlich & Lösch 2009).

O bacilo da tuberculose é de formato reto com ligeira curvatura, imóvel, não esporulado, intracelular facultativo, com aproximadamente 0,2 a 0,6 µm de largura e acomete principalmente a via respiratória inferior. Possui parede celular complexa com alto teor de lipídeos, principalmente os ácidos micólicos (Figura 2), que favorecem a resistência de *Mtb* à dessecação, a descoloração por álcool e ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos (Campos 2006). Essa complexa parede celular confere ao *Mtb* proteção contra a ação de enzimas e radicais tóxicos e permite que a bactéria persista em tecidos que contenham níveis altos de oxigênio, como os pulmões, local adequado para que o bacilo sobreviva, tendo preferência por temperatura de 37°C e pH neutro, ambiente este encontrado em animais de sangue quente (Reis et al. 2007).



**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. Fonte: Karakousis et al. 2004.

A infecção por *Mtb* ocorre quando aerossóis contendo o agente patogênico são liberados, por via aerógena, por pessoas que estão com a TB ativa. As partículas infecciosas (partículas de *Flugge*), suspensas no ar, ao serem expostas ao vento e aos raios solares ficam ressecadas e tornam-se muito pequenas com diâmetro de 5 $\mu$  possuindo de um a dois bacilos, dessa forma são facilmente inaladas e atingem os alvéolos pulmonares. Antes dos bacilos atingirem os pulmões eles precisam vencer as primeiras barreiras do sistema imune e as barreiras físicas, que são constituídas por pelos nasais, a angulação das vias aéreas, o turbilhonamento aéreo, a tosse e a remoção mucociliar (Capone 2006; Rocha et al. 2008; Gideon & Flynn 2013; Stam et al. 2015).

Uma vez em contato com o sistema respiratório, os macrófagos alveolares englobam o bacilo, após reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos de *Mtb* (*PAMPs-pathogen-associated molecular patterns*), através dos receptores de reconhecimento padrão (*PRRs - pattern recognition receptors*), iniciando um processo de resposta inflamatória e recrutamento de células imunitárias, como células dendríticas (DC), neutrófilos e monócitos, para o local da inflamação. Após a fagocitose de *Mtb*, as células migram para os gânglios linfáticos e inicia-se o processo da resposta imune adaptativa (Gideon & Flynn 2013; Fogel 2015; Stam et al. 2015; Korb et al. 2016).

Com a formação da resposta imune adquirida e a chegada dos linfócitos, forma-se então o granuloma, uma característica da doença. O granuloma toma uma forma mais organizada e estratificada, composto de uma região central, composta de células gigantes multinucleadas, células epitelióides e macrófagos espumosos bem como, neutrófilos e monócitos, uma camada exterior de células B e células T. Componentes fibrosos cobrem o granuloma, tornando-o calcificado e os bacilos ficam encapsulados em seu interior, protegidos da resposta imune do hospedeiro (Gideon & Flynn 2013; Stam et al. 2015), gerando então uma lesão primária, classicamente denominado complexo Ghon, o "santuário" de *Mtb* durante a infecção latente, onde os bacilos permanecem em estado de dormência. O sítio de infecção proporcionado por macrófagos alveolares após o englobamento de *Mtb* conseqüentemente induz uma cascata de citocinas pró-inflamatórias tais, como: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12, junto com as quimiocinas inflamatórias CCL2 e CXCL10. As quimiocinas por sua vez recrutam neutrófilos, células NK, CD4, CD8, T  $\gamma\delta$  e linfócitos B, cada um com seu repertório próprio de quimiocinas e citocinas (Delogu et al. 2013; Korb et al. 2016).

A história natural da infecção por *Mtb* é marcada por alguns acontecimentos. Apenas uma pequena parte da população (5 a 10%) desenvolve a TB primária (TB ativa) da doença após a infecção por *Mtb*. O Restante da população (90 a 95%) consegue desenvolver uma

resposta imunológica eficiente, controlando a multiplicação bacilar e não desenvolvendo sintomas (TB Latente), o bacilo fica dormente e pode ficar assim por toda a vida do indivíduo. A reativação da doença (TB secundária) pode ocorrer devido a diversos fatores, alguns deles são a imunossupressão com o HIV ou a outras doenças, como diabetes mellitus, uso de corticosteroides, terapia de bloqueio do TNF (fator de necrose tumoral), além do abuso do uso de álcool e drogas, avanço da idade, entre outros fatores (Flynn & Chan 2001; Teixeira et al. 2007; Gideon & Flynn 2013).

As formas clínicas e o desenvolvimento da doença dependem do balanceamento da virulência do microrganismo e da competência imunológica do hospedeiro, bem como da combinação entre a resposta imune inata e adquirida, uma vez que a resposta inata confere proteção limitada e *Mtb* pode se multiplicar dentro do macrófago e disseminar-se por via hematológica (Moutinho 2011).

A imunidade mediada por células começa após a multiplicação de *Mtb* no sítio de infecção. No local da infecção vários tipos de células estão presentes, como células T auxiliares (Th1, Th2 e Th17) (Silva et al. 2015) e subconjuntos de T auxiliares, incluindo Th22, Th9 e T<sub>FH</sub> (células auxiliares folicular T). Entre diferentes populações de células T helper, Th1 e Th17 são as principais populações efetoras na proteção durante a TB (Lyadova & Panteleev 2015).

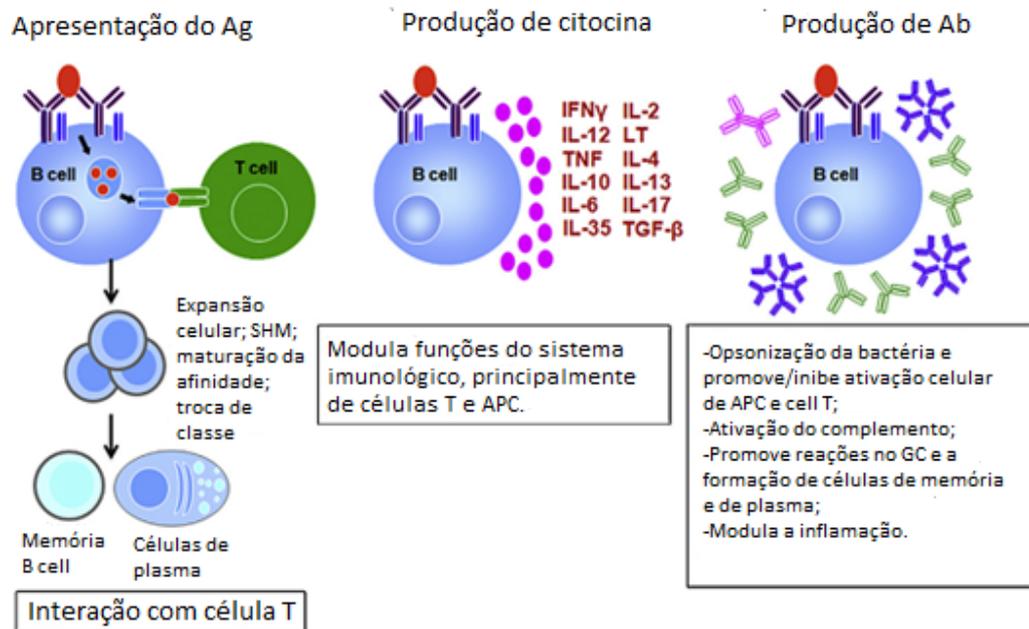
A principal citocina encontrada no perfil Th1 é o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Essa citocina aumenta os mecanismos microbicidas dos macrófagos e ativa a produção de óxido nítrico, levando à acidificação e maturação do fagossomo. Outras citocinas como TNF- $\alpha$ , GM-CSF (“Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator”), IL-1 e IL-6 são essenciais para imunidade contra o patógeno (Moutinho 2011; Silva et al. 2015). A IL-12 é uma importante citocina promotora da resposta Th1, cuja produção está associada ao controle da infecção por *Mtb*, sendo induzida pela fagocitose do bacilo pelos macrófagos e células dendríticas (Flynn & Chan 2001; Fogel et al. 2015). A produção persistente de TNF- $\alpha$  é necessária para sustentar o gradiente de quimiocinas que são produzidas pelos macrófagos e, assim, manter a estrutura do granuloma (Korb et al. 2016).

A participação de citocinas do perfil Th2, como IL-10 e IL-4, pode estar envolvida na evasão de *Mtb* do sistema imune, mas ainda não está claro se estas citocinas são a principal causa de reativação da TB ou apenas uma consequência da progressão da infecção ativa (Silva et al. 2015). A IL-10 é uma citocina considerada anti-inflamatória e é produzida por macrófagos e células T durante a infecção (Flynn & Chan 2001). É um clássico supressor de resposta Th1, é capaz de induzir reativação de TB em animais e, em populações humanas, o aumento de expressão de IL-10 foi associado com ineficácia da vacinação com BCG (Ferraz

et al, 2006). O aumento da expressão de IL-4 foi descrito em pacientes com TB pulmonar severa (Flynn & Chan 2001; Kutlu et al. 2007).

Às células B e aos anticorpos sempre foi atribuído papel pouco relevante contra patógenos intracelulares, mas esse ponto de vista vem mudando nas décadas recentes. Anticorpos para patógenos intracelulares podem mediar proteção através de vários mecanismos, sejam os classicamente conhecidos, opsonização e ativação do complemento, assim como as funções não clássicas, como sinalização através dos receptores Fc (FcR) e modulação da resposta inflamatória do hospedeiro (Achkar et al. 2015).

As células B podem regular a resposta imune do hospedeiro ao *Mtb*, como células apresentadoras de antígenos, para interagir com as células T e o local principal desta reação é o centro germinativo (CG). A interação entre as células B, CG e T<sub>FH</sub> culmina na expansão de células B, hipermutação somática, maturação por afinidade, troca de classe e o desenvolvimento de células B de memória e células plasmáticas produtoras de anticorpos. A produção de anticorpos (Ac) pode modular múltiplos aspectos tanto da resposta imune inata, quanto na adaptativa. Ac específicos de *Mtb* podem opsonizar bacilos extracelulares, formando complexos imunes que fixam complemento; se envolver receptores Fc $\gamma$  de células efetoras, podem modular as suas funções e, portanto, os seus efeitos sobre outras células do sistema imunológico, incluindo células T. Os Ac também podem modular as reações no centro germinativo (GC), como a inflamação em tecidos infectados (Figura 3) (Chan et al, 2014).



**Figura 3:** Os mecanismos pelos quais as células B atuam na resposta imune ao *Mtb*. LT: linfotóxica; TGF: fator de crescimento transformador; IL: interleucina; TNF: factor de necrose tumoral; APC: célula apresentadora de antígeno; CG: centro germinativo; Ab: anticorpos: Círculo vermelho: antígeno *Mtb*; círculos rosa: citocinas secretadas; Y verde: IgG; Duplo Y Rosa: IgA dimérica; Múltiplos Y azul: IgM pentamérica; Duplo Y marrom: receptor de células B. Adaptado de Chan et al. 2014.

As células B, com toda a sua maquinaria de apresentação de antígenos, produção de Ac e citocinas, exerce efeito sobre as células T e estudos tem mostrado que células B tem papel crucial na regulação das células T de memória e é grande influenciadora na evolução da resposta imune por estas células (Maglione & Chan 2009; Chan et al. 2014). Existem algumas evidências de que células B podem indiretamente regular funções de células T, onde os Ac contra *Mtb* podem atuar em sinergia com outros componentes da resposta imune celular. Foi descrito que indivíduos vacinados com BCG produzem Ac que induzem tanto resposta inata como mediada por células (Achkar et al. 2015).

Sabe-se que a eficácia dos Ac depende da característica estrutural da imunoglobulina e da quantidade produzida e das condições imunológicas do hospedeiro. A imunoglobulina M (IgM) é um dos primeiros Ac a serem produzidos durante a infecção tuberculosa, surgindo durante a fase primária e declinando com o avanço da doença (Feng et al. 2014).

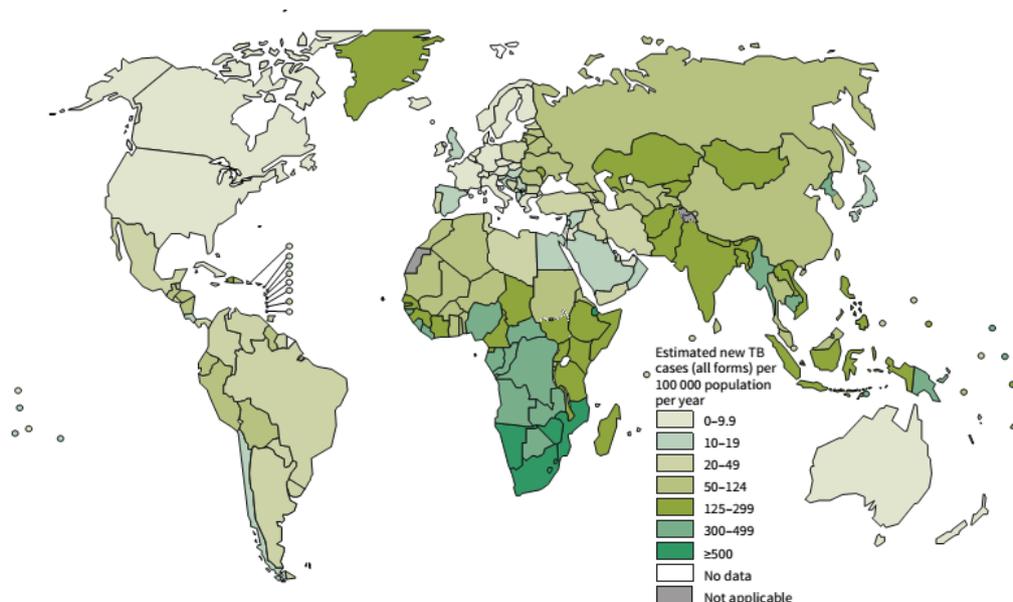
A resposta por IgA é responsável pela proteção em mucosas, onde IgA atua, principalmente, contra bactérias e vírus que invadem os tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital, e é um importante desencadeador de resposta imune inflamatória (Legesse et al.

2013). A IgA pode ser um elemento importante quando da interação da mucosa respiratória com *Mtb*, já que o bacilo penetra no hospedeiro pela via aérea. Estudos têm demonstrado que IgA específica reduz a carga bacilar em modelos murinos (Chin et al. 2015) e, em humanos, as subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) são descritas como potenciais biomarcadores no diagnóstico da TB (Mattos et al. 2016). Entretanto, ainda pouco se sabe sobre a ação protetora dos Ac na TB, eles são extensivamente explorados como biomarcadores para diagnóstico em várias doenças infecciosas, inclusive a TB. Em modelos murinos IgM, IgG, IgG1, IgG3 e IgA tem mostrado ação protetora contra *Mtb* (Achkar et al. 2015).

### *Epidemiologia*

Os últimos dados da OMS registraram no ano de 2014, 9,6 milhões de casos novos e 1,5 milhões de mortes (destas mortes 1,1 milhão eram HIV<sup>-</sup> e 0,4 milhão HIV<sup>+</sup>). Estes dados se comparados aos de 2012 mostraram-se aumentados devido a um inquérito feito na Nigéria, onde a alta densidade populacional e a alta carga de TB neste país influenciaram as estimativas globais (WHO 2015).

A incidência de TB varia de acordo com a região. As menores incidências estão associadas aos países com renda *per capita* elevada, como a maioria dos países da Europa Ocidental, Canadá, Estados Unidos, Japão, Austrália e Nova Zelândia. Entre os 22 países com alta carga da doença (*HBCs - do inglês High burden country*), o Brasil contribui com 33% dos casos de TB notificados nas Américas refletindo um coeficiente de incidência de 33,5/100 mil habitantes (Figura 4) (WHO 2015; Brasil 2015).



**Figura 4:** Taxa de incidência estimada para TB em 2013. Fonte: WHO, 2014.

Dos casos novos de TB identificados, 23,9% eram de pessoas incluídas em programas sociais e o tratamento de TB ocorreu em 46,8% e 50,6% de cadastrados e não cadastrados, respectivamente. A taxa percentual de co-infecção com HIV no Brasil é de 10,4%. A testagem para o HIV é recomendação do ministério da saúde e no Brasil, em 2014, 62,7% dos casos novos de TB realizaram e receberam resultado de teste anti-HIV (Brasil, 2015)

Em 2014, 57,5% dos casos de TB no Brasil ocorreram na população negra. Na população indígena (0,4% da população do país) foram notificados 772 casos novos de TB (1,1% do total de casos), entre os amarelos 0,7% e entre os brancos 32,8%. O Brasil tem uma taxa de abandono de tratamento entre os bacilíferos de 10,9%. A região sul é a que possui a maior taxa de abandono do tratamento: 12,8%. A taxa de cura no país é de 72,5%, porcentagem está inferior ao preconizado pelo OMS, na qual, preconiza-se uma taxa de cura superior a 85%. A região sudeste alcançou uma taxa de cura de 75,5%, indicador mais elevado alcançando no Brasil (Brasil, 2015).

O Rio de Janeiro (RJ) é a quarta capital do país com a maior taxa de incidência de TB (66,8/100 habitantes), devido a elevada densidade demográfica nos grandes centros urbanos. Mesmo com ações governamentais, para reduzir esses índices, as taxas permaneceram inalteradas nos últimos 4 anos. Entre os casos notificados no estado, 66% são do sexo masculino e a faixa etária mais afetada é a de indivíduos jovens com idades entre 20 a 49 anos. A co-infecção com HIV aumentou de 2006 (8,8%) para 2012 (10,6%) e isso pode ser devido a uma melhora na detecção por testes sorológicos (Bevilaqua et al. 2014). A população

encarcerada corresponde a 6% dos casos de TB notificados no estado entre as 55 unidades prisionais, com taxa de incidência de 1.556/100 mil habitantes (Bevilaqua et al. 2014).

### *Programas de controle da tuberculose*

Durante a década de 1990, a TB foi declarada emergência global pela OMS, que lançou a estratégia DOTS (*Directly Observed Treatment, Short-course*), como a forma mais eficaz e de melhor custo benefício para o controle da doença (Abdallah et al, 2006). A implementação da estratégia DOTS foi feita primeiramente na Tanzânia na década de 90 e se expandiu para países da África e Nicarágua. Esta estratégia tem por objetivo aumentar a cura em função do tratamento assistido, melhorando assim a adesão ao tratamento e prevenindo o aparecimento e disseminação de TB multidroga resistente (TBMDR) e TB extensivamente resistente (TBXDR). Outros fundamentos também são preconizados pela estratégia DOTs, como: apoio político com financiamento sustentado, exames de diagnóstico microbiológicos mais acurados, tratamento padronizado e supervisionado com apoio ao paciente, gestão eficaz de medicamentos e, monitoramento e avaliação do impacto das medidas implementadas (Rocha et al. 2008).

O controle da TB abrange muitos graus de complexidade, tanto para diagnóstico quanto para a cura. O Brasil segue diretrizes mundiais com princípios básicos para o controle da TB, entre eles: diagnóstico rápido e busca ativa de casos; terapia diretamente observada; vacinação efetiva; identificação de fatores que implicam na eficácia do tratamento; investigação dos contatos (caso um doente com TB ativa seja diagnosticado); importância da aderência ao tratamento e prioridade para as populações mais vulneráveis (NICE 2016; Rocha et al. 2008). O Brasil conta com um programa de controle de TB que caminha em concordância com a estratégia DOTs, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), este programa está integrado ao serviço de saúde e suas principais diretrizes são o tratamento da maioria dos casos de TB em ambulatorios, com profissionais generalistas, isso inclui equipes de saúde da família, fácil acesso aos recursos, tanto para diagnóstico, quanto para tratamento ou internação hospitalar, sendo esses recursos de baixa ou alta complexidade (Rocha et al. 2008).

Estima-se que 4,6-6,3 milhões de vidas foram salvas desde o início do programa DOTS TB (1995 a 2009), dentre os 49 milhões de casos de tuberculose diagnosticados. Espera-se, para 2050, atingir a meta de 1 caso por milhão de habitantes (Rocha et al. 2008; Plessis et al. 2016)

## *Diagnóstico da tuberculose*

A identificação oportuna e precisa de pessoas infectadas com *Mtb* e a confirmação laboratorial rápida da TB são duas medidas eficazes de saúde pública que devem ser adotadas para o controle da TB (Garg et al. 2003; Scatena et al. 2009).

O diagnóstico clínico da TB é feito principalmente pelo reconhecimento dos sinais e sintomas sugestivos de doença e por dados epidemiológicos. O diagnóstico laboratorial é confirmado pela demonstração do bacilo em lâmina microscópica (baciloscopia) e/ou seu crescimento em meio de cultura (padrão-ouro) (Stitbulov et al. 1999).

Os métodos de diagnóstico por imagem que podem ser utilizados na TB são a radiografia de tórax (R-X) e a tomografia computadorizada (TC). A radiografia muitas das vezes é utilizada como primeira avaliação, assim como no acompanhamento de pacientes com TB pulmonar e auxiliar no diagnóstico de casos suspeitos, contudo os pacientes com radiografia sugestiva para TB devem ser submetidos à confirmação laboratorial (Silva Jr 2004). Contrariamente a tomografia computadorizada, a R-X é um método barato e de fácil acessibilidade por grande parte das pessoas que procuram o serviço de saúde, assim, a TC só é utilizada em casos especiais, como na TB miliar e nas formas extrapulmonares de TB (Bombarda et al. 2001; Capone 2006).

A prova tuberculínica (PT), teste cutâneo à tuberculina (TCT) ou teste do PPD é usado desde o fim do século XIX. O teste foi desenvolvido por Robert Koch como “*old tuberculin*” e posteriormente derivou para PPD (derivado proteico purificado). O PPD é uma mistura de antígenos que são compartilhados por diversas micobactérias (Shingadia & Novelli 2008; Yang et al. 2012). A PT é realizada pela técnica de Mantoux, onde a inoculação intradérmica de 2 unidades da tuberculina PPD RT23 (0,1 mL) é feita na parte anterior do antebraço. O resultado é lido após 48-72h, verificando-se a formação de uma induração que é mensurada em função do diâmetro da induração, seguindo o eixo transversal do antebraço. A reação ao PPD ocorre por resposta de sensibilidade tardia mediada por linfócitos T de memória e indica uma exposição prévia a micobactérias. A PT tem pouca especificidade devido à reação cruzada com outras micobactérias e não diferencia indivíduos infectados de doentes ativos. As dificuldades na administração e interpretação de PT leva a resultados falso-positivos e falso negativos. A vacinação com BCG, a infecção por micobactérias atípicas, ruptura do vaso ou infecção no local da injeção podem levar a resultados falsos positivos, enquanto resultados falso-negativos podem ser associados a diversas doenças infecciosas, como: HIV, febre tifóide, brucelose, TB disseminada, blastomicoses; bem como vacinação com vírus vivo, doença renal crônica, doenças linfóides, ao uso de drogas imunossupressoras como os corticóides e também situações de estresse (Arias Guillén 2011).

Nos últimos anos foi desenvolvida uma nova ferramenta para substituir a PT, desenvolvida para avaliar a resposta imune celular e identificar indivíduos latentemente infectados por *Mtb* (LTBI). Ela se baseia na produção de interferon gama pelas células T do sangue e foi denominada IGRA (*interferon gamma release assays*), 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). Entretanto, embora mais específica que a PT, pois é utilizado na sua formulação antígenos micobacteriano específicos de *Mtb* que além de ausentes nas cepas BCG estão ausentes na maioria das espécies de micobactérias não tuberculosas, sua sensibilidade é variável, principalmente por não existir um teste padrão para determinar a infecção e, os IGRA são ineficazes para distinguir ou excluir TB ativa (Belknap & Daley 2014).

A detecção de casos de TB por microscopia, pela técnica de Ziehl-Neelsen, é usada há mais de 100 anos, tem a vantagem de ser uma técnica simples e barata, mas possui menor sensibilidade (60% a 70%) e especificidade do que a cultura. Nos casos paucibacilares a sensibilidade é de 40% a 50% e, entre crianças e co-infectados com HIV, a sensibilidade varia entre 35% e 70%. A baixa especificidade ocorre principalmente devido à técnica de Ziehl-Neelsen detectar bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR), e, portanto, não diferencia *Mtb* de outras micobactérias e outros microrganismos como *Nocardia* (Garg et al. 2003; Kanufre 2007; Kalra et al. 2010; Teran e Waard 2015).

O padrão-ouro para o diagnóstico da TB é o isolamento de *Mtb* em meio de cultura, permitindo a confirmação diagnóstica, através da identificação do microrganismo e a realização de teste de susceptibilidade das amostras isoladas. O meio de cultura utilizado neste método é geralmente o Lowenstein Jensen (LJ), meio sólido à base de ovo. Outros meios sólidos que estão comercialmente disponíveis são Middlebrook 7H10 e o 7H11. A cultura para *Mtb* é mais sensível do que a baciloscopia, porém possui a desvantagem de ser laboriosa e morosa, necessitando de 4 a 8 semanas para obtenção do resultado. Os meios de cultura líquidos como Middlebrook 7H9 e 7H12 reduzem este tempo para 10-14 dias, entretanto esses meios possuem uma maior taxa de contaminação. Dessa maneira, a OMS recomenda os meios sólidos tradicionais, junto com meios líquidos, para isolamento primário de *Mtb* (Castelo Filho et al. 2004; Teran & Waard 2015).

Os métodos de detecção automatizada ou semi-automatizada do crescimento micobacteriano em meios líquidos possibilitam o diagnóstico precoce, pois utilizam marcadores fluorimétricos que aumentam em 10% a sensibilidade do teste na detecção do crescimento *in vitro* em relação aos meios sólidos (Cudahy & Shenoj 2016). Estão disponíveis

no mercado vários sistemas de cultura automatizados, 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) (Castelo Filho et al. 2004; Teran e Waard 2015).

Apesar da cultura microbiológica ser preconizada como padrão ouro no diagnóstico da TB, seu resultado, geralmente, não é levado em consideração no processo de tomada de decisão clínica para iniciar o tratamento, pois a espera do resultado da cultura pode acentuar a disseminação e a gravidade da doença (Rie et al. 2010 e Anvisa 2011).

Com a introdução dos métodos de diagnóstico baseados nas técnicas de biologia molecular, vários testes para a identificação do *Mtb* foram descritos, geralmente baseados na amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) por reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica de PCR usa oligonucleotídeos (*primers*) específicos para amplificar regiões específicas do microrganismo. O maior alvo comum usado para PCR é a sequência de inserção IS6110. Essa sequência é específica de *Mtb* e oferece múltiplos alvos para amplificação, estando repetida no genoma mais de 20 vezes (Anochie et al. 2012). Outras sequências alvo são utilizadas, tais como a IS986, gene MPT-40 e o antígeno 65KDa (Garg et al. 2003). O mais recente método de amplificação de ácidos nucleicos, por PCR em tempo real, é o sistema automatizado Xpert *MTB*/RIF®, que além de identificar *Mtb* detecta mutações na região do gene *rpoB*, associadas à resistência a rifampicina (RIF) (Boehme et al. 2010; Anochie et al. 2012). O teste Xpert *MTB*/RIF®, utiliza um cartucho contendo todos os elementos necessários para a reação, incluindo reagentes liofilizados, tampões líquidos e soluções de lavagem. Os resultados podem ser obtidos em até 2h (Rie et al. 2010; Anvisa 2011; Steingart 2014).

O Xpert *MTB*/RIF é um sistema fechado, o que garante que a contaminação seja mínima ou inexistente e não necessita, portanto, de instalações de biossegurança. Uma revisão, que incluiu 27 estudos, comparando a detecção do Xpert *MTB*/RIF® com a detecção de casos através de cultura e baciloscopia, concluiu que o Xpert *MTB*/RIF aumenta a detecção de casos em 23%. Em dezembro de 2010 a OMS recomendou o uso dessa plataforma (Steingart et al. 2014). O acesso a esse sistema automatizado, para países em desenvolvimento, só é possível por possuir subsídio do setor público, pois é uma ferramenta de alto custo e nenhum estudo mostrou até o momento que o Xpert *MTB*/RIF®, impacta em melhorias para a saúde populacional (Anochie et al. 2012; Steingart et al. 2014). O teste

possui ainda a desvantagem de produzir resultados falsos positivos para resistência a RIF e ainda não está claro o seu impacto na mortalidade por TB (Cudahy & Shenoj 2016).

#### *Testes imunoenzimáticos como ferramenta de diagnóstico para tuberculose*

Os ensaios imunoenzimáticos ganharam espaço a partir da década de 60 na imunohistoquímica. Mais tarde (1970), foi introduzido o teste de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) pelos grupos de pesquisa de Pedro Perlmann e Eva Engvall da Universidade de Estocolmo, na Suécia, e pelo grupo de pesquisa de Anton Schuurs e Van Bauke Weemen na Holanda (Lequin 2005). Esta metodologia pode detectar tanto antígenos como anticorpos específicos relevantes ao diagnóstico de várias doenças infecciosas (Lequin 2005). O teste é simples, rápido, de fácil operacionalidade, baixo custo, sensível, pode ser adaptado para formas mais rápidas do tipo *point of care* e utiliza espécimes clínicos de fácil obtenção, como soro, plasma e outros fluidos corporais. Embora este método seja utilizado com sucesso no diagnóstico de diferentes doenças infecciosas, na TB não há teste comercial aprovado para uso clínico (Achkar et al. 2011). Isto se deve ao fato de que a resposta de anticorpos a alguns dos antígenos específicos de *Mtb* estudados é heterogênea e, enquanto um grupo de indivíduos doentes reconhecem determinado antígeno um outro grupo não reconhece. Podem ainda ocorrer diferenças de reconhecimento antigênico associados a áreas geográficas, possivelmente associada ao *background* genético dos indivíduos (Lyashchenko et al. 1998).

A utilização da metodologia de ELISA tem chamado a atenção dos investigadores como uma ferramenta útil no diagnóstico da TB. Nesta técnica já foram utilizadas misturas de antígenos de *Mtb*, bem como glicolipídeos purificados, antígenos recombinantes, entre outros (Chan et al 2000) e a elucidação do genoma micobacteriano é uma fonte de investigação para novos marcadores candidatos a compor testes diagnósticos, bem como moléculas com potencial vacinal. Assim, múltiplos antígenos devem ser disponibilizados para que se obtenha maior cobertura diagnóstica, sem alterar a especificidade do teste.

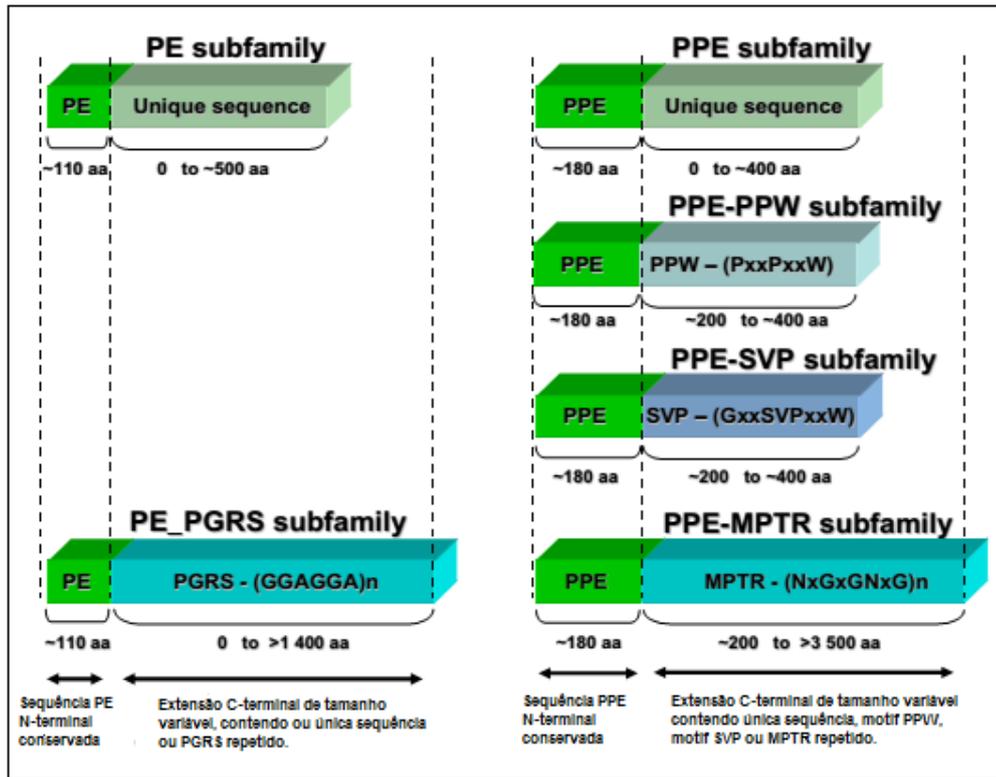
#### *Proteínas da família PE/PPE*

O sequenciamento completo do genoma de *Mtb* chamou a atenção para duas famílias de proteínas, as PE/PPE, cujos genes representam 10% da capacidade de codificação do genoma de *Mtb* e estão espalhados em toda sua extensão (Cole et al 1998). São assim chamadas por possuírem resíduos conservados de prolina-glutamato (PE) e prolina-prolina-glutamato (PPE) em sua região N-terminal (Cole et al 1998). Na cepa *Mtb* H37Rv foi encontrado ~99 genes PE e ~69 genes PPE, caracterizadas pelo alto teor de guanina (G) e

citocina (C) em suas sequências homólogas repetitivas e essa característica está associada a dois subgrupos destas famílias, PE\_PGRS (*polymorphic GC-rich-repetitive sequence*) e PPE\_MPTR (*major polymorphic tandem repeat*) (Cole et al, 2002; Akhter et al, 2012). As famílias PE/PPE foram descobertas através de estudos epidemiológicos no início dos anos 90 que identificaram sequências repetitivas no genoma micobacteriano contendo CGGCGGCAA e GCCGGTGTG, que mais tarde foram designadas de sequência de polimorfismo rico em GC, característicos dessas famílias (Akhter et al. 2012).

A região N-terminal dessas duas famílias é conservada, enquanto a região C-terminal é altamente variável, o que confere a sua variabilidade antigênica entre o complexo *Mycobacterium* e inter-espécie (Karboul et al. 2008). Os genes PE/PPE são frequentemente encontrados com operons ou *cluster* de genes, que também contém uma variedade de outros tipos de genes e são exclusivos de micobactérias patogênicas (Kunnath-Velayudhan & Porcelli 2013).

A família PPE contém um domínio N-terminal de 180 aminoácidos que é altamente conservado, seguido por uma região C-terminal. Os *motifs* e as cópias da sequência C-terminal dividem a família PPE em quatro subfamílias: PPE-SVP possui 24 membros e é a maior dentre as quatro; é caracterizada pelas repetições Gly-X-X-Ser-Val-Pro-X-X-Trp entre a posição 300 -350 na sequência de aminoácidos. A família MPTR é a que possui maior repetição *in tandem* e possui 23 membros (Sampson 2011). A família PPE-PPW com 10 membros é composta por um resíduo de 44 aminoácidos conservados na região C-terminal, e a subfamília PPE, com 12 membros é composta por proteínas que possuem baixo percentual de homologia na região C-terminal com outras micobactérias e, portanto, são consideradas específicas para *Mtb*. Entretanto, suas funções ainda não foram bem esclarecidas (Figura 5) (Gey van Pittius et al. 2006).



**Figura 5:** Representação esquemática da estrutura do gene de membros das famílias PE e PPE, mostrando domínios N-terminal, posições do *motif* e diferenças entre as duas subfamílias. (aa): aminoácidos; (PE): prolina-glutamato; (PPE): prolina-prolina-glutamato; (PE\_PGRS): *polymorphic GC-rich-repetitive sequence*; (PPE\_MPTR): *major polymorphic tandem repeat*; (PPE-SPV): repetições Gly-X-X-Ser-Val-Pro-X-X-Trp; (PPE-PPW): repetições Pro-X-X-Pro-X-X-Trp. Adaptado de Gey van Pittius et al. 2006.

Estudos recentes têm sugerido o envolvimento das PPEs em muitos aspectos da patogênese, incluindo fixação bacteriana às células do hospedeiro, imunomodulação e capacidade de persistir no granuloma (Kunnath-Velayudhan & Porcelli 2013).

A PPE24 e PPE53 são os membros de maior virulência em *M. smegmatis* e PPE37 diminui os níveis de expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Kunnath-Velayudhan & Porcelli 2013).

A importância das proteínas PPE na geração de variações antigênicas também tem sido mostrada (Li et al. 2005). Peptídeos sintéticos de PPE foram reconhecidos por soros de diferentes categorias de pacientes com tuberculose com respostas similares às obtidas para o derivado proteico purificado (PPD) de *Mtb*. Foi ainda descrito altos níveis de respostas de células T contra diferentes quadros de leitura aberta (*ORF, open reading frame*) no gene PPE. Em outro estudo, PPE41 foi testado 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 pacientes com TB extrapulmonar (Chakhaiyar et al. 2004). A proteína PPE codificada pelo

gene *rv1168c* foi descrita com forte imunorreatividade específica em soros de pacientes com tuberculose ativa quando comparada a imunorreatividade ao PPD, ESAT-6 e hsp60 (Khan et al. 2008). Por outro lado, a proteína PPE55, codificada pelo gene *rv3347c*, foi diferencialmente reconhecida em teste sorológico, em experimentação animal de infecção subclínica, entre aqueles com infecção latente versus aqueles que desenvolveram TB primária (Singh et al. 2005). Portanto, as proteínas PPE e/ou seus peptídeos tem potencial para serem usados como marcadores específicos no diagnóstico da tuberculose (Tabela 1).

**Tabela 1:** Características de algumas proteínas da família PPE caracterizadas e estudadas na literatura até o momento. Adaptado de Deng & Xie 2012.

<i>PPE</i>	<i>Gene</i>	<i>Vacina e/ou Biomarcador</i>	<i>Imunorreatividade</i>	<i>Referência</i>
<b>PPE2</b>	<i>rv0256c</i>	Marcador de imunidade humoral.	Diferenciou com moderada sensibilidade indivíduos com TB de controles.	Abraham et al. (2013)
<b>PPE8</b>	<i>rv0355c</i>	Domínio específico (CD192) de <i>Mtb</i> .	Identifica isolados em espécimes clínicos com 62,9% de sensibilidade e 100% de especificidade.	Srivastava et al. (2006)
<b>PPE17</b>	<i>rv1168c</i>	Biomarcador em TB ativa.	Imunorreatividade maior que PPD, Hsp60, ou ESAT-6.	Khan et al. (2008)
<b>PPE18</b>	<i>rv1196</i>	Potencial antígeno de célula T.	Proliferação de Cel-T e resposta a IFN- $\gamma$ .	Dillon et al. (1999), Nair et al. (2009, 2011)
<b>PPE32</b>	<i>rv1808</i>	Potencial antígeno de cel T.	Interage com TLR2 e expressa IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6 via MAPk e NF $\kappa$ B.	Deng et al. (2014).
<b>PPE34</b>	<i>rv1917c</i>	Potencial antígeno de cel T.	Secreção de IL-4, IL-5 e IL-10.	Bansal et al. (2010)
<b>PPE41</b>	<i>rv2430c</i>	Potencial antígeno de cel-B.	Resposta a células B melhor que PPD e Hsp10.	Choudhary et al. (2003, 2004)
<b>PPE42</b>	<i>rv2608</i>	Potencial antígeno de cel-B.	Predominante em resposta imune humoral.	Chakhaiyar et al. (2004)
<b>PPE44</b>	<i>rv2770c</i>	Sub-unidade de Vacina anti-TB e biomarcador de <i>status</i> de infecção.	Forte resposta imune celular e humoral.	Cuccu et al. (2011), Romano et al. (2008)
<b>PPE46</b>	<i>rv3018c</i>	Potencial biomarcador de célula T.	Induz proliferação de célula T em camundongos.	Chaitra et al. (2007)
<b>PPE55</b>	<i>rv3347c</i>	Biomarcador em todos os estágios de infecção.	Respostas aos anticorpos anti-PPE55.	Singh et al. (2005)

<b>PPE57</b>	<i>rv3425</i>	Biomarcador em todos os estágios de infecção e subunidade vacinal, rBCG: Ag85B-Rv3425.	Alta produção de IgG2 e IFN- $\gamma$ . Resposta por IFN- $\gamma$ em TB e LTBI. Resposta de IgG em TB pulmonar e extrapulmonar.	Wang et al. (2008, 2009) Chen et al. (2009) Zhang et al. (2007)
<b>PPE59</b>	<i>rv3429</i>	Potencial marcador de TBdoença/infecção.	Resposta por IFN- $\gamma$ em TB e LTBI.	Chen et al. (2009)
<b>PPE68</b>	<i>rv3873</i>	Antígeno de células T.	Grande produtor de IFN- $\gamma$ .	Okkels et al. (2003)

## Justificativa

O diagnóstico da TB ativa ainda depende da suspeita clínica inicial e de alterações radiológicas, com a subsequente confirmação laboratorial por métodos microbiológicos e moleculares. Esses procedimentos retardam o diagnóstico da doença, pois o tempo que decorre entre o aparecimento dos sintomas, o diagnóstico correto e o início do tratamento pode significar maior transmissibilidade da TB na comunidade e maior morbidade para o paciente (WHO 2014; Chan et al. 2000). A pesquisa de anticorpos para o diagnóstico da tuberculose recuperou seu espaço nos últimos anos e estudos tem evidenciado o importante papel da resposta imune humoral na infecção contra *Mtb*.

A importância das diferentes classes de imunoglobulinas atuando na resposta imune humoral e exercendo importante papel estão na ordem do dia das pesquisas. IgG e suas subclasses apresentaram significativa resposta a antígenos micobacteriano como, ESAT-6 e CFP-10. IgA contra o antígeno 16kDa mostrou um potencial para imunoprevenção de TB e também protegeu camundongos após exposição com *Mtb* diminuindo o número de bactérias viáveis. Já IgM ainda não teve seu potencial bem esclarecido (Acosta et al. 2013). Esses dados apontam que os anticorpos são parte importante no sistema imunológico e podem ser usados no melhoramento de vacinas, tratamento, prevenção de diagnóstico da TB.

Até o momento, apesar de vários kits comerciais estarem disponíveis no mercado, nenhum deles contém marcadores cuja acurácia de reconhecimento, pela resposta imune do hospedeiro seja adequada para auxiliar no diagnóstico sorológico da TB em diferentes áreas endêmicas. A OMS, revisando estes testes sorológicos, tanto para TB pulmonar quanto para TB extrapulmonar, demonstrou que os mesmos possuem valores de sensibilidade e especificidade variáveis associadas a estudos em diferentes áreas geográficas, além de resultados falsos positivos e falsos negativos (WHO 2013). Estudos recentes demonstraram que a família de proteínas PE/PPE tem importante papel na patogênese, virulência e evasão do bacilo durante a infecção. Essas duas famílias são também responsáveis por induzir resposta imune humoral e celular (Kunnath-Velayudhan et al. 2013). Desse modo, explorar essas famílias pode revelar antígenos promissores no diagnóstico da tuberculose. Previamente, nosso grupo clonou com sucesso o gene *rv3429*, que codifica a proteína PPE59 pertencente à subfamília PPE, cujas proteínas membro possuem baixa homologia, na região C terminal, com outras espécies micobacterianas. Entretanto não se sabe se a proteína expressa por este gene é um marcador suficientemente sensível e/ou específico na identificação de biomarcadores imunológicos em pacientes com TB.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Expressar e purificar a proteína codificada pelo gene *rv3429* (PPE59) de *Mtb* e efetuar sua avaliação imunológica em indivíduos com TB e controles.

### Objetivos específicos

1. Expressar a proteína recombinante em cepa de *E.coli*;
2. Purificar a proteína recombinante;
3. Estimar a imunorreatividade da proteína recombinante através de teste imunoenzimático “*in house*” para IgG, IgM e IgA em espécimes clínicos de pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar.
4. Avaliar a imunorreatividade à PPE59 em pacientes de diferentes áreas geográficas.
5. Correlacionar a reatividade à PPE59 com as características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes.
6. Correlacionar a positividade da PPE59 com outros antígenos específicos na imunoreatividade na tuberculose.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### **Tipo de estudo**

Estudo transversal, observacional, com expressão e purificação proteica da proteína PPE59 e avaliação da imunorreatividade por detecção de imunoglobulina A, G e M, em amostras de soro de pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar e de indivíduos com outros agravos respiratórios.

#### **Expressão e Purificação da proteína**

##### *Expressão da proteína PPE59 por indução de IPTG*

O gene *rv3429*, que codifica a proteína PPE59 foi previamente clonado em nosso laboratório e, para este estudo, a confirmação da inserção do fragmento alvo em *E. coli* (Dh5 $\alpha$ ) foi realizada pela técnica de PCR. A *E. coli* recombinante foi cultivada em 10 mL de meio Luria Bertani (LB), contendo 100 ug/mL de ampicilina a 37°C/22 horas, sob agitação (200 rpm). O crescimento obtido foi subcultivado em 100 mL de meio LB e incubado como anteriormente descrito até obter leitura em espectrofotômetro, densidade ótica no comprimento de onda de 600nm (DO<sub>600</sub>) = 0,6 a 0,8. Posteriormente, uma alíquota do crescimento foi retirada para controle, antes da indução com o Isopropil  $\beta$ -D-1-thiogalactopiranosideo (IPTG), então adicionado na concentração final de 1mM. Durante o período de até 6 horas, foram retiradas a cada hora uma alíquota para determinar o melhor tempo de indução. Em seguida, cada alíquota foi centrifugada a 13.000 rpm/1 minuto (Beckman J2 21M/ E centrifuge, USA). Desprezado o sobrenadante, as células dos sedimentos foram ressuspensas em 100 $\mu$ l de tampão de lise (NaCl 300mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM; Imidazol 10mM) e, após adição de lisozima, na concentração final de 1mg/mL, foram incubadas por 30 minutos em balde de gelo. Depois de centrifugadas, como descrito acima, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de centrífuga limpos. O restante da cultura foi centrifugado a 10.000 rpm/ 30 minutos e o pellet foi armazenado no freezer a -70 ou 22 horas/-20°C. As proteínas expressas em diferentes tempos foram preparadas e analisadas em gel de poliacrilamida.

### *Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)*

A análise da proteína expressada em diferentes tempos e a análise de pureza foram efetuadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). O gel de poliacrilamida foi preparado adicionando solução de acrilamida a 12%, TRIS 1,5M, SDS 0,1%, Persulfato de Amônio-APS 0,05% e TEMED. Após a aplicação da solução de acrilamida entre as placas de vidro, com isolamento do ar atmosférico utilizando isopropanol para uma melhor polimerização, o material foi deixado em repouso à temperatura ambiente até a sua solidificação. Após a retirada do isopropanol, cujos resíduos foram absorvidos usando papel filtro, ocorreu a aplicação do gel de empilhamento constituído de solução de acrilamida a 3% (TRIS 1,5M, Acrilamida 3%, SDS 0,1%, APS 0,076%, TEMED). As amostras foram preparadas para aplicação no gel de poliacrilamida, através da adição de tampão de amostra (0,5M TRIS-Cl; 20mM DTT; 4% SDS, 0,2% ABF, 20% glicerol); antes da aplicação, as amostras (30µl) foram fervidas por 3 minutos. Após aplicação das diferentes alíquotas nos poços do gel, a eletroforese foi realizada em tampão de corrida (0,1% SDS; 250mM glicina; 25 mM TRIS, pH= 8,3), utilizando cuba vertical de proteína (BIORAD, Califórnia, USA) na voltagem de 120V. O tempo de corrida foi estimado de acordo com a saída do tampão de amostra do gel.

Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de azul de Coomassie (Coomassiebrilliant Blue R-250 - ThermoScientific, USA-, 50% de Metanol, 10% de ácido acético) por no mínimo 30 minutos, sendo em seguida descorado com uma solução descorante (metanol 40%, ácido acético 10%). Os géis foram guardados em água destilada até serem digitalizados usando *scanner* multifuncional HP Photosmart (Hewlett-Packard Development Company, Houston, Texas, USA).

### *Western Blot*

Após a eletroforese em SDS-PAGE, para confirmar a expressão e a pureza da preparação, o gel de poliacrilamida foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (BIORAD, Califórnia, USA), que foi equilibrada em tampão de transferência gelado (39mM glicina; 48mM TRIS; 0,0375% SDS, 20% metanol) por 5 minutos. A transferência foi realizada em cuba de transferência vertical, dispendo em sanduíche a esponja, o papel de filtro, o gel, a membrana, o papel de filtro e a esponja, obedecendo esta ordem. A montagem foi depositada na cuba, que foi completada com o tampão de transferência gelado. Após a transferência, realizada a 100V durante 1 hora, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau S (2g Ponceau S; 30g ácido tricloroacético; 30g de ácido sulfosalicílico e água

destilada para 100mL) por 5-10 minutos com leve agitação; posteriormente, a membrana foi lavada com água destilada até descorar completamente. Após a retirada do corante, a membrana foi colocada num recipiente contendo 0,1 mL/cm<sup>2</sup> de solução de bloqueio (TBS1X [NaCl 150mM, TRIS 20mM] 5% leite desnatado e 0,05% Tween) e incubada por 2 horas a temperatura ambiente, com leve agitação. Seguindo-se ao descarte da solução, 0,1mL/cm<sup>2</sup> de nova solução de bloqueio, contendo anticorpo primário anti-hisTAG (GE Healthcare, USA) diluído a 1:5000, foi adicionado e incubado por 22 horas a 4°C, sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes por 15 minutos com 100mL de solução de lavagem (TBS 1X/Tween 0,01%). Após a lavagem, foi adicionada a solução de bloqueio, juntamente com o anticorpo secundário anti-IgG peroxidase (BIORAD, Califórnia, USA) diluído a 1:3000 e incubado por 1 hora. Após as lavagens, a membrana foi depositada em 3mL de solução de revelação (TMB western blot solution, Pierce, Alemanha). Após o aparecimento da banda desejada, a revelação foi parada através de lavagens com água destilada.

#### *Cultivo do clone E. coli (Dh5α) para a purificação da proteína PPE59*

Para a purificação da proteína, *E. coli* (Dh5α) com o plasmídeo recombinante, contendo a sequência alvo, foi cultivada em 10mL de meio LB contendo 100ug/ml de ampicilina, a 37°C por 22 horas sob agitação a 200 rpm. No dia seguinte, a cultura foi transferida para um frasco Erlenmeyer com 500 mL de meio LB e incubada a 37°C, sob agitação de 200 rpm, até obter-se DO<sub>600</sub>=0,6. Uma alíquota de 1mL foi então retirada antes da indução com IPTG (controle sem indução) e centrifugada. O tempo de indução com IPTG foi estabelecido de acordo com o resultado obtido no experimento descrito anteriormente. O restante da cultura foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos e as células foram armazenadas a -70 ou 22 horas a -20C até a etapa de preparo para limpar os lisados bacterianos.

#### *Lise bacteriana de E. coli (Dh5α) em condições desnaturantes*

As células foram descongeladas por 15 minutos em balde com gelo e ressuspensas em tampão de lise (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM de Tris base; 8M de Uréia, pH= 8,0) para um volume de 5 mL por grama do peso celular. Em seguida, foram adicionados 0,1M PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) e 20mM de betamercapto-etanol, com incubação de 1 hora sob leve agitação e em temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30

minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e guardado a 4°C para o processo de purificação por cromatografia de resina de níquel.

#### *Purificação da proteína recombinante através da cromatografia de resina de níquel*

A resina *His Link Protein Purification* ([www.promega.com](http://www.promega.com)) foi preparada através da adição de 1mL da mesma em tubo Falcon com 10 mL de água milli Q estéril. Após a homogeneização, o tubo foi deixado em temperatura ambiente até a resina ser depositada por completo no fundo do tubo. A água foi retirada e em seguida, foram adicionados 10mL de tampão de lise (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM de Tris base; 8M de Uréia, pH= 8,0), e homogeneizado. O tampão de lise foi removido e a solução de proteínas recombinantes foi adicionada à resina; esse material foi incubado por uma hora sob agitação a 4°C. A suspensão foi então depositada na coluna de eluição e, após a passagem do sobrenadante na coluna, a resina foi lavada com tampão (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM de Tris base; 8M de Uréia, 5 mM de Imidazol, pH= 6,0) até completar 15 mL. Em seguida, as proteínas foram eluídas com tampões de eluição com 4 diferentes concentrações de ureia-imidazol. Em cada etapa de eluição foram utilizados 3mL dos tampões, i) 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM de Tris base; 8M de Uréia, 20 mM de imidazol, pH= 8, ii) 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM de Tris base; 6M de Uréia, 100 mM de imidazol, pH= 8, iii) 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM de Tris base; 4M de Uréia, 250 mM de imidazol, pH= 8, iv) 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM de Tris base; 8M de Uréia, 200mM de ácido acético, pH= 8. Cada um dos eluatos foram armazenados a -20°C até serem resolvidos em gel de SDS-PAGE para determinar em qual eluato estava a proteína recombinante, seguindo-se a sua quantificação.

#### *Diálise da proteína recombinante purificada*

A diálise foi feita utilizando membranas de diálise (SnakeSkin, ThermoScientific, USA). Primeiramente, as membranas foram cortadas de acordo com o volume de cada eluato purificado. As membranas foram mergulhadas em 4 litros de tampão de diálise PBS 0,25x (NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), após serem vedadas em uma de suas extremidades com *clips* e os eluatos aplicados pela outra extremidade, que posteriormente também foi vedada com *clip*. As membranas foram incubadas 22 horas a 4°C sob leve agitação. No dia seguinte, os eluatos foram transferidos para um tubo tipo Falcon estéril de 15 mL para a quantificação proteica.

### *Quantificação da proteína recombinante*

Foi utilizado o kit colorimétrico “Coomassie plus” (Pierce, Rockford, USA), que é baseado no método Bradford. Modificações foram introduzidas para reduzir a tendência dos reagentes do Coomassie de gerar curvas de resposta não linear por formulação, melhorando a linearidade dos intervalos definidos da concentração da proteína. A reação foi realizada em microplacas de poliestireno. Dez microlitros de cada amostra e de cada padrão foram depositados nos respectivos poços da microplaca e 300µl do reagente Coomassie plus foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada sob agitação a 30 rpm (shaker orbital, Optronic instrumentos científicos, Brasil) por 30 segundos e depois deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 595nm (Labsystems Multiskan MS Plate Reader, USA). Os valores dos padrões foram usados para construção da curva padrão e para a obtenção da concentração proteica das preparações obtidas.

### **Caracterização da imunorreatividade da proteína PPE59**

#### *Considerações éticas*

Todas as atividades do estudo foram realizadas em conformidade com os padrões atuais de saúde e acordo com as recomendações do comitê de ética. O sangue dos pacientes foi coletado após consentimento formal, livre e esclarecido antes do início de qualquer procedimento. O estudo foi aprovado pelo comitê ética em Pesquisa do IOC (N. 560-10) e do Comitê de Ética da Clínica di Malattie Infettive - Spedali Civili do Instituto de Doenças Infeciosas e Tropicais da Universidade da Brescia, Itália, (N. 196/03-11).

#### *Crítérios de inclusão*

Foram incluídas amostras de soro de pacientes TB que tinham informações clínicas e demográficas no banco de dados, que possuíam fechamento do diagnóstico, indivíduos imunocompetentes e maiores de 18 anos.

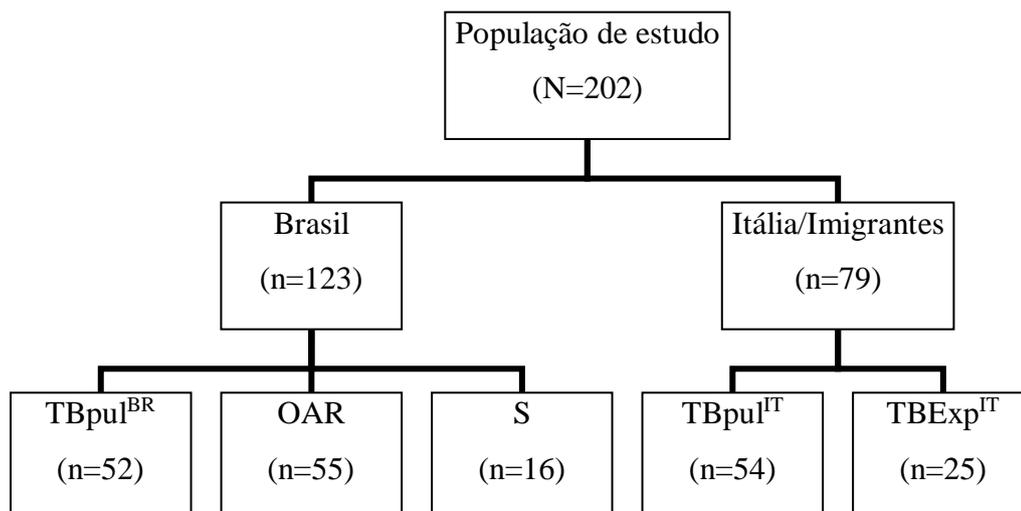
#### *Crítérios de exclusão*

Foram excluídas amostras sem dados de identificação na soroteca e com hemólise ou ausência de termo de consentimento livre e esclarecido.

### *População de Estudo*

As amostras envolvidas no estudo foram provenientes da soroteca existente em nosso laboratório. A captação das amostras foi realizada em dois diferentes locais, o primeiro; no Centro Municipal de Saúde Heitor Beltrão no período de dezembro de 2003 a dezembro de 2004 e o segundo: na Clínica di Malattie Infettive, localizada na cidade de Brescia, Itália no período de fevereiro de 2011 a fevereiro 2013.

No estudo foram arrolados 202 indivíduos, divididos em 2 populações, conforme descrito na figura 6: **i)** 123 soros de pacientes sintomáticos respiratórios recrutados prospectivamente no Centro Municipal de Saúde Heitor Beltrão (CMSHB), em estudo prévio. Este Centro de Saúde, que atende às comunidades, do entorno do bairro da Tijuca, Rio de Janeiro, é uma clínica de cuidados primários, que fornece assistência médica ambulatorial. Foram incluídos no estudo pacientes com duas amostras de escarro espontâneo ou induzido, para baciloscopia e/ou cultura, e com radiografia do tórax. A radiografia de tórax foi classificada como baixa probabilidade (R-X de tórax normal ou com sugestão para outras doenças pulmonares); Intermediário (R-X com infiltrados pulmonares); Alta probabilidade (R-X com infiltrados pulmonares e cavidades). Os pacientes tiveram o escarro coletado para baciloscopia por coloração pelo método de Ziehl-Neelsen e para cultura em Meio Lowenstein Jansen, que foram realizados no Laboratório de Micobactérias, Instituto de Microbiologia, UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro). Os soros utilizados neste estudo fizeram parte do projeto de avaliação da acurácia de diferentes antígenos utilizados na composição de kits comerciais (Silva et al, 2008), realizado em parceria com a Professora Adjunta da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Dra. Vânia M. C. Silva e com a Dra. Aline H.Cavalcanti, ambas médicas pneumologista do CMSHB. As informações clínicas e demográficas foram obtidas dos prontuários mantidos no CMSHB. Essa população foi dividida, de acordo o diagnóstico final, em: TBpul<sup>BR</sup>: indivíduos com TB pulmonar confirmada; OAR: indivíduos com diagnóstico de outras doenças respiratórias e S: participantes sem contato ou histórico conhecido de TB. **ii)** A segunda população foi constituída por 79 soros de pacientes de diferentes nacionalidades, imigrados para Brescia, Itália, e que procuraram a Clínica di Malattie Infettive - Spedali Civili do Instituto de Doenças Infeciosas e Tropicais da Universidade da Brescia. Os imigrantes eram provenientes de países da África (22, sendo 10 indivíduos do Senegal, 7 de Marrocos e 1 da Gâmbia, Gana, Kenia, Libéria, Nigéria). Ásia (34, sendo 20 indivíduos da Índia, 12 do Paquistão 2 das Filipinas), e Europa (22, sendo 12 indivíduos da Itália, 4 da Romênia, 3 da Moldávia, 2 do Kosovo e 1 da Rússia) e um indivíduo brasileiro.



**Figura 6:** Fluxograma dos grupos de pacientes analisados no presente estudo. TBpul<sup>BR</sup> e TBpul<sup>IT</sup>: grupo de indivíduos com TB pulmonar confirmada; TBExp<sup>IT</sup>: grupo de indivíduos com TB extrapulmonar confirmada; OAR: grupo de indivíduos com outras doenças respiratórias; S: grupos de indivíduos sem histórico ou contato com TB.

#### *Acondicionamento das amostras*

Todas as amostras biológicas utilizadas neste estudo foram acondicionadas de acordo com o regime interno de qualidade do laboratório. Todos os soros estavam alocados em sorotecas em temperatura de -20°C e devidamente identificados.

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

Foram utilizadas microplacas para ELISA (Nunc, flat bottom immunoplate C96 Maxisorp, Thomas Sci, USA). Nos respectivos poços da placa, foram adicionados 50µL da PPE59 em tampão carbonato-bicarbonato pH = 9,6 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15mM, NaHCO<sub>3</sub> 15mM), nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0µg/mL. Após a incubação a 37°C por duas horas, a microplaca foi lavada 3 vezes com 200µl PBSt 0,01% pH= 7,4 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 90mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18,98mM, NaCl 9,92mM, 0,01% Tween 20). Em seguida, foram adicionados a cada poço 100µL da solução de bloqueio PBSt-BSA 5% (Fraction V). O material foi incubado a 37°C por 2 horas. Após lavagem, como descrito acima, foram adicionados, nos respectivos poços, 50µL de pools de soros (positivo: contendo 10 soros de diferentes pacientes com TB ativa e negativo: contendo 10 soros de diferentes indivíduos saudáveis), diluídos seriadamente de 1:50 a 1:800 em PBSt-BSA 1% e incubados a 37°C por 1 hora. Posteriormente à lavagem, foram

aplicados 50µL dos conjugados IgA, IgG e IgM de cabra anti-humana-HRP (*horseradish peroxidase*), diluídas a 1:1000 a 1:20.000 em PBSt-BSA 1%, e incubado por 1 hora a 37°C. Após a lavagem e adição de 50µL da solução de substrato TMB (3,3',5,5' – tetrametilbenzidina, Thermo Scientific, USA), a placa foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2,5N. A placa foi lida na absorbância de 450nm no leitor de ELISA (Labsystems Multiskan MS Plate Reader, USA). Os resultados dos testes foram expressos em DO. Em cada placa, existiu um poço controle branco, cuja DO não ultrapassou 100. Em caso contrário, foi indicativo de erro operacional, sendo o teste repetido. Para minimizar as variações na DO dos *pools* por sucessivos congelamentos e descongelamentos, os mesmos foram aliqüotados em pequenos volumes, de modo que cada alíquota não foi utilizada mais de três vezes. Todos os testes foram realizados em duplicata, com valores que não deveriam exceder a 25% do valor médio das duplicatas; em caso contrário, o teste foi repetido.

A melhor concentração do antígeno, das diluições de conjugados e de espécime clínico foram determinadas. Após padronização das variáveis do teste, os soros, componentes dos respectivos *pools*, bem como o restante da amostragem foram testados individualmente.

Em todas as placas foram adicionados *pools* positivos e negativos, em quatro diluições diferentes para servir como controle das placas nos testes realizados no mesmo dia ou em dias diferentes.

### *Análises Estatísticas*

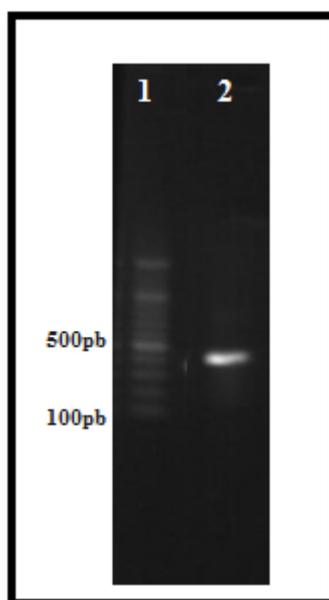
Análises estatísticas foram efetuadas usando os programas SPSS versão 20.0 e Graphpad Prism versão 6.0 para Windows. As características da população foram analisadas utilizando o teste de Chi quadrado,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Para os ensaios de padronização, os resultados foram avaliados 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 TB e controles,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A imunorreatividade da proteína PPE59 foi obtida através de densidade óptica e foram descritas como medianas com interquartil 25th e 75th. Comparação entre os resultados da DO obtidos no teste de ELISA PPE59-IgA/IgG 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 foram feitas utilizando testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney e análise multivariada de regressão linear. A positividade para PPE59 IgA e IgG foi calculada através da Curva ROC (*receiver operating characteristic*)

para obtenção dos melhores pontos de corte (*Cut-off*) para os testes. A curva foi construída utilizando o grupo TBpul<sup>BR</sup> (sensibilidade) e os grupos OAR e S (especificidade) foram utilizados combinados como controle. Foi realizada análise bivariada e multivariada (regressão logística) entre as variáveis clínicas e demográficos para avaliação da razão de chances. Correlações entre as densidades ópticas do grupo TBpul<sup>BR</sup> para IgA e IgG e entre os grupos TBpul<sup>BR</sup> e TBpul<sup>IT</sup> para IgA e IgG foram feitas através de correlação de Spearman.

## 4 RESULTADOS

### *Expressão e purificação da proteína recombinante PPE59*

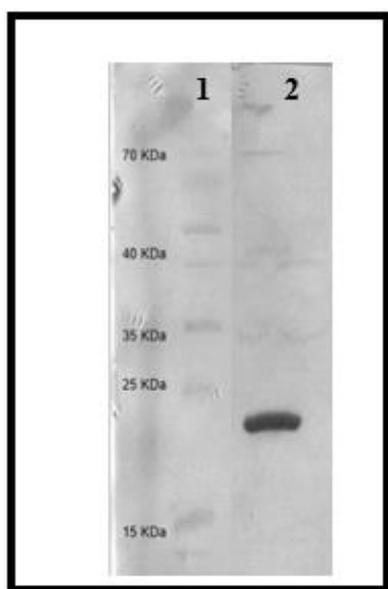
Em estudo prévio, a partir da sequência do gene alvo (*rv3429*), foram confeccionados oligonucleotídeos homólogos às sequências que flanqueiam o gene, contendo sítios de restrição para as enzimas BamH1 e HindIII. O gene alvo foi então amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do DNA genômico de *Mtb* H37Rv. O produto obtido foi então clonado no vetor de expressão pQE-80L e eletropermeabilizado em células eletrocompetentes de *E. coli* Dh5 $\alpha$ , onde foi mantido. Para o presente estudo, a sequência alvo contida no clone foi confirmada, por amplificação pela PCR, mostrando que o inserto possui tamanho esperado de 534 pares de base (Figura 7).



**Figura 7:** Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose do fragmento *rv3429* amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase). Coluna 1: Marcador DNA *Ladder* de 100 pares de bases (pb); coluna 2: produto amplificado de 534pb.

A colônia contendo o clone foi, então, induzida em meio de cultura para análise de melhores condições de expressão proteica. Foi realizada uma curva de indução por IPTG para obtenção da temperatura e tempos ótimos para expressão da proteína recombinante PPE59, em *E. coli*. Após a obtenção das alíquotas de acordo com o protocolo proposto (metodologia item 5.3.1), estas foram lisadas e submetidas à eletroforese SDS-PAGE e *Western blot*. Foi

observada a expressão da proteína recombinante PPE59 a partir da primeira hora de indução, sem corpos de inclusão. Entretanto, o melhor rendimento da expressão da PPE59 foi obtido em 3 horas de indução. Já a temperatura ótima de indução foi de 37°C. Desse modo, para a purificação da proteína recombinante foi realizada uma nova indução com IPTG, de acordo com as características acima descritas. A liberação da proteína do *pellet* celular foi realizada através de lise celular em condições desnaturantes (ureia 8M). A purificação foi realizada através de cromatografia em coluna de resina de níquel (resina His Link Protein Purification). A liberação da proteína da resina foi realizada através da diferença de concentração de imidazol e de uréia. A liberação da proteína alvo com o peso molecular esperado (21 kDa) ocorreu no eluato contendo 6M de ureia e 100mM de imididazol, visualizada pela técnica de *Western Blot* (Figura 8).



**Figura 8:** Western Blot da proteína PPE 59 (Rv3429) após processo de purificação em condições desnaturantes. Coluna 1: Marcador de peso molecular (kDa); 2: proteína PPE59 recombinante purificada (21kDa).

### **Avaliação da Imunorreatividade da proteína PPE59**

#### *Características da população*

Entre os 202 indivíduos, cujos soros foram avaliados quanto à presença de anticorpos de reconhecimento para proteína PPE59, no grupo TBpul<sup>BR</sup>), apenas um paciente não desenvolveu a forma clínica pulmonar e sim a extrapulmonar oftálmica. Entre os participantes da Itália (n=79) cerca de um terço foi diagnosticado com formas clínicas extrapulmonares

(n=25). A maioria dos TBExp<sup>IT</sup> (13/25; 52%) apresentavam a forma de TB ganglionar, já entre os TBpul<sup>IT</sup>, 22% (12/54) possuíam também formas extrapulmonares e 3/79 (3,8 %) tinham a TB disseminada. Comorbidades estavam notificadas para 8 pacientes da Itália: 1 com úlcera péptica, hipertensão, hepatite, sífilis, diabetes e aneurisma da aorta abdominal, enquanto 2 eram obesos. Havia ainda uma paciente grávida, um com recidiva de TB e 3 pacientes estavam infectados por *Mtb* resistente à isoniazida. Todos eram HIV negativos e não apresentavam histórico de doenças imunossupressoras.

No grupo OAR (n=55), 20 indivíduos possuíam algum tipo de infecção respiratória não tuberculosa, 6 indivíduos eram asmáticos, 6 tinham doença pulmonar obstrutiva crônica, 4 estavam com pneumonia, 3 sofriam de bronquiectasia, 2 eram pacientes oncológicos, 1 foi diagnosticado com granulomatose de Wegener (vasculite de origem auto-imune), 1 sofria de sinusite e 11 indivíduos, além de apresentarem sintomatologia respiratória, eram contatos recentes de pacientes com TB ativa.

A Tabela 2 sumariza as principais características clínicas, demográficas e laboratoriais dos participantes do estudo. A maioria dos pacientes com TB, tanto do Brasil quanto os imigrantes na Itália, eram do sexo masculino, não foi encontrada diferença de média de idade entre os pacientes (p=0,28) e a maioria se encontrava na faixa de idade adulta e produtiva. É interessante notar que o hábito tabagista foi mais elevado entre os pacientes do Brasil (42,3% x 15,1%, p<0,037). A variável ingestão de bebida alcoólica não está disponível para os pacientes imigrantes na Itália, mas os TBpul do Brasil mostraram ter este hábito significativamente mais frequente que entre os participantes com OAR (38,4% x 14%). Considerando os testes laboratoriais, a maioria dos pacientes TBpul<sup>BR</sup> eram fortes reatores ao TCT ( $\geq 10$  mm) comparados aos da Itália (73% x 31,6%), mas o rendimento dos exames de diagnóstico, baciloscopia (63,3 % x 57,6 %) e cultura para micobactérias (44,3% x 28,78%) foram mais elevados para os pacientes imigrantes na Itália. Portanto, a maioria (96,2%) dos imigrantes foi diagnosticado por ensaio microbiológico, exceto três pacientes que o foram por critérios clínicos e histopatológicos, sendo 2 da forma clínica extrapulmonar, enquanto no Brasil este percentual foi menor (86,5%). O critério radiológico, alterações no tórax de alta probabilidade, para auxiliar o diagnóstico da TB, foi significativamente mais elevado na TBpul<sup>BR</sup> (59,6%) enquanto alterações intermediária ou de baixa probabilidade estiveram mais associadas a TBpul<sup>IT</sup> (46,2%) e TBExp<sup>IT</sup> (68%). A variável tempo de tratamento não estava disponível para os pacientes TBpul<sup>BR</sup>, mas entre os TB imigrantes na Itália a maioria estava tratada  $\leq 60$  dias (74,7%) no momento da coleta de amostras, entretanto quase metade dos TBExp<sup>IT</sup> (48%) estavam tratados a  $>60$  dias. Testes com Quantiferon TB Gold, indicados para detecção de TB/TB latente, estavam disponíveis apenas para a população de imigrantes e sua

positividade foi alta entre os que realizaram o teste (28/34, 82,3%). A vacinação por BCG não está relatada nas populações de imigrantes, mas no Brasil observou-se que todos os indivíduos do grupo controle sadio (S) apresentavam a escara da vacina e eram significativamente mais jovens ( $p=0,02$ ) que os participantes dos outros grupos. A presença da marca vacinal cai para menos de 50% entre os OAR e para 1/3 dos TBpul<sup>BR</sup>. Por outro lado, os grupos não reatores ao TCT (<5 mm) estão na ordem inversa e decrescente, isto é, maioria dos TBpul<sup>BR</sup> (78,8 %), seguido do grupo OAR (61,8 %) e S (50 %).

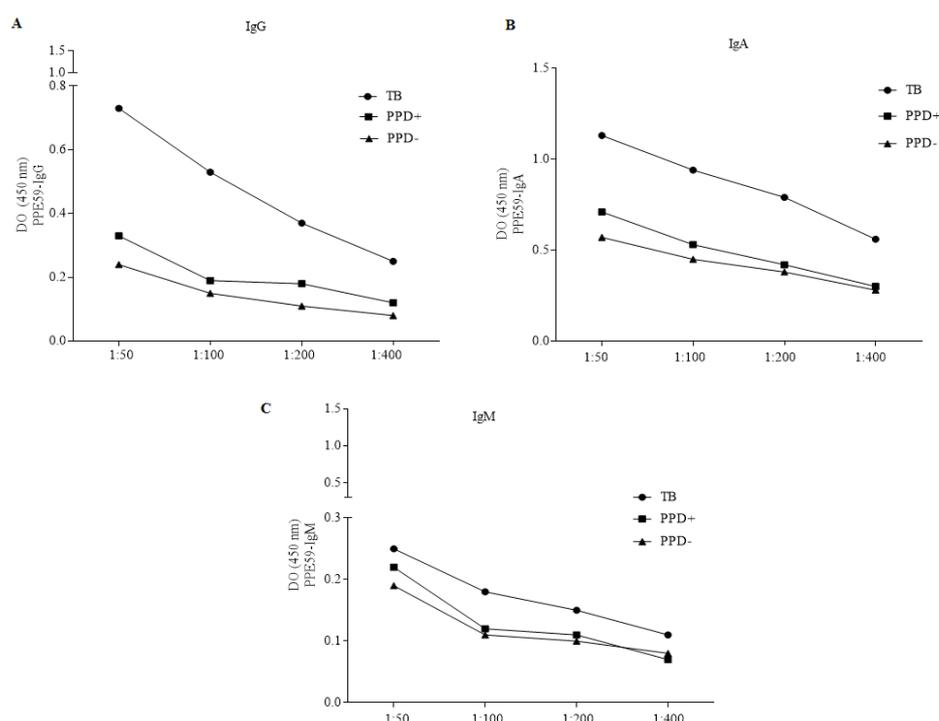
**Tabela 2:** Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos 202 indivíduos incluídos no estudo.

Características	Brasil (%) N = 123			Itália (%) N = 79		Valor de p
	TBpul <sup>BR</sup> 52	OAR 55	S 16	TBpul <sup>IT</sup> 54	TBExp <sup>IT</sup> 25	
Idade (M±DP)	45,7±18,2*	49,1±18,8	33,8±11,3*	39,4±16,9	41,9±15,6	0,02
Masculino	35 (67)*	25 (45)	6 (37,5)	42 (78)*	12 (48)	0,037
Consumo de álcool	20 (38,4)*	8 (14)	NA	NA	NA	0,009
Tabagismo	22 (42,3)*	12 (21,4)	NA	7 (13)	5 (20)	0,038
Cicatriz da BCG	20 (38,4)	27 (49)	16 (100)*	NA	NA	0,000
<b>TCT</b>						
≥10 mm	38 (73)*/**	28 (50)	5 (31)	17 (31,4)**	8 (32)	0,032
5-9 mm	3 (5,7)	6 (11)	3 (18,7)	1 (1,8)	NA	
0-4 mm	4 (7,7)	21 (38,2)	8 (50)	NR	NR	
<b>Baciloscopia</b>						
BAAR positivo	30 (57,6)	NR	NR	39 (72,2)	11 (44)	
<b>Cultura para Mtb.</b>						
Positiva	15 (28,8)*	NR	NR	18 (33)**	17 (68)*/**	0,008
Negativa	8 (15,3)	NR	NR	1 (1,8)	2 (8)	
<b>QuantiFeron TB Gold</b>						
Positivo	NR	NR	NR	20 (37)	8 (32)	
Negativo				7 (12,9)	3 (12)	
<b>Alterações ao R- X de tórax</b>						
Baixa probabilidade	10 (19,2)**	52 (92,8)*/#	NR	1 (1,8)**	17 (68)**/#	0,009
Intermediário	10 (19,2)*/**	2 (3,5)	NA	25 (46,2)	6 (24)	0,025
Alta probabilidade	31 (59,6)*/**	1 (1,8)	NA	20 (37)	NA	0,033
<b>Tratamento anti-TB</b>						
≥60 dias	NA	NA	NA	10 (18,5)	12 (48)**	0,014
≤60 dias				46 (85,1)	13 (52)	

NA: não se aplica; NR: não realizado; M±DP: média±desvio padrão; N (%): número e porcentagem; TBpul<sup>BR</sup>: pacientes do Brasil com TB confirmada; OAR: pacientes com outros agravos respiratórios; S: indivíduos sem histórico ou contato conhecido com TB; TBpul<sup>IT</sup> e TBExp<sup>IT</sup>: pacientes imigrantes que abriram quadro de TB pulmonar e/ou extrapulmonar na Itália. #:  $\chi^2$  teste exato de fisher, \*/\*\*  $p>0,05$ .

### Padronização do ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay) in house

Para avaliar a imunorreatividade da proteína recombinante PPE59, inicialmente foi realizada a padronização de ELISA *in house* utilizando diluições seriadas (1:50 a 1:400) com *pool* de soros de pacientes com TB pulmonar (*pool* positivo) e *pool* de soros de S TCT+ e *pool* de soros de S TCT- (*pool* negativos). Os *pools* foram confeccionados utilizando 50  $\mu$ L de 10 amostras dos pacientes com TBpul<sup>BR</sup> confirmada e de controles. Os antígenos foram diluídos nas concentrações de 0,25 $\mu$ g/mL, 0,5 $\mu$ g/mL e 1,0  $\mu$ g/mL. Foram testadas diluições seriadas do conjugado (1:1.000 a 1:20.000). Como mostrado na Figura 9, para os testes de IgG e IgA-PPE59 a reatividade do *pool* de TBpul<sup>BR</sup> (DO: 0,73 e 1,131) foi significativamente maior ( $p < 0,02$ ) que a dos *pools* dos controles (0,330; 0,239 e 0,710; 0,566, respectivamente). Na padronização do teste para IgM-PPE59 não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os *pools* de TBpul<sup>BR</sup> e controles (0,248 x 0,220 x 0,192,  $p = 0,17$ ).



**Figura 9:** Resultados da padronização de ELISA com a proteína recombinante PPE 59 utilizando *pools* de indivíduos com tuberculose pulmonar (TB) e de controles (PPD+ e PPD-), respectivamente. (A) IgG-PPE59; (B) IgA-PPE59 e (C) IgM-PPE59. Resultados expressos em densidades óticas (DO).

Assim, foram estabelecidas concentrações para o uso do antígeno PPE59 de 0,5 e 1  $\mu$ g/mL para os ensaios com IgA e IgG, respectivamente. A melhor diluição dos *pools* de soros

foi de 1:50 para ambos os ensaios e as diluições dos conjugados foram determinadas de 1:2500 e 1:10.000 para ELISA-IgA e IgG, respectivamente (Tabela 3). Os resultados de IgM mantiveram-se inconclusivos mesmo após testar os *pools* de soros individualmente, pois com as DOs obtidas não foi possível separar significativamente os diferentes grupos testados, assim não prosseguimos com os testes para ELISA-IgM PPE59.

**Tabela 3:** Condições definidas na padronização do ELISA-IgG e IgA para determinação da imunorreatividade da proteína PPE59.

<u>Variáveis</u>	<u>Conjugados</u>	
	<u>Anti-IgA</u>	<u>Anti-IgG</u>
Concentração do Ag ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,5	1,0
Diluição de trabalho ( <i>pool</i> )	1:50	1:50
Diluição do conjugado	1:2500	1:10.000

Ag: antígeno;  $\mu\text{g/mL}$ : micrograma por mililitro.

#### *Avaliação da imunorreatividade da proteína recombinante PPE59 com soros individualizados*

As medianas das DOs ao ELISA IgA-PPE59 foram mais elevadas que para IgG em todos os grupos testados, mas as medianas mais elevadas estavam associadas a pacientes TB do Brasil, embora sem diferença significativa (Tabela 4, figura 10). Para o ELISA-IgA diferença foi encontrada entre todos os grupos do Brasil ( $p < 0,05$ ), diferentemente do grupo de imigrantes TBpul<sup>IT</sup> x TBExp<sup>IT</sup> ( $p = 0,09$ , tabela 4). Embora sem diferença significativa, observou-se que as medianas das DOs ao ELISA IgA-PPE59 dos pacientes TBpul africanos (DO: 0,924) e asiáticos (DO 0,890) tendem a ser mais elevadas que dos europeus (DO: 0,738,  $p > 0,31$ ), enquanto para os TBExp<sup>IT</sup> esta tendência está associada aos asiáticos (DO: 0,866 x 0,609 e 0,595,  $p > 0,23$ , Tabela 4 e Figura 12). Estes resultados, portanto, influenciaram a tendência de menor mediana obtida para os TBpul<sup>IT</sup> comparados com os TBpul<sup>BR</sup> (tabela 4 e figuras 10 e 12), embora sem diferença significativa ( $p = 0,113$ ). Para o ELISA-IgG, a diferença de mediana foi significativa entre TBpul<sup>BR</sup> e TBpul<sup>IT</sup> (DO: 0,317 x 0,435  $p = 0,001$ ) (Tabela 4 e Figura 12). As Dos entre os grupos africanos, asiáticos e europeus foram menos elevadas que para IgA e não houve diferença entre as medianas dos pacientes de diferentes origens ( $p > 0,75$ ),

**Tabela 4:** Medianas das reatividades obtidas no teste de ELISA-IgA e IgG para a proteína PPE59.

Grupos	Número	ELISA-IgA PPE59				
		Mínimo	25%	Mediana	75 %	Máximo
TBpul <sup>BR</sup> *	52	0,239	0,8630	1,039ab	1,142	1,455
TBpul <sup>IT</sup> **	54	0,411	0,621	0,886	1,206	1,587
África	18	0,423	0,515	0,924	1,277	1,510
Ásia	16	0,411	0,623	0,890	1,210	1,459
Europa	16	0,421	0,633	0,738	1,147	1,587
TBExp <sup>IT</sup> **	25	0,271	0,503	0,663	1,067	1,556
África	4	0,271	0,300	0,609	1,006	1,064
Ásia	15	0,344	0,532	0,866	1,155	1,556
Europa	6	0,332	0,448	0,593	0,851	1,212
OAR*	55	0,184	0,487	0,758ac	0,916	1,042
Sadios*	16	0,364	0,384	0,525bc	0,735	0,858

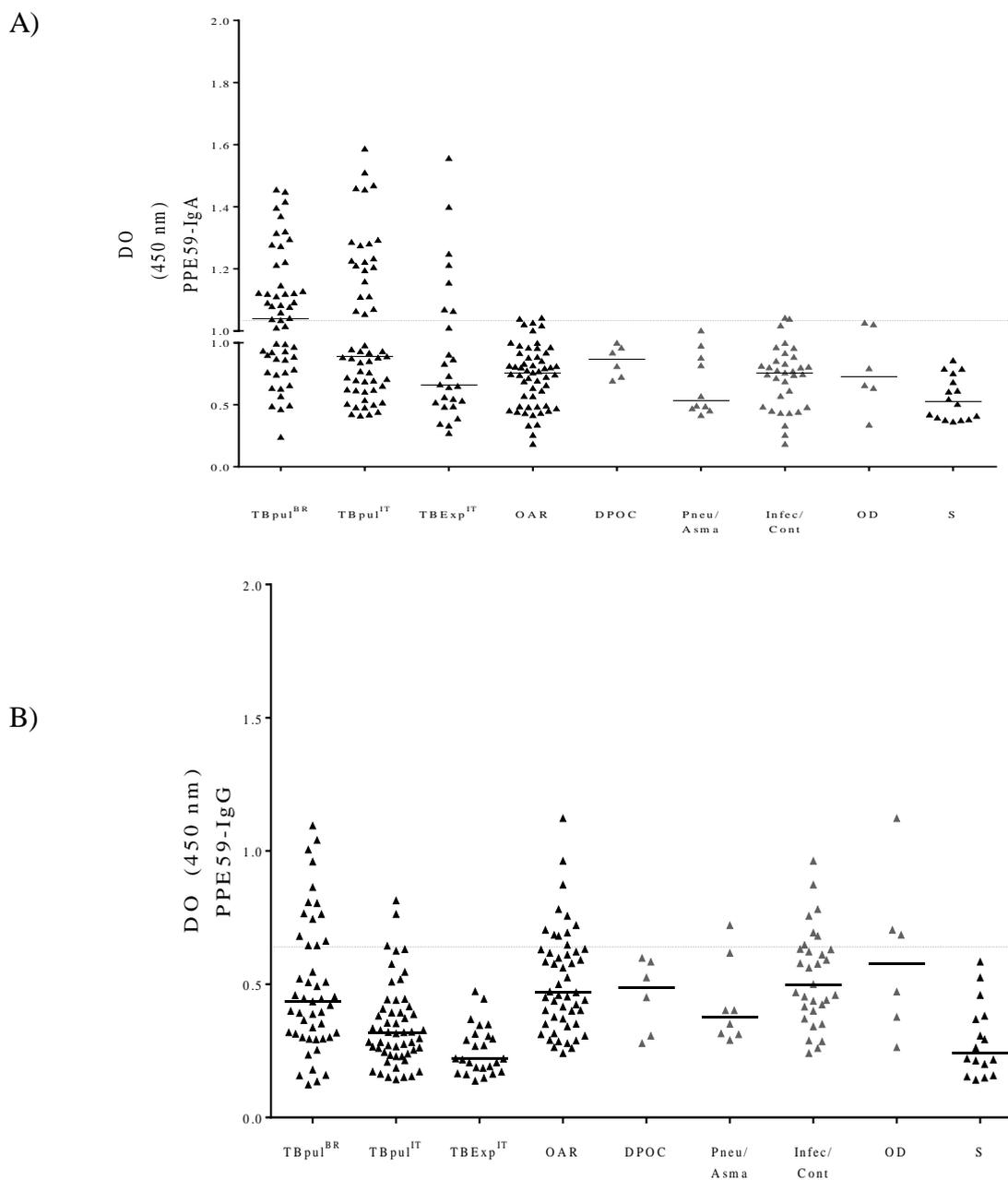
Resultados expressos em densidade ótica. \* teste de Kruskall Wallis, \*\* teste de Man-Whitney. (IgA)\* teste de Kruskall Wallis,  $p < 0,00$  \*\* teste de Man-Whitney,  $p = 0,09$ ; a: TBpul<sup>BR</sup> X OAR,  $p = 0,00$ ; b: TBpul<sup>BR</sup> X S,  $p = 0,00$ ; c: OAR X S,  $p = 0,05$ ; TB África x TB Ásia  $p = 0,71$ ; TB África x TB Europa  $p = 0,56$ ; TB Ásia x TB Europa  $p = 0,31$ ; TBExp Ásia x TBExp África  $p = 0,23$ ; TBExp Ásia x TBExp Europa  $p = 0,25$ ; TBExp África x TBExp Europa  $p = 0,82$ .

ELISA-IgG PPE59						
Soros	Número	Mínimo	25%	Mediana	75 %	Máximo
TBpul <sup>BR</sup> *	52	0,123	0,301	0,435 <sup>ac</sup>	0,662	1,095
TBpul <sup>IT</sup> **	54	0,142	0,237	0,317 <sup>c</sup>	0,409	0,814
África	18	0,140	0,249	0,268	0,473	0,814
Ásia	16	0,172	0,234	0,319	0,393	0,546
Europa	16	0,151	0,196	0,330	0,429	0,644
TBExp <sup>IT</sup> **	25	0,137	0,178	0,220	0,309	0,473
África	4	0,185	0,190	0,211	0,313	0,346
Ásia	15	0,137	0,187	0,267	0,305	0,445
Europa	6	0,148	0,159	0,196	0,380	0,473
OAR*	55	0,241	0,351	0,469 <sup>b</sup>	0,630	1,123
Sadios*	16	0,141	0,167	0,241 <sup>ab</sup>	0,377	0,584

TBpul<sup>BR</sup> e TBpul<sup>IT</sup>: grupo de indivíduos com TB pulmonar confirmada do Brasil e imigrantes em Itália; TBExp<sup>IT</sup>: grupo de indivíduos com TB extrapulmonar confirmada; OAR: grupo de indivíduos com outros agravos respiratórios; S: grupos de indivíduos sem histórico ou contato conhecido com TB. (IgG) \* teste de Kruskal Wallis, p=0,00 \*\* teste de Man-Whitney, p=0,00; a: TBpul<sup>BR</sup> X S, p=0,00; b: OAR X S, p=0,000; c: TBpul<sup>BR</sup> X TBpul<sup>IT</sup>, p=0,001; TB África x TB Ásia p=0,96; TB África x TB Europa p=0,96; TB Ásia x TB Europa p=0,78. TBExp<sup>IT</sup>; TBExp Ásia x TBExp África p=0,82; TBExp Ásia x TBExp Europa p=0,75; TBExp África x TBExp Europa p=0,89.

A Figura 10 mostra a distribuição das densidades ópticas, bem como os *cut-offs*, obtidos nos testes IgA e IgG-PPE59, respectivamente. No grupo TBpul<sup>BR/IT</sup> e TBExp<sup>IT</sup>, observa-se no ELISA IgA-PPE59 maior dispersão de reatividade quando comparado com os grupos OAR e S (p=0,005). As DOs obtidas para IgG-PPE59 entre os OAR mostra reatividade cruzada e sem reconhecimento diferencial desta proteína pelo TBExp<sup>IT</sup>, embora um pequeno grupo de pacientes TBpul<sup>BR/IT</sup> a reconheçam com menor reatividade do que para IgA. É interessante notar que o grupo de pacientes com infecção/contatos de TB é que está contribuindo majoritariamente para as reatividades cruzadas em IgG.

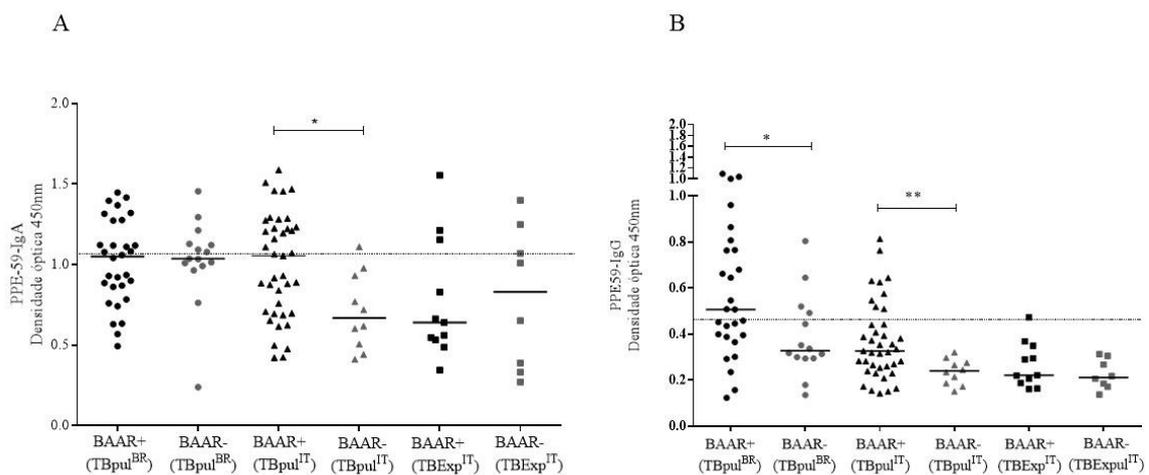
**Figura 10:** Distribuição da reatividade dos soros de pacientes com TB pulmonar do Brasil e Itália (TBpul<sup>BR/IT</sup>) e extrapulmonar da Itália (TBExp<sup>IT</sup>), pacientes com outros agravos respiratórios (OAR) e indivíduos sadios (S) em ensaios de ELISA IgA (A) e IgG (B) para o antígeno PPE-59.



OAR: outros agravos respiratórios tais como DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; Pneu: Pneumonia e Asma; Infec/Cont: Infecção/Contato TB; OD: outras doenças como câncer, bronquiectasia, granuloma de Wegener. S: indivíduos sem histórico ou contato conhecido com TB. Linha tracejada: A)  $cut-off = IgA (1,03)$ . B)  $cut-off = IgG (0,65)$ .

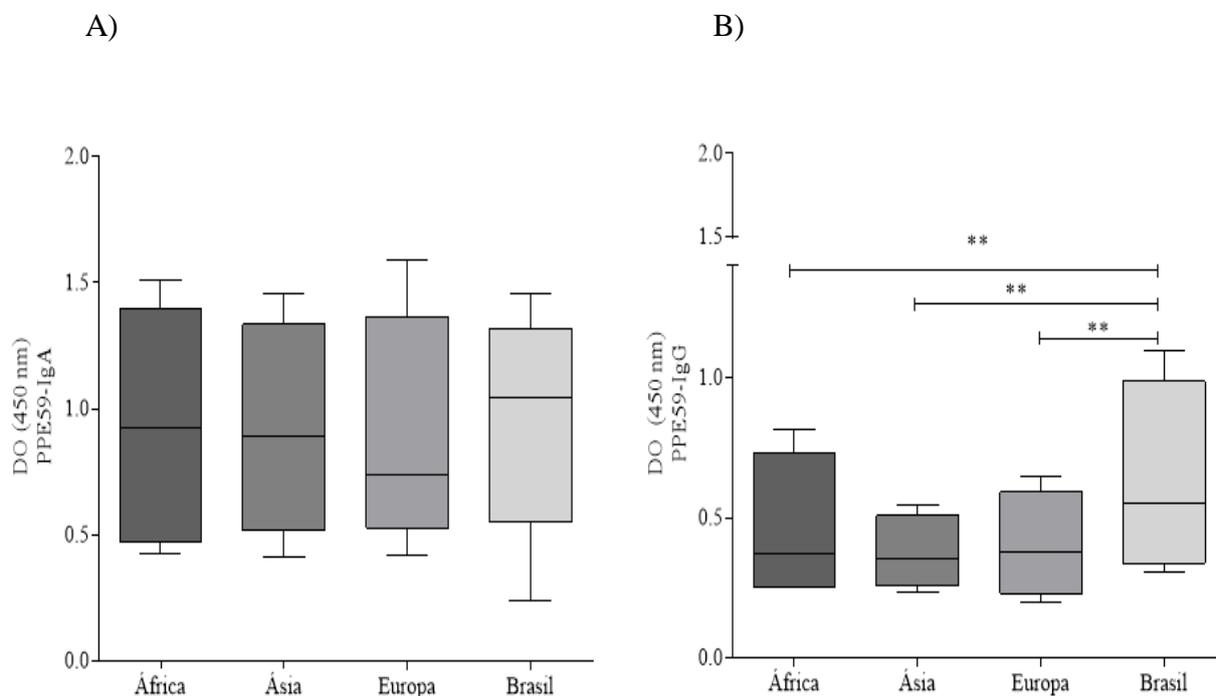
A figura 11 mostra a distribuição da densidade óptica em relação a baciloscopia positiva e negativa entre os grupos TBpul<sup>BR</sup> e TB<sup>IT</sup> (pul e Exp). Para IgA (figura 11 A) foi visto melhor reconhecimento entre a população de imigrantes com TB pulmonar com BAAR+ do que entre os que são BAAR- e existe diferença estatística entre eles. Enquanto que na população brasileira e nos indivíduos imigrantes com TB extrapulmonar o reconhecimento de IgA foi semelhante entre os BAAR+ e os BAAR-. Na figura 11 B foi observado que IgG foi melhor reconhecida entre os indivíduos com BAAR+ tanto entre os brasileiros quanto entre os imigrantes e havendo diferença estatística entre os grupos e, os imigrantes com TB extrapulmonar apresentaram DOs mais baixas em relação aos brasileiros e imigrantes com TB pulmonar.

**Figura 11:** Distribuição da reatividade dos soros de pacientes com TB pulmonar do Brasil e Itália (TBpul<sup>BR/IT</sup>) e extrapulmonar da Itália (TBExp<sup>IT</sup>) com baciloscopia positiva (+) e negativa (-) para IgA (A) e IgG (B).



TBpulBR e TBpulIT: grupo de indivíduos com TB pulmonar confirmada do Brasil e imigrantes em Itália; TBExpIT: grupo de indivíduos com TB extrapulmonar confirmada BAAR + (baciloscopia positive); BAAR – (baciloscopia negative). \*/\*\*man-whitney p>0,05

**Figura 12:** Box plot dos resultados dos ensaios ELISA IgA-PPE59 (A) e IgG-PPE59 (B) para os grupos de pacientes com TB pulmonar do Brasil e Itália (TBpul<sup>BR/IT</sup>), subdividido de acordo com a região de origem (África, Ásia ou Europa).



Resultados em mediana (interquartis de 25th e 75th). (IgA) África x Brasil  $p=0,56$ ; Ásia x Brasil  $p=0,25$ ; Europa x Brasil  $p=0,70$ ; África x Ásia  $p=0,71$ ; África x Europa  $p=0,56$ ; Ásia x Europa  $p=0,31$ . (IgG) \*\* África x Brasil  $p=0,00$ ; \*\* Ásia x Brasil  $p=0,00$ ; \*\* Europa x Brasil  $p=0,00$ ; África x Ásia  $p=0,96$ ; África x Europa  $p=0,96$ ; Ásia x Europa  $p=0,78$ . \*

*Avaliação da imunorreatividade da proteína recombinante PPE59 de acordo com as características demográficas e clínicas da população de estudo*

No grupo do Brasil, IgA-PPE59 mostrou diferença estatística em todas as variáveis relacionadas às informações demográficas e laboratoriais ( $p \leq 0,05$ ), exceto para a variável idade ( $p=0,15$ ). Na análise multivariável de regressão linear, nenhuma variável apresentou associação significativa com IgA-PPE59, quando comparadas em conjunto, exceto o grupo TBpul<sup>BR</sup> ( $p=0,000$ ), embora o modelo tenha estabelecido um valor de R moderado ( $R^2=0,389$ ) (Tabela 5 e Tabela 6A). Quando analisadas as variáveis de acordo com o diagnóstico clínico/laboratorial dos grupos estudados, observou-se que para IgA-PPE59 há diferença entre as médias de reatividade no grupo TBpul<sup>BR</sup> apenas para os do sexo masculino e com alteração da imagem radiográfica de tórax intermediária e de alta probabilidade ( $p=0,05$  e  $p=0,02$ , respectivamente). No grupo OAR, a diferença entre as médias só foi encontrada para a

presença da escara do BCG ( $p=0,02$ ), enquanto no grupo S nenhuma variável mostrou diferença estatística para IgA-PPE59. Para IgG-PPE59 foi encontrada diferença entre as médias apenas no grupo TBpul<sup>BR</sup> com baciloscopia positiva ( $p=0,03$ ).

No grupo dos imigrantes, a reatividade média de IgA-PPE59 foi significativa mais elevada em pacientes com BAAR positivo ( $p=0,04$ ) e a análise de regressão linear confirma essa associação ( $p=0,03$ ). Embora sem consonância na análise de reatividade média, os grupos TBpul<sup>IT</sup> e TBExp<sup>IT</sup> mostraram associação negativa significativa em relação a TBpul<sup>BR</sup> ( $p=0,012$  e  $p=0,008$ , respectivamente) (Tabela 5 e Tabela 6B).

No ELISA-IgG PPE59, foi observado diferença significativa na reatividade média apenas para os estilistas do Brasil ( $p=0,03$ ), mas isto não foi confirmado na análise de regressão linear ( $p=0,09$ ). A análise de regressão linear mostra associação negativa da reatividade de IgG com o sexo masculino ( $p=0,013$ ) e cultura positiva para *Mtb* ( $p=0,045$ ), já para TB ( $p=0,028$ ) e OAR ( $p=0,001$ ) a associação é significativamente positiva (Tabelas 5 e 6C).

Entre os imigrantes, somente as variáveis idade <40 anos, tabagista, tratamento anti-TB <60 dias e BAAR positivo mostraram diferença significativa entre as médias de reatividade de ELISA IgG PPE59 ( $p<0,05$ ), mas a análise de regressão linear confirma a associação apenas para tabagismo e BAAR positivo ( $p=0,05$  e  $p=0,002$ , respectivamente). Os grupos TBpul<sup>IT</sup> ( $p=0,003$ ) e TBExp<sup>IT</sup> ( $p=0,000$ ) também mostraram ser significativos, mas ao contrário da IgA a associação foi negativa (Tabelas 5 e 6D).

**Tabela 5:** Análise de reatividade de ELISA-IgA e IgG PPE59, expresso em média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ), das densidades óticas para as características demográfica dos 202 indivíduos do estudo.

Características	Brasil		Itália	
	Média ± Desvio Padrão / Valor de p		Média ± Desvio Padrão / Valor de p	
	IgA	IgG	IgA	IgG
Masculino	<b>0,898±0,294</b>	0,473±0,239	0,905±0,344	0,312±0,152
Feminino	0,718±0,261	0,469±0,207	0,791±0,323	0,318±0,125
Idade >40 anos	0,848±0,278	<b>0,509±0,235</b>	0,807±0,367	<b>0,261±0,110</b>
Idade <40 anos	0,775±0,307	<b>0,429±0,206</b>	0,920±0,317	<b>0,350±0,155</b>
Etilista	<b>0,944±0,330</b>	<b>0,553±0,249</b>	NR	NR
Não etilista	0,775±0,271	<b>0,448±0,213</b>	NR	NR
Tabagismo	<b>0,933±0,299</b>	0,530±0,256	0,883±0,320	<b>0,380±0,181</b>
Não tabagista	<b>0,768±0,280</b>	0,448±0,208	0,751±0,295	<b>0,276±0,122</b>
Trat anti-TB ≥60 dias	ND	ND	0,757±0,313	<b>0,255±0,092</b>
Trat anti-TB ≤60 dias	ND	ND	0,895±0,347	<b>0,329±0,151</b>
Marca de BCG	<b>0,752±0,307</b>	0,450±0,218	NR	NR
Sem marca de BCG	<b>0,880±0,263</b>	0,493±0,230	NR	NR
TCT ≥10 mm	<b>0,852±0,301</b>	0,468±0,220	NR	NR
TCT 5-9 mm	<b>0,694±0,364</b>	0,521±0,318	NR	NR
TCT 0-4 mm	<b>0,732±0,228</b>	0,464±0,194	NR	NR
BAAR positivo	<b>1,015±0,265</b>	0,566±0,271	<b>0,947±0,345</b>	<b>0,345±0,160</b>
BAAR negativo	<b>0,800±0,260</b>	0,486±0,201	<b>0,747±0,335</b>	<b>0,231±0,057</b>
Cultura p/ <i>Mtb</i> Positiva	<b>0,976±0,313</b>	0,487±0,202	0,899±0,351	0,322±0,156
Cultura p/ <i>Mtb</i> Negativa	<b>0,794±0,265</b>	0,539±0,235	0,787±0,547	0,208±0,051
QFTB Positivo	NR	NR	0,902±0,323	0,309±0,144
QFTB Negativo	NR	NR	0,943±0,463	0,352±0,173
Raio-X- Baixa probabilidade	<b>0,700±0,232</b>	0,444±0,199	0,825±0,359	0,279±0,090
Raio-X- Intermediário	<b>1,090±0,205</b>	0,454±0,241	0,857±0,324	0,304±0,149
Raio-X- Alta probabilidade	<b>0,988±0,306</b>	0,553±0,268	0,941±0,371	0,329±0,144

p valor significativo  $\geq 0,05$ ; TCT= teste cutâneo da tuberculina; mm: milímetros; BAAR: bacilo álcool ácido resistente; QFTB: Quantiferon gold in tube TB; Raio-X: Radiografia de tórax. Negrito: variáveis significativas. ND: não disponível; NR: não realizado.

**Tabela 6:** Análise multivariada por regressão linear para as variáveis clínicas e demográficas da população de estudo para as reatividades de ELISA-IgA (A e B) e IgG (C e D) para o antígeno PPE59.

A)	<i>Modelo IgA Brasil</i> $R^2=0,389$	<i>Coefficientes não padronizados (<math>\beta</math>)</i>	<i>Coefficientes padronizados (<math>\beta</math>)</i>	<i>Valor de p</i>
Sexo				
	Masculino	-0,001	-0,002	0,988
	Feminino	1	1	1
Idade				
	>40 anos	0,002	0,004	0,973
	<40 anos	1	1	1
Alcoolismo				
	Não alcoolismo	0,093	0,127	0,255
	Tabagismo	1	1	1
Tabagismo				
	Não tabagismo	0,034	0,052	0,679
	Não tabagismo	1	1	1
Marca de BCG				
	Marca de BCG	-0,121	-0,205	0,107
	Sem Marca de BCG	1	1	1
Teste Cutâneo a tuberculina (mm)				
	0-4 mm	1	1	1
	5-9 mm	-0,186	-0,212	0,068
	$\geq 10$ mm	0,008	0,014	0,905
Baciloscopia				
	Positivo	0,094	0,128	0,482
	Negativo	1	1	1
Cultura para <i>M. tuberculosis</i>				
	Positivo	-0,195	-0,266	0,085
	Negativo	1	1	1
Alteração da imagem de R-X tórax para TB				
	Baixa probabilidade	1	1	1
	Intermediária probabilidade	0,032	0,031	0,795
	Alta probabilidade	-0,027	-0,038	0,837
Forma Clínica				
	TBpul <sup>BR</sup>	0,247	0,417	<b>0,000</b>
	OAR	-0,125	-0,144	0,096
	S	1	1	1
Constante				
		0,653		0,000

<b>B)</b>	<b>Modelo IgA Imigrantes</b> <b>R<sup>2</sup>=0,120</b>	<b>Coefficientes não padronizados (<math>\beta</math>)</b>	<b>Coefficientes padronizados (<math>\beta</math>)</b>	<b>Valor de p</b>
Sexo				
Masculino		0,053	0,081	0,397
Feminino		1	1	
Idade				
>40 anos		-0,080	-0,129	0,190
< 40 anos		1	1	1
Alcoolismo		0,067		
Não alcoolismo		1		
Tabagismo		0,062	0,098	0,329
Não tabagismo		1	1	1
Teste cutâneo a tuberculina (mm)				
0-4 (Ref)		1	1	1
5-9		0,166	0,054	0,639
$\geq 10$		0,084	0,121	0,372
Baciloscopia				
Positivo		0,196	0,271	<b>0,033</b>
Negativo		1	1	<b>1</b>
Cultura para <i>M. tuberculosis</i>				
Positivo		-0,114	-0,115	0,361
Negativo		1	1	1
Alteração da imagem de R-X tórax para TB				
Baixa probabilidade		1	1	1
Intermediária probabilidade		-0,017	-0,024	0,878
Alta probabilidade		-0,022	-0,030	0,860
Forma clínica				
TBpul <sup>BR</sup>		1	1	1
TBpul <sup>IT</sup>		-0,175	-0,265	<b>0,012</b>
TBExp <sup>IT</sup>		-0,220	-0,286	<b>0,008</b>
Constante		0,956		0,000

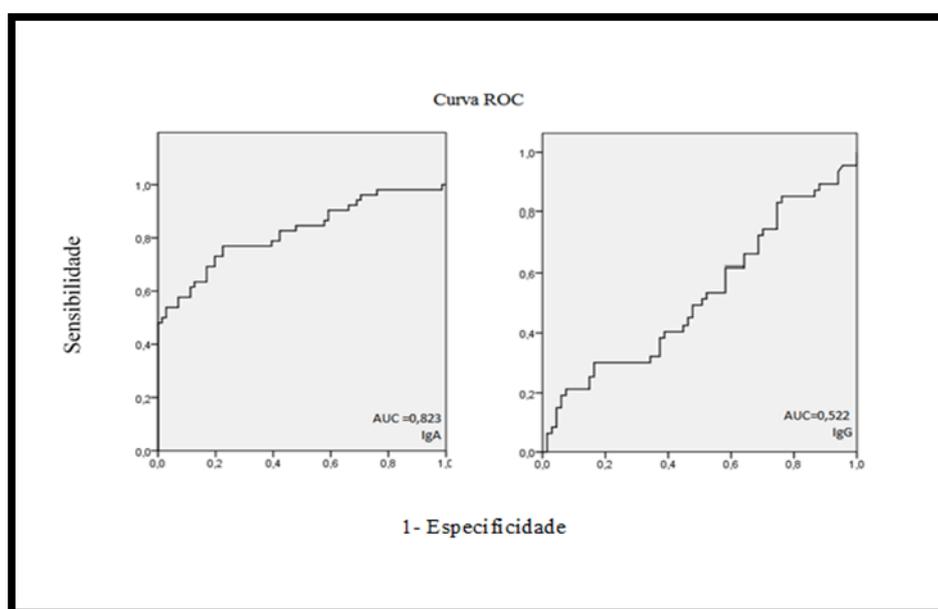
C)	<i>Modelo IgG Brasil</i> $R^2=0,218$	<i>Coefficientes não padronizados (<math>\beta</math>)</i>	<i>Coefficientes padronizados (<math>\beta</math>)</i>	<i>Valor de p</i>
Sexo				
Masculino		-0,128	-0,308	<b>0,013</b>
Feminino		1	1	1
Idade				
>40 anos		0,070	0,168	0,222
< 40 anos		1	1	1
Alcoolismo		0,106	0,202	0,090
Não alcoolismo		1	1	1
Tabagismo		0,036	0,080	0,559
Não tabagismo		1	1	1
Marca de BCG		0,017	0,042	0,770
S/Marca de BCG		1	1	1
Teste cutâneo da tuberculina (mm)				
0-4 mm		1	1	1
5-9 mm		-0,075	-0,110	0,349
$\geq 10$ mm		-0,057	-0,134	0,276
Baciloscopia				
Positivo		0,185	0,361	0,064
Negativo		1	1	1
Cultura para <i>M. tuberculosis</i>				
Positivo		-0,168	-0,328	<b>0,045</b>
Negativo		1	1	<b>1</b>
Alteração da imagem de R-X tórax para TB				
Baixa probabilidade		1	1	1
Intermediária probabilidade		-0,079	-0,108	0,391
Alta probabilidade		-0,033	-0,065	0,735
Forma Clínica				
TB		0,234	0,528	<b>0,028</b>
OAR		0,239	0,575	<b>0,001</b>
S		1	1	
Constante		-0,511		0,000

<i>D)</i>	<i>Modelo IgG imigrante</i> <i>R<sup>2</sup>= 0,292</i>	<i>Coefficientes não padronizados (β)</i>	<i>Coefficientes padronizados (β)</i>	<i>Valor de p</i>
Sexo				
Masculino		-0,048	-0,098	0,294
Feminino		1	1	1
Idade				
>40 anos		-0,058	-0,123	0,196
< 40 anos		1	1	1
Alcoolismo		0,035		
Não alcoolismo		1		
Tabagismo		0,092	0,192	<b>0,051</b>
Não tabagismo		1	1	<b>1</b>
Testes cutâneo da tuberculina (mm)				
0-4 mm		1	1	1
5-9 mm		0,011	0,005	0,957
≥ 10 mm		0,003	0,008	0,946
Baciloscopia				
Positivo		0,159	0,345	<b>0,002</b>
Negativo		1	1	<b>1</b>
Cultura para <i>M. tuberculosis</i>				
Positivo		-0,033	-0,052	0,629
Negativo		1	1	1
Alteração da imagem de R-X tórax para TB				
Baixa probabilidade		1	1	1
Intermediária probabilidade		-0,033	-0,074	0,583
Alta probabilidade		-0,058	-0,128	0,381
Forma Clínica				
TBpul <sup>BR</sup>		1	1	1
TBpul <sup>IT</sup>		-0,180	-0,411	<b>0,003</b>
TBExp <sup>IT</sup>		-0,303	-0,571	<b>0,000</b>
Constante		-0,375		0,000

β: beta; mm: milímetros; R-X: Radiografia de tórax; TBpul<sup>BR</sup> e TBpul<sup>IT</sup>: indivíduos com TB confirmada; TBExp<sup>IT</sup>: indivíduos com TB extrapulmonar confirmada; OAR: indivíduos com outros agravos respiratórios; S: indivíduos sem histórico ou contato conhecido com TB.

### Avaliação da positividade da proteína recombinante PPE59 para os isotipos IgA e IgG

Para obtenção do ponto de corte (*cut-off*) dos ensaios IgA-PPE59 e IgG-PPE59, foi aplicada a curva ROC usando a população brasileira como referência, utilizando os grupos de pacientes (TBpul<sup>BR</sup>) e grupo controle (OAR e S). A confecção da curva ROC utilizando apenas o grupo S ou o grupo OAR não apresentou mudanças na área sob a curva (AUC). Desse modo, ficou definido a junção dos grupos OAR e S para a escolha do ponto de corte a ser utilizado no estudo. A Figura 13 mostra a análise da curva ROC, onde pode-se observar que a AUC para a ELISA-IgA foi maior (0,823), e foi possível determinar os valores de *cut-off* ideais para IgA-PPE59 (1,030) e IgG-PPE59 (0,654) (figura 10).



**Figura 13:** Receiver-operator characteristics (ROC) para ELISA-IgA e IgG PPE59 para identificação de melhor sensibilidade e especificidade. AUC: área sob a curva.

Definido os pontos de corte para o ELISA-IgA e IgG PPE59, foi possível calcular os valores de sensibilidade e especificidade, assim como seus respectivos valores preditivos (Tabela 7). O ELISA-IgA no Brasil apresentou melhor sensibilidade (53,8%) e especificidade (97,2%) que o ELISA-IgG (25,5% e 85,6%, respectivamente). Entre os imigrantes, a sensibilidade para IgA foi menor (35,4%), mas ainda mais elevada que para IgG (2,5%). Entretanto, não foi evidenciado diferença significativa de sensibilidade para IgA, mas foi encontrado para IgG, nos pacientes TB<sup>BR/IT</sup> ( $p > 0,15$  e  $p > 0,001$ , respectivamente). Quando combinados os resultados de IgA e IgG, foi observado um aumento na sensibilidade (61,5%) entre os brasileiros, com decréscimo da especificidade (83,5%), porém entre os imigrantes a

sensibilidade não foi modificada. Para IgA foi identificado VPP alto (96,5%), mas VPN moderado (47,9%). Para IgG, esses indicativos foram menores, VPP e VPN de 56% e 34,1%, respectivamente. A acurácia foi calculada em função do diagnóstico da população estudada, onde para IgA-PPE59 foi encontrada acurácia de 61,8% e para IgG-PPE59 foi de 36,9%. A combinação de IgA e IgG mostrou VPP e VPN de 83,3% e 45,3%, respectivamente, mas com menor acurácia (58,9%) (tabela 7).

**Tabela 7:** Sensibilidade e especificidade da resposta imune humoral por ELISA-IgA e IgG PPE59 em pacientes com tuberculose pulmonar do Brasil e imigrantes na Itália (TBpul<sup>BR/IT</sup> e TBExp<sup>IT</sup>) e de indivíduos controles.

<i>ELISA-PPE59</i>	<i>Cut-off</i>	<i>Sensibilidade%</i> (Número total de +/Total)				<i>Especificidade %</i> (Número total de +/ Total)	<i>VPP %</i>	<i>VPN %</i>	<i>A %</i>
		TBpul <sup>BR</sup>	TBpul <sup>IT</sup>	TBExp <sup>IT</sup>	Todos TB <sup>IT</sup>				
IgA	1,030	53,8 (28/52)	38,18 (21/54)	28 (7/25)	35,4 (29/79)	97,2 (2/71)	96,5	47,9	61,8
IgG	0,654	25,5 (12/47)	3,7 (2/54)	0	2,5 (2/79)	85,6 (10/69)	56	34,1	36,9
IgA + IgG		61,5 (32/52)	38,18 (21/54)	28 (7/25)	35,4 (28/79)	83,5 (12/71)	83,3	45,3	58,9

%; porcentagem; N: número de positivos; T: total de indivíduos; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; A: acurácia.

Analisando a positividade entre os imigrantes com TBpul de acordo com a sua região de origem, não há diferença significativa de sensibilidade de IgA-PPE59 em relação à população brasileira ( $p=0,11$ ). O teste identificou similarmente pacientes de origem africana, asiática e europeia (38,8%, 36,8% e 37,5% respectivamente). Quanto à sensibilidade da IgG-PPE59 foi encontrada diferença significativa com positividade mais alta para a população brasileira em relação aos asiáticos e aos europeus ( $p<0,02$ ) mas não para os de origem africana ( $p=0,22$ ) (Tabela 8). O paciente brasileiro imigrante na Itália foi identificado apenas por ELISA- IgA.

**Tabela 8:** Positividade encontrada para ELISA-PPE59 IgA e IgG utilizando os indivíduos com TB pulmonar de acordo com sua região de origem e o grupo TBpul<sup>BR</sup>.

Área geográfica	Número de positivos/Total (%)	
	IgA	IgG
África	7/18 (38,8)	2/18 (11)
Ásia	7/19 (36,8)	0/19
Europa	6/16 (37,5)	0/16
Brasil	29/53 (54,7)	12/48 (25)

N: número de positivos; T: número total de indivíduos com TB de acordo com a região de origem; %: porcentagem.

A tabela 9, mostra a associação da positividade de ELISA PPE59 com fatores clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Observa-se que para a IgA e IgG, na população de imigrantes, a positividade não foi associada a nenhum dos fatores de risco disponíveis para análise, exceto para IgA associada ao espécime clínico ser BAAR positivo. Para o Brasil, esta associação, principalmente para IgA, foi significativa para várias das características: idade maior que 40 anos, ser etilista, tabagista, ter TCT>10mm, ter espécime BAAR e cultura positivo e ter imagem radiográfica com alterações de alta probabilidade para TB ( $p\leq 0,02$ ).

**Tabela 9:** Positividade no ELISA PPE-59 para IgA e IgG em relação as variáveis clínicas, demográficas e laboratoriais do estudo.

Características	Brasil						Itália					
	IgA			IgG			IgA			IgG		
	Positivo	Negativo	<i>p</i>	Positivo	Negativo	<i>p</i>	Positivo	Negativo	<i>p</i>	Positivo	Negativo	<i>p</i>
Masculino	23 (76,7)	43 (46,2)	0,66	13 (59,1)	48 (52,2)	0,55	21 (75)	33 (64,7)	0,34	2 (100)	52 (67,5)	1,0*
Feminino	7 (23,3)	50 (53,8)		9 (40,9)	44 (47,8)		7 (25)	18 (35,3)		0	25 (32,5)	
Idade >40 anos	17 (56,7)	48 (52,2)	<b>0,00</b>	16 (72,7)	44 (48,4)	<b>0,04</b>	11 (39,3)	21 (42)	0,81	0	32 (42,1)	0,51*
Idade <40 anos	13 (43,3)	44 (47,8)		6 (27,3)	47 (51,6)		17 (60,7)	29 (58)		2 (100)	44 (57,9)	
Etilista	13 (43,3)	15 (16,3)	<b>0,00</b>	9 (40,9)	16 (17,6)	<b>0,02*</b>						
Não etilista	17 (56,7)	77 (83,7)		13 (59,1)	75 (82,4)							
Tabagismo	13 (43,3)	21 (22,8)	<b>0,03</b>	9 (40,9)	23 (25,3)	0,14	7 (46,7)	13 (31,7)	0,30	1 (50)	19 (35,2)	1,0*
Não tabagista	17 (56,7)	71 (77,2)		13 (59,1)	68 (74,7)		8 (53,3)	28 (68,3)		1 (50)	35 (64,8)	
Trat anti-TB ≥60 dias							3 (11,5)	14 (28)	0,10	0	17 (23)	1,0
Trat anti-TB ≤60 dias							23 (88,5)	36 (72)		2 (100)	57 (77)	
Marca de BCG	14 (46,7)	49 (52,7)	0,56	9 (40,9)	50 (54,3)	0,25						
Sem marca de BCG	16 (53,3)	44 (47,3)		13 (59,1)	42 (45,7)							

TCT ≥10 mm	22 (88)	49 (54,4)	<b>0,00</b>	13 (61,9)	55 (64)	0,78	10 (100)	15 (93,8)	1,0*	0	25 (96,2)	-
TCT 5-9 mm	2 (8)	11 (12,2)		3 (14,3)	8 (9,3)		0	1 (6,3)		0	1 (3,8)	
TCT 0-4 mm	1 (4)	30 (33,3)		5 (23,8)	23 (26,7)		0	0		0	0	
BAAR positivo	16 (64)	14 (22,2)	<b>0,00</b>	10 (52,6)	17 (27,4)	<b>0,04</b>	23 (85,2)	27 (65,9)	<b>0,07</b>	2 (100)	48 (72,7)	1,0*
BAAR negativo	9 (36)	49 (77,8)		9 (47,4)	45 (72,6)		4 (14,8)	14 (34,1)		0	18 (27,3)	
Cultura Positiva	7 (53,8)	8 (18,2)	<b>0,02*</b>	3 (25)	12 (28,6)	1,0*	21 (95,5)	34 (94,4)	1,0*	2 (100)	53 (94,6)	1,0*
Cultura Negativa	6 (46,2)	36 (81,8)		9 (75)	30 (71,4)		1 (4,5)	2 (5,6)		0	3 (5,4)	
QF TB Positivo							11 (73,3)	17 (73,9)	1,0*	1 (50)	27 (75)	0,46*
QF TB Negativo							4 (26,7)	6 (26,1)		1 (50)	9 (25)	
R-X BP	4 (13,3)	74 (80,4)		9 (40,9)	65 (71,4)	<b>0,01</b>	6 (24)	12 (27,3)	0,62	0	18 (26,5)	0,53
R-X alter. Intermediária			<b>0,00</b>	3 (13,6)	9 (9,9)		10 (40)	21 (47,7)		1 (100)	30 (44,1)	
R-X AP	16 (53,3)	16 (17,4)		10 (45,5)	17 (18,7)		9 (36)	11 (25)		0	20 (29,4)	

Trat anti-TB (>60 ou < 60 dias): tratamento anti-Tuberculose (maior ou menos a 60 dias); TCT: teste cutâneo da tuberculina; mm: milímetro; QF TB: Quantiferon; R-X BP: Raio-X de baixa probabilidade; R-X alter. Intermediária: Raio-X com alterações intermediárias; R-X AP: Raio-X com alta probabilidade; *p*: teste Chi quadrado; \* teste de Fisher.

A Tabela 10 mostra a análise bivariada e multivariada avaliando os fatores de riscos que estão associados com positividade do ELISA PPE59 na tuberculose. No Brasil, razão de chance significativa para a positividade de IgA foram confirmados para o sexo masculino (OR 3,821; p=0,00 e OR 2,969; p=0,03), alcoolismo (OR 3,9; p=0,002 e OR 2,7; p=0,046) e imagem radiográfica com alterações de alta probabilidade (OR 5,5; p=0,000 e OR: 27,849; p=0,005, respectivamente). As variáveis PPD $\geq$ 5mm (OR: 13,0; p=0,002), radiografia com alterações intermediárias (OR 22,7; p=0,000), BAAR positivo (OR: 7,3; p=0,000) e cultura positiva (OR 6,3; p=0,006) foram significativamente associadas como fator de risco para positividade em IgA apenas na análise bivariada (Tabela 9A). Entre os imigrantes, nenhum fator de risco foi associado com maior chance de ter o ELISA IgA positivo na TB (tabela 9B). Para IgG o fator de risco que mostrou associação com TB, por ambas as análises, foi a variável alcoolismo (OR: 3,2; p=0,024 e OR: 3,0; p=0,056, respectivamente). Imagem em Raio-X com alterações de alta probabilidade (OR: 3,6; p=0,008) e BAAR + (OR: 3,5; p=0,013) apresentaram associação com TB apenas na análise bivariada (Tabela 9C). Análise bivariada e multivariada para ELISA-IgG entre os imigrantes não foi possível ser efetuada devido ao baixo número de positivos.

**Tabela 10:** Análise bivariada e multivariada por regressão linear entre a população de estudo para fatores de risco associados a positividade no ELISA-PPE59.

A) PPE59 IgA (brasileiros)	Análise bivariada			Análise Multivariada		
	OR	IC (95%)	<i>p</i>	OR	IC (95%)	<i>p</i>
<b>Sexo</b>						
<b>Masculino</b>	3,8	1,4 – 9,7	<b>0,00</b>	2,9	1,0 – 8,0	<b>0,03</b>
<b>Feminino</b>	1			1		
<b>Idade</b>						
<b>&gt;40 anos</b>	1,1	0,5 – 2,7	0,66	1,1	0,3 – 4,2	0,81
<b>&lt;40 anos</b>	1			1		
<b>Tabagismo</b>	2,5	1,0 – 6,1	0,03	1,5	0,5 – 4,1	0,36
<b>Não tabagismo</b>	1			1		
<b>Alcoolismo</b>	3,9	1,5 – 9,7	<b>0,00</b>	2,7	1,0 – 7,2	<b>0,04</b>
<b>Não alcoolismo</b>	1			1		
<b>Marca de BCG</b>	0,7	0,3 – 1,7	0,56	0,9	0,2 – 3,3	0,92
<b>Sem Marca de BCG</b>	1			1		
<b>TCT (mm)</b>						
<b>0-4mm</b>	1			1		
<b>≥ 5 mm</b>	13,0	1,6 – 100,7	<b>0,00</b>	1,5	0,1 – 21,9	0,74
<b>Alteração da imagem de R-X tórax para TB</b>						
<b>Baixa probabilidade</b>	1			1		
<b>Intermediária probabilidade</b>	22,7	4,6 – 111,9	<b>0,00*</b>	9,5	0,6 – 132,0	0,09
<b>Alta probabilidade</b>	5,5	2,2 – 13,4	<b>0,00</b>	27,8	2,7 – 281,2	<b>0,00</b>
<b>Baciloscopia</b>						
<b>Positivo</b>	7,3	2,7 – 19,4	<b>0,00</b>	1,9	0,1 – 24,7	0,60
<b>Negativo</b>	1			1		
<b>Cultura para <i>M. tuberculosis</i></b>						
<b>Positivo</b>	6,3	1,7 – 23,0	<b>0,00*</b>	1,0	0,1 – 6,6	0,97
<b>Negativo</b>	1			1		

\* teste de Fisher.

B) PPE59 IgA (Imigrantes)	Análise bivariada			Análise Multivariada		
	OR	IC (95%)	p	OR	IC (95%)	p
<b>Sexo</b>						
Masculino	1,6	0,5 – 4,5	0,34	1,0	0,2 – 4,0	0,91
Feminino	1			1		
<b>Idade</b>						
>40	0,8	0,3 – 2,2	0,81	0,8	0,2 – 3,5	0,83
<40)	1			1		
<b>Tabagismo</b>						
Não tabagismo	1,8	0,5 – 6,3	0,30	1,8	0,4 – 7,8	0,39
	1			1		
<b>Alcoolismo</b>						
Não alcoolismo	2,1	0,4 – 10,8	0,38*			
	1					
<b>TCT</b>						
0-4 mm	1			1		
≥ 10 mm	1,3	0,5 – 3,5	0,56	-	-	-
<b>Alteração da imagem de R-X tórax para TB</b>						
Baixa probabilidade	1			1		0,06
Intermediária probabilidade	0,7	0,3 – 2,0	0,63	3,5	0,4 – 29,9	0,24
Alta Probabilidade						
<b>Baciloscopia</b>						
Positivo	2,7	0,8 – 8,5	0,08	-	-	-
Negativo	1			1		
<b>Cultura para <i>M. tuberculosis</i></b>						
Positivo	1,2	0,1 – 14,4	1,0*	2,0	0,08 – 48,9	0,66
Negativo	1			1		
<b>Quantiferon TB Gold In tube</b>						
Positivo	0,9	0,2 – 4,2	1,0*	0,95	0,1 – 6,4	0,96
Negativo	1			1		
<b>Trat. Anti-TB</b>						
>60 dias	0,33	0,0 – 1,2	0,10	0,16	0,01 – 1,43	0,10
<60 dias	1			1		

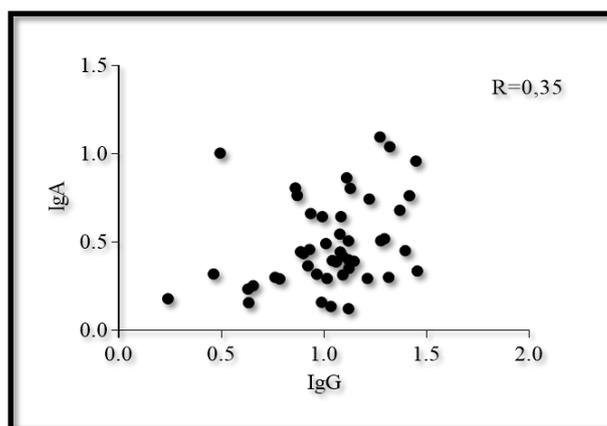
\* teste de Fisher.

C) PPE59 IgG (brasileiros)	Análise bivariada			Análise Multivariada		
	OR	IC (95%)	p	OR	IC (95%)	p
<b>Sexo</b>						
Masculino	1,3	0,5 – 3,4	0,55	1,0	0,3 – 3,0	0,98
Feminino	1			1		
<b>Idade</b>						
>40 anos	2,8	1,0 – 7,9	<b>0,04</b>	3,6	0,8 – 15,9	0,08
<40 anos	1			1		
<b>Tabagismo</b>						
Não tabagismo	2,0	0,7 – 5,4	0,14	1,2	0,4 – 3,8	0,65
	1			1		
<b>Alcoolismo</b>						
Não alcoolismo	3,2	1,1 – 8,8	<b>0,02*</b>	3,0	0,9 – 9,6	<b>0,05</b>
	1			1		
<b>Marca de BCG</b>						
Sem Marca de BCG	0,5	0,2 – 1,4	0,25	1,4	0,3 – 5,6	0,60
	1			1		
<b>TCT</b>						
0-4 mm (Ref)	1			1		0,95
5-9 mm	1,6	0,4 – 6,8	0,44*	1,3	0,1 – 19,1	0,80
≥10 mm	0,9	0,3 – 2,5	0,95	1,3	0,2 – 8,2	0,77
<b>Alteração da imagem de R-X tórax para TB</b>						
	1					0,27
Baixa probabilidade	1,4	0,3 – 5,8	0,59	1,0	0,0 – 18,4	0,99
Intermediária probabilidade	3,6	1,3 – 9,9	<b>0,00</b>	5,4	0,6 – 43,8	0,11
Alta probabilidade						
<b>Baciloscopia</b>						
Positivo	3,5	1,2 – 9,8	<b>0,01</b>	9,1	0,3 – 227,0	0,17
Negativo	1			1		
<b>Cultura para M. tuberculosis</b>						
Positivo	1,1	0,2 – 4,7	1,0*	0,3	0,0 – 2,6	0,30
Negativo	1			1		

1: variável usada como referência; OR: Odds Ratios; IC: intervalo de confiança; TCT: teste cutâneo da tuberculina; \* teste de Fisher.

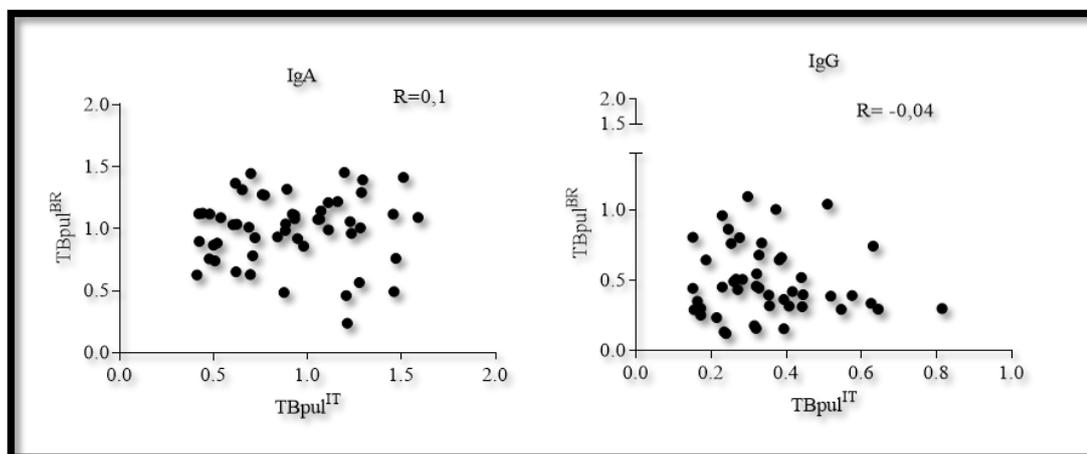
### *Análises de correlação com o grupo TBpul<sup>BR</sup> para IgA e IgG*

Para confirmar se existe a associação entre os resultados de ELISA-IgA e IgG-PPE59, expresso em DO, foi feita análise de correlação de Spearman com os resultados de densidade óptica obtidos com os dois ensaios. A Figura 14 mostra que IgG-PPE59, mesmo apresentando resultados inferiores a IgA, tende a melhorar o teste, com valor de  $R^2$  fraco 0,35, porém significativo,  $p=0,05$ . Indicando que existe um grau de associação entre as positivities de IgA e IgG no grupo TBpul<sup>BR</sup>.



**Figura 14:** Análise de correlação utilizando o grupo de pacientes brasileiros com tuberculose pulmonar (TBpul<sup>BR</sup>) a partir dos resultados de densidade óptica obtidos no ELISA-PPE59 para IgA e IgG. Correlação de Spearman,  $R=0,35$ ; valor de  $p=0,05$ ; Diagrama de dispersão X-y; Eixo X e Y apresenta os valores de densidades ópticas obtidas no ELISA-PPE59 IgA e IgG no grupo TBpul<sup>BR</sup>, respectivamente.

Ao avaliar o grau de correlação entre as DO obtidas por ambas as populações de TB no ELISA PPE59 observou-se que enquanto para IgA essa associação é fracamente positiva ( $R^2= 0,1$ ;  $p=0,46$ ) para IgG ela é negativa ( $R^2= -0,04$   $p=0,77$ ) (Figura 15).



**Figura 15:** Análise de correlação utilizando os pacientes com tuberculose pulmonar do Brasil e Itália (TBpul<sup>BR</sup> e TBpul<sup>IT</sup>) a partir dos resultados de densidade óptica obtidos no ELISA-PPE59 para IgA e IgG. Diagrama de dispersão X-y. IgA, valor de  $p=0,46$ . IgG, valor de  $p=0,77$ . Eixos X e Y mostram valores de densidade óptica dos respectivos grupos.

*Combinação dos resultados de ELISA-PPE59 com os de outros antígenos previamente estudados e publicados usando a mesma população brasileira*

Para esta análise foram utilizados resultados de ELISA-IgA e IgG para os antígenos específicos de *Mtb*, previamente avaliados em outros estudos: MPT-64, MT10.3, 38kDa, 16kDa e ESAT-6. Como mostrado na Tabela 11, houve um pequeno aumento na sensibilidade de IgA combinando os resultados da PPE59 com o ESAT-6 (55,8%) e o 38 kDa (59,6%), respectivamente, mantendo alta a especificidade (94,4% e 90,2%, respectivamente). Com outras combinações avaliadas, embora aumente a sensibilidade (MT10.3: 59,6%, MPT64: 67,3% e 16 kDa: 71,1%) a especificidade diminuiu (90 %). Para IgG as combinações levaram, em geral, a menores sensibilidades (50%) e especificidades (83,1%).

**Tabela 11:** Sensibilidade e especificidade do ELISA IgA e IgG PPE59 combinado com os antígenos ESAT-6, 16Kda, 38Kda, MT10.3 e MPT-64 em pacientes brasileiros com tuberculose pulmonar (TBpul<sup>BR</sup>) e controles (outros agravos respiratórios e sadios) testados previamente (Silva et al. 2008).

ELISA resultados combinados	% (Número de positivos/total)	
	Sensibilidade	Especificidade
PPE59+ESAT-6 – IgA	<b>55,8 (29/52)</b>	<b>94,4 (4/71)</b>
PPE59+ESAT-6 – IgG	32,7 (17/52)	83,1 (12/71)
PPE59+16Kda- IgA	71,1 (37/52)	87,4 (9/71)
PPE59+16Kda- IgG	48 (25/52)	76,1 (17/71)
PPE59+38Kda -IgA	<b>59,6 (31/52)</b>	<b>90,2 (7/71)</b>
PPE59+38Kda – IgG	44,2 (22/52)	81,7 (13/71)
PPE59+MT10.3-IgA	59,6 (31/52)	88,8 (8/71)
PPE59+ MT10.3- IgG	42,3 (22/52)	76,1 (17/71)
PPE59+ MPT64-IgA	67,3 (35/52)	88,8 (8/71)
PPE59+ MPT64- IgG	51,9 (27/52)	76,1 (17/71)
Todos IgA	78,8 (41/52)	74,7 (18/71)
Todos IgG	65,3 (34/52)	66,2 (24/71)
Todos IgA+IgG	82,6 (43/52)	64,8 (25/71)

%; porcentagem. Números em negrito apresentam melhor combinação.

## 5 DISCUSSÃO

Entre as principais razões para o contínuo sucesso da infecção por *Mtb* estão a demora no diagnóstico e os muitos casos de abandono da terapia para TB (Hoagland et al. 2016; Cudahy & Sheno 2016). Os testes de detecção de anticorpos específicos são utilizados para o diagnóstico de muitas doenças infecciosas e poderiam potencialmente auxiliar no diagnóstico da TB, principalmente nas populações negligenciadas, onde a transmissão da tuberculose se faz com maior sucesso, tais como moradores de rua, encarcerados, nos bolsões de pobreza, entre os indígenas e imigrantes, entre outros. Os testes sorológicos possuem simplicidade tecnológica e podem ser acoplados aos serviços de saúde de menor complexidade; podem ser formatados para testes do tipo *point-of-care* (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, durante a própria prática clínica (Feng et al. 2014; Baumann et al. 2014; Jenum et al. 2016; Sardella et al. 2015).

No ano de 2011, a OMS publicou uma declaração de política negativa ao uso de testes sorológicos comerciais no diagnóstico da TB pulmonar e extrapulmonar. De acordo com uma análise sistemática de diversos trabalhos publicados, utilizando um único antígeno ou um *cocktail* de antígenos, nenhum deles mostrou sensibilidade e especificidade adequadas para substituir as ferramentas de diagnóstico atuais, como a baciloscopia. Esse fato não impede ou desmerece as pesquisas que são realizadas neste campo, pois é necessário maior conhecimento sobre os muitos antígenos de *Mtb* e suas potencialidades como moléculas vacinais, para novas tecnologias diagnósticas e/ou novas drogas.

Nos últimos anos a pesquisa de novas moléculas tem sido incrementada e a utilização de ferramentas de microarranjos na área da proteômica tem ajudado na pesquisa de novos antígenos, pois auxilia na seleção de potenciais epitopos imunodominantes, principalmente aqueles que estão localizados em regiões altamente específicas do genoma de *Mtb* (Yang et al. 2016).

As proteínas membros da família de PE/PPE têm sido evidenciadas como desencadeadores de resposta imune inata, são alvos do sistema imunitário adaptativo e, potencialmente, uma rica fonte de antígenos para diagnóstico e vacinas (Dillon et al. 1999; Okkels et al. 2003; Choudhary et al. 2003, 2004; Singh et al. 2005; Srivastava et al. 2006; Chaitra et al. 2007; Zhang et al. 2007; Khan et al. 2008; Romano et al. 2008; Chen et al. 2009; Wang et al. 2008 e 2009; Nair et al. 2009, 2011; Bansal et al. 2010; Cuccu et al. 2011; Abraham et al. 2013; Deng et al. 2014).

Muitos estudos têm focado suas investigações no potencial das PPEs como moléculas vacinais, capazes de induzirem resposta imune celular, embora haja uma vertente que vê implicações dos anticorpos com papel pró e anti-inflamatório na TB e, portanto, com potencial não apenas vacinal, mas também para diagnóstico (Achkar & Casadevall 2013). É importante notar que em estudos utilizando modelo matemático foi evidenciado que o controle da TB passa por três pilares: identificação e tratamento efetivo e precoce do indivíduo doente, bem como pela identificação e tratamento do indivíduo infectado latentemente por *Mtb* e pela vacinação preventiva à infecção ou pós-infecção (Dye, et al. 2008). Portanto, novas ferramentas são necessárias para atender a estas demandas no controle da TB.

Em estudo prévio foram realizadas pesquisas no campo da bioinformática a fim de extrair informações sobre a proteína PPE59, alvo do presente estudo. Foi evidenciado que o gene *rv3429* apresenta predição de 7 epitopos lineares antigênicos com *threshold* maior ou igual a um, portando sugerindo ser uma molécula com potencial imunodominante. As análises também mostram que a localização predileta da proteína PPE59 é o periplasma celular (entre a membrana interna e a membrana citoplasmática), onde estão localizadas diversas enzimas e proteínas de transporte (Tortora, 2012). O gene *rv3429*, que codifica a proteína PPE59, está localizado na RD11, esta região está ausente de todas as cepas BCG (Behr et al. 1999; Al-Attiyah & Mustafa 2008; Chen et al. 2009; Parkash et al. 2009). A RD11 corresponde a 5 ORFs no genoma de *Mtb* e nesta região também é encontrado o gene que codifica para o antígeno TB 7.7, (Parkash et al. 2009) que é utilizado no kit QuantiFERON TB GOLD in tube (QFT-GIT; Cellestis, Victoria, Austrália) (Kim et al. 2012; Losi et al. 2015). Estas características, aliadas ao conhecimento de que os 180 resíduos N terminais das proteínas PPE são conservadas, mas que as variações na sequência e no tamanho da região C terminal podem representar uma fonte de variabilidade antigênica, fornecem indícios sobre seu potencial imunodominante. Assim, considerando a existência de uma bem-sucedida clonagem deste gene em nosso laboratório, justificou-se a realização da expressão da proteína PPE59 aqui descrita com sucesso e sua avaliação imune.

A expressão da proteína recombinante PPE59 mostrou alto rendimento e, a partir da primeira hora de indução, há sinais claros de expressão sem corpos de inclusão e só depois de 5 horas de indução é que ocorreram sinais de degradação. A produção de proteínas recombinantes é baseada na escolha do sistema de expressão que será empregado. A utilização da expressão heteróloga em *E. coli* é comum, possui vantagens como o fácil manuseio, pois a natureza genética desse microrganismo é bem caracterizada, e a rápida replicação *in vitro*. A principal desvantagem encontrada nesse sistema é a insolubilidade das

proteínas e dos corpos de inclusão que comprometem a qualidade e a quantidade das proteínas expressas (Rosano & Ceccarelli 2014). Não foram observados corpos de inclusão durante o processo de expressão, contrariamente ao ocorrido no estudo de Chen et al. (2009) ao expressar a PPE59 em sistema similar. Isto talvez possa estar associado à utilização da variante *E. coli Rosetta*, enquanto que em nosso estudo foi utilizado a *E. coli Dh5α*, que possui maior eficiência na transformação de proteínas recombinantes (Song et al. 2015). Por outro lado, a proteína expressa no estudo de Chen possui massa molecular de 36 kDa. Considerando que o ORF (quadro de leitura aberto) do gene *rv3429* gera uma proteína de menor massa molecular, como a encontrada em nosso estudo (21 kDa), é possível que isto possa estar associado ao tamanho da ORF utilizada no seu experimento, gerando os corpos de inclusão, ou a liberação da proteína poderia ter ocorrido de maneira ineficiente, obtendo então, uma proteína de maior tamanho. Fato é que Chen et al. (2009) usaram para a amplificação da proteína PPE59 primers homólogos às regiões acima e abaixo dos códons de início e fim da molécula, expressando uma proteína maior em corpos de inclusão e, portanto, em menor quantidade.

Embora a PPE59 já tenha sido alvo de análise de sua imunodominância na TB para a resposta de IFN- $\gamma$  em células mononucleadas do sangue periférico de pacientes com TB, LTBI e controles saudáveis, seu potencial em resposta por Ac em espécime clínico de mais fácil obtenção, o soro, não foi ainda investigado. Chen et al. (2009), em estudo realizado na China, identificaram por ELISPOT-INF- $\gamma$ , 49,1% dos TB e 42,1 % de indivíduos contatos de pacientes com TB, com 93,3% de especificidade. Entretanto, em nosso estudo, utilizando metodologia mais simples e população de área endêmica para TB no Brasil, o ELISA-IgA-PPE59 identificou mais da metade dos pacientes com TB e com excelente especificidade (97,2%). Embora com sensibilidade menor, entre os imigrantes, diferença *borderline* foi obtida apenas para os casos extrapulmonares ( $p=0,058$ ).

Até o presente momento, não se conhece a real função desta proteína no metabolismo ou seu papel evolucionário em *Mtb*, mas sabe-se que induz resposta mediada por células, por IFN- $\gamma$  e interleucina-10 e, como resultado do presente estudo, imunodominância de IgA e não de IgG em soro de pacientes com TB em área endêmica (Chen et al. 2009; Al-Attiyah & Mustafa 2008).

O sistema de transdução de sinal associado a dois componentes (2-CS: HK, histidina kinase e RR, regulador de resposta) desempenha um papel importante na resposta bacteriana às mudanças no ambiente, portanto tem papel importante na adaptação das bactérias, inclusive *Mtb*, nas diferentes fases da infecção no hospedeiro. O gene que codifica a PPE59, *rv3429*, juntamente com outros genes, inclusive da família PPE, como os que codificam as proteínas

PPE56, PPE57 e PPE3, tem sua expressão aumentada em mutante *Mtb* para o 2-CS, phoPRR. Portanto, embora não se conheça a função destes genes, eles podem estar associados com a adaptação da bactéria aos ambientes de estresse do hospedeiro infectado, como a indução da resposta imune, com a formação do granuloma (Walters et al. 2006).

A proteína PPE57 parece ser ligeiramente mais imunodominante que a PPE59, pois no mesmo estudo realizado na China, Chen et al (2009) identificaram resposta imune celular por IFN- $\gamma$  em 59,7% dos pacientes com TB e, em outro estudo realizado também na China, foi reconhecida por anticorpos IgG em 70% dos pacientes com TBpul e 59,4% dos pacientes com TBExp, com especificidade de 100% (Zhang et al. 2007). Entretanto, o número de soros controle foi muito baixo. Estes resultados sugerem que PPE59 e PPE57 são expressas em condições diferentes no hospedeiro, já que são mais reconhecidas por isotipos diferentes.

Recentes estudos evidenciaram que aproximadamente 10% do proteoma micobacteriano pode gerar resposta imune por anticorpos, e uma fração menor (~ 1%) de antígenos pode ser preferencialmente reconhecido por anticorpos do soro de pacientes com TB ativa (Kunnath-Velayudhan et al 2010. 2013). Estudos realizados com diferentes antígenos mostraram que a reatividade de IgG-ESAT6/16kDa/HBHA estavam aumentadas na TB ativa, declinando após tratamento, e em LTBI, sugerindo que os Acs específicos estavam associados a maior carga bacilar enquanto os níveis de IgA-HrpA se correlacionavam significativamente com a TB ativa, enquanto a IgA-16kDa/ESAT6 foi significativamente associado ao estado nutricional dos participantes. Por outro lado, IgA anti os antígenos micobacterianos HrpA e MDP1 tiveram resposta mais elevada entre os participantes controle que os TB, sugerindo que diferentes fatores de estresse a que estão submetidos a bactéria e o hospedeiro modulam a expressão proteômica e a resposta imune por IgA, sugerida ser protetora. Considerando que no Brasil os pacientes TB são detectados na demanda espontânea das unidades de saúde, e geralmente são diagnosticados quando a doença está mais avançada, é possível então que a PPE59 seja expressa nestas fases mais tardias da evolução clínica. Entretanto, entre os imigrantes não houve diferença significativa de reatividade a PPE59 entre os pacientes com diferentes alterações de imagem pulmonar, sugerindo que ela é expressa em diferentes fases da TB, embora possam existir diferenças quantitativas.

Especula-se também que as variabilidades sorológicas possam estar associadas à variabilidade de expressão dos genes descritos acima nas cepas de *Mtb* circulantes. Mas, de acordo com Rindi et al. (2007), as variações da resposta de anticorpos de pacientes com tuberculose não podem ser diretamente relacionadas com as variações da expressão do gene dos isolados clínicos, já que em seu estudo os soros testados e isolados clínicos eram de doadores diferentes, mas os autores especulam que a expressão diferencial de genes poderia

proporcionar uma fonte de variabilidade antigênica em *Mtb* que pode ter implicações na imunopatogênese da tuberculose.

A imigração é um grande problema nos países de baixa incidência para TB, estudos tem demonstrado que o aumento da prevalência da doença se deve, principalmente, à entrada de imigrantes no país. No Canadá e Estados Unidos,  $\frac{2}{3}$  dos indivíduos com TB são imigrantes (Khan et al. 2015). Testes rápidos, com potencial para detectar indivíduos infectados ou que possuam doença ativa, são de grande importância para auxiliar na triagem e acompanhá-las caso venham desenvolver a doença, a fim de eliminar futuras fontes de infecção. Em nosso estudo, os imigrantes TBpul<sup>IT</sup> foram mais reativos para IgA do que para IgG (DO de 0,621 e 0,237, respectivamente) e a IgA identificou 38,2% dos imigrantes com TB, indicando que IgA-PPE 59 possui melhor fator discriminatório do que IgG nesta população, assim como na população brasileira, que mostrou frequência maior de positivos. Esta menor frequência de positividade entre os imigrantes pode estar relacionada ao *cut-off* utilizado, pois resultaram dos dados de reatividade no soro de pacientes TB e controles do Brasil. Esse fato pode ter influenciado na menor positividade da proteína nessa população. De acordo com as análises de correlação entre os grupos TBpul<sup>BR/IT</sup> não existe associação entre esses grupos, tanto para IgA quanto para IgG, sugerindo que indivíduos com TBpul do grupo de imigrantes na Itália não respondem da mesma maneira que os TB do Brasil.

Entre os imigrantes, a resposta imune encontrada nos indivíduos da Ásia e África foi similar ao que foi encontrado no Brasil. O mesmo não ocorre para os indivíduos europeus, quando testados para IgA. Estes resultados sugerem diferença de resposta imunológica de acordo com a cepa circulante na região onde o estudo foi realizado. Na América do Sul a principal família de cepas *Mtb* circulante é a LAM, seguida pela família T, inclusive no Brasil (Gomes et al. 2012; Huber et al. 2014). Na Ásia, as cepas de maior circulação são as da família T e LAM e na África existe uma heterogeneidade de cepas circulantes, mas LAM é presença relevante, além das famílias AFRI e Haarlem. Na Europa, a família Haarlem é a de maior circulação. Portanto, asiáticos e africanos poderiam ter sido infectados pelo mesmo tipo genético de cepas, diferentemente dos Europeus (Demay et al, 2012. [acessado 19/04/2016] STIVITB [http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/description.jsp#](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/description.jsp#)). Em estudo feito por Hoff et al. (2007) avaliando indivíduos TB de diferentes localizações geográficas endêmicas e não endêmicas para TB, como Etiópia, Brasil e Dinamarca, foi demonstrado que os dinamarqueses possuíam reatividade mais baixa aos antígenos micobacterianos ESAT6 e CFP10 do que indivíduos da Etiópia e Brasil, evidenciando que o grau de exposição aos genótipos micobacterianos pode influenciar o repertório de resposta

imune. Estudos futuros são necessários para confirmar esta hipótese, identificando o tipo de cepa e o tipo de resposta imunológica que esta provoca.

A IgA tem como função principal exercer ação efetora no sistema imune de mucosa e é uma importante frente de defesa contra patógenos que invadem o hospedeiro via mucosa, como *Mtb*. Ela exerce uma variedade de funções protetoras, entre as quais interfere com a aderência do patógeno nas células da mucosa (exclusão imune), promovendo neutralização intracelular e a excreção do patógeno. Sua forma monomérica, presente no soro, exerce ação complementar, eliminando patógenos que ultrapassaram a barreira de mucosa, interagindo com os receptores Fc (FcαR1) de células citotóxicas-anticorpo dependente. Portanto, a presença de IgA anti-PPE59 em parte dos pacientes pode estar exercendo uma ação protetora, contendo os bacilos que escaparam à barreira da mucosa (Achkar & Casadevall 2013). Isto talvez explique a associação negativa de reatividade de IgA nos paucibacilares (TBExp,  $p=0,008$ ), cuja resposta imune controla melhor a multiplicação bacilar.

Outros estudos têm investigado algumas outras poucas proteínas PPE como marcadores imunoserológicos. A PPE codificada pelo gene *rv1168c* foi descrita com alta sensibilidade e especificidade para TBpul e TBExp (Khan et al. 2008), seguida das PPEs codificadas pelos genes *rv2430c* (Choudhary et al. 2003), *rv3425* ou PPE57 (Zhang et al. 2007), *rv2770c* ou PPE 44 e *rv2608* (Chakhaiyar et al. 2004) na TBpul e controles, porém a maioria destes estudos revelam fraqueza no número amostral de soros controle, que é sempre baixo, podendo ser causa de viés na análise da especificidade.

Em nosso estudo, a proteína recombinante PPE59 mostrou que mais da metade dos pacientes TBpul<sup>BR</sup> (53,8 %) eram positivos, considerando uma especificidade de 97,2% e o ELISA-IgG foi positiva em apenas 25% da população TB, mantendo especificidade inferior à IgA. A reatividade cruzada do grupo controle pode estar relacionada à infecção latente por *Mtb*, pois mais da metade (59,1%) dos indivíduos controles OAR no estudo são TCT positivos. Entretanto, a PPE59 não está presente na cepa *M. bovis* BCG (Behr et al. 1999; Parkash et al. 2009), portanto é pouco provável que as reações cruzadas encontradas no grupo OAR sejam decorrentes da vacinação por BCG na infância. Por outro lado, reação cruzada com outras micobactérias pode estar associada à reatividade em indivíduos sadios (Teixeira et al. 2007; Sardella et al. 2010), porém em nosso estudo foi realizado o alinhamento da sequência proteica da PPE59 (Basic Local Alignment Search Tool; [acessado 17/04/2016] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e foi observado baixo alinhamento com outras micobactérias, inclusive bactérias pertencentes ao complexo *Mtb* (<79%), exceto para *M. orygis*, *M. africanum* e *M. canettii* com alinhamento >95%. Estes dados apoiam a hipótese de que a reatividade encontrada no grupo controle estaria associada a uma exposição mais

frequente ao bacilo. Os dois indivíduos que foram positivos ao ELISA-IgA pertenciam ao grupo OAR e possuíam histórico de contato recente com indivíduos com TB ativa. Esses participantes poderiam estar infectados e serem potenciais progressores para TB ativa, entretanto, como não há acompanhamento clínico dos contatos de rotina e o nosso estudo não foi desenhado para este desenvolvimento, não podemos afirmar se esses dois indivíduos evoluíram para TB. Entretanto, estudos futuros, em outra coorte, deverão ser realizados para confirmar esta hipótese.

A reatividade do ELISA IgA-PPE59 foi associada a fatores de risco relacionados à TB, como ser do sexo masculino, ser etilista e apresentar alterações radiográficas de alta probabilidade para TB. Esses fatores foram demonstrados tanto em análises bi quanto multivariada; para a IgG, em ambas as análises, apenas o alcoolismo foi evidenciado com fator de risco para TB. Neste estudo, pacientes brasileiros TB que fazem uso de bebidas alcoólicas possuem 2,7 vezes maior risco de ser positivo no ELISA-PPE59. Resultado similar foi observado para os antígenos 38kDa e MPT-64 testados na mesma população brasileira do presente estudo (Silva et al. 2008). Investigações realizadas em diversos países, como Rússia, Austrália, Canada, Estados Unidos e Suíça (Fleming et al. 2006; Lönnroth et al. 2008) reconhecem os malefícios do álcool na TB. Nos Estados Unidos o uso excessivo de álcool é um problema de saúde e acredita-se que isso esteja associado com mortes de pacientes que estavam em tratamento para TB, e este fator de risco estava especificamente associado com os imigrantes, independente do sexo (Volkman et al. 2016). Louw et al. (2016), avaliando a qualidade de vida entre indivíduos com TB pulmonar na África, identificaram o efeito nocivo do uso de álcool entre os pacientes TB, pois o excesso de bebida alcoólica influencia negativamente a resposta imune celular, entretanto pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos (Mertens et al. 2009). Como nosso estudo não foi desenvolvido para a quantificação e qualificação desta variável, maiores estudos são necessários para elucidar estes achados sorológicos. Contudo, foi evidenciado que das variáveis clínicas e demográficas, disponíveis, a mais significativamente associada à resposta imune positiva é o *status* de doença, analisado por regressão linear, tanto entre os brasileiros quanto entre os imigrantes. Nenhuma outra característica demográfica ou clínica foi associada com TB entre os imigrantes, principalmente para IgG. Esse fato se deve ao baixo número de indivíduos que foram positivos ao teste, dessa maneira nós não conseguimos estabelecer um modelo estatístico que pudesse associar algum fator de risco para essa população.

Aumento de IgA foi observado entre os pacientes com DPOC, fumantes e indivíduos com bronquite crônica, além de indivíduos com asma e rinite alérgica. A DPOC é uma doença que compromete a capacidade dos pulmões, é considerada um fator de risco para

desenvolvimento da tuberculose pulmonar e ambas as doenças possuem fatores de risco em comum, como o tabagismo e o *status* socioeconômico (Inghammar et al. 2010; Liaquat et al. 2015). Portanto, estudos específicos quantificando essas variáveis deverão ser realizados para esclarecer estas associações.

A combinação de anticorpos melhorou a sensibilidade do ELISA para 61,5% sem alteração da especificidade, isto foi também sugerido na análise de correlação entre as reatividades de IgA e IgG. Alguns estudos mostram que a combinação de diferentes isotipos de anticorpos pode melhorar a acurácia do ELISA, mesmo quando a IgM é adicionada a combinação (Feng et al. 2014; Gutlapalli et al. 2016). A população utilizada neste estudo foi a mesma empregada em investigação anterior feita em nosso laboratório (Silva et al. 2008), que testou os antígenos ESAT-6, 38kDa, 16kDa, MPT64 e MT10.3 para detecção da IgG-ELISA, no qual apresentou sensibilidade (37%) e especificidade (92%) inferiores as que foram encontradas no presente estudo com o ELISA IgA-PPE59 (53,8% de sensibilidade e 97,2% de especificidade), embora para IgG, sensibilidade menor foi produzida na TBpul<sup>BR e IT</sup> (25%). Combinando estes antígenos foi possível observar pequeno aumento na sensibilidade (PPE59/ESAT-6; 55,8% e PPE59/38kDa; 59,6%), evidenciando que combinar a PPE59 com outros antígenos pode favorecer a sensibilidade do ELISA, sem alterar significativamente a especificidade (>90%). Devido à heterogeneidade no reconhecimento de antígenos por anticorpos séricos na TB, *multi-cocktails* de antígenos ou de seus peptídeos continuam a ser a melhor estratégia para potencializar um teste diagnóstico. O maior desafio é encontrar a melhor combinação antigênica e de isotipos. O presente estudo está limitado pela falta de soros controles das áreas geográficas envolvidas, principalmente de europeus. Portanto, melhores análises utilizando controles devidamente classificados devem ser realizadas.

## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a proteína PPE59 tem reconhecida imunodominância para IgA e está associada ao hábito de ingestão alcoólica do hospedeiro, principalmente entre a população do Brasil. A combinação com outros antígenos aumenta a sensibilidade do teste sem alterar significativamente a especificidade. Contudo, maiores estudos deverão ser realizados para confirmar essa imunodominância de IgA, bem como, estudos voltados para a elucidação do papel da proteína PPE59 em *Mycobacterium tuberculosis*.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Investigar a associação de IgA e IgG-PPE59 e PPE57 na identificação da TB de diferentes formas clínicas, inclusive na TB pediátrica.
- Identificar outras PPE com potencial imunodiagnóstico para tuberculose.
- Avaliar a resposta imune celular para a PPE59 em pacientes com TB e controles no Brasil.
- Investigar a expressão do gene *rv3429*, e outros genes, durante a infecção por *Mtb* em cultura de células humanas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, Safi M, Strong M, Eisenberg D, Musters RJP, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Appelmelk BJ, Luirink J, Bitter W 2006. A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 62: 667–679.
- Abraham PR, Latha GS, Valluri VL, Mukhopadhyay S 2014. Mycobacterium tuberculosis PPE protein Rv0256c induces strong B cell response in tuberculosis patients. *Infect. Genet. Evol.* 22: 244–249.
- Achkar JM, Chan J, Casadevall A 2015. B cells and antibodies in the defense against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunol Rev. HHS public access* 264(1): 167–181.
- Achkar JM, Casadevall A 2013. Antibody-mediated immunity against tuberculosis: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe* 13: 250–262.
- Achkar JM, Lawn SD, Mahomed-Yunus SM, Wright CA, Kasprovicz VO 2011. Adjunctive Tests for Diagnosis of Tuberculosis: Serology, ELISPOT for Site-Specific Lymphocytes, Urinary Lipoarabinomannan, String Test, and Fine Needle Aspiration. *The Journal of Infectious diseases.* 204:S1130–41
- Acosta A, Lopez Y, Nor NM, Pando RH, Alvarez N, Sarmiento ME, Glatman-freedman 2013. A The Role of Antibodies in the Defense Against Tuberculosis. Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Managemen - Chapter 4. *InTech.* 10.5772/53950
- Akhter Y, Ehebauer MT, Mukhopadhyay S, Hasnain SE 2012. The PE/PPE multigene family codes for virulence factors and is a possible source of mycobacterial antigenic variation: Perhaps more? *Biochimie* 94: 110–116.
- Al-Attayah R, Mustafa a. S 2008. Characterization of human cellular immune responses to novel Mycobacterium tuberculosis antigens encoded by genomic regions absent in Mycobacterium bovis BCG. *Infect. Immun.* 76: 4190–4198.
- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, Helden PD van, Warren RM, Pittius NCG van 2010. Novel mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. Mungi. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 1296–1299.
- Ali M 2014. Treating tuberculosis as a social disease. *Lancet* 383: 2195.
- Amicosante M 2010. Rational use of immunodiagnostic tools for tuberculosis infection. *Tuberculosis:* 93–107.
- Anochie PI, Onyeneke EC, Ogu AC, Onyeozirila AC, Aluru S, Onyejebu N, Zhang J, Efere L, Adetunji MA, Sánchez JGB 2012. Recent advances in the diagnosis of mycobacterium tuberculosis. *Germes* 2: 110–120.
- Anvisa 2008. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. *Bol. Bras. Avaliação Tecnol. em Saúde:* 1–13.
- Arias Guillén M 2011. Advances in the Diagnosis of Tuberculosis Infection. *Arch. Bronconeumol. (English Ed.* 47: 521–530.
- Bansal K, Sinha AY, Ghorpade DS, Togarsimalemath SK, Patil SA, Kaveri S V, Balaji KN, Bayry J 2010. Src homology 3-interacting domain of Rv1917c of Mycobacterium

- tuberculosis induces selective maturation of human dendritic cells by regulating PI3K-MAPK-NF-kappaB signaling and drives Th2 immune responses. *J. Biol. Chem.* 285: 36511–36522.
- Baumann R, Kaempfer S, Chegou NN, Oehlmann W, Loxton AG, Kaufmann SHE, Helden PD van, Black GF, Singh M, Walzl G 2014. Serologic diagnosis of tuberculosis by combining Ig classes against selected mycobacterial targets. *J. Infect.* 69: 581–589.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM 1999. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science* (80-. ). 284: 1520–1523.
- Belknap R, Daley CL 2014. Interferon-Gamma Release Assays. *Clin. Lab. Med.* 34: 337–349.
- Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1751–1759.
- Boehme C, Nabeta P, Hillemann D, Nicol M, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien S, Persing D, Ruesch-Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins M 2010. Rapide molecular detection of tuberculosos and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* 363: 1005–1015.
- Bombarda S, Figueiredo CM, Funari MBDG, Soares Júnior J, Seiscento M, Terra Filho M 2001. Imagem em tuberculose pulmonar. *J. Pneumol.* 27: 329–340.
- Benavaliker JN 2000. Immunodiagnosis of tuberculosis. *Indian J Allergy appl immunol* 14(2): 83-86
- Bos KI, Harkins KM, Herbig A, Coscolla M, Weber N, Comas I, Forrest SA, Bryant JM, Harris SR, Schuenemann VJ, Campbell TJ, Majander K, Wilbur AK, Guichon RA, Wolfe Steadman DL, Cook DC, Niemann S, Behr MA, Zumarraga M, Bastida R, Huson D, Nieselt K, Young D, Parkhill J, Buikstra JE, Gagneux S, Stone AC, Krause J 2014. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* 514: 494–497.
- Brasil 2015. Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frentes à tuberculose. *Bol. Epidemiológico Secr. Vigilância em Saúde-MS* 46: 1–19.
- Brosch R, Gordon S V., Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, Soolingen D van, Cole ST 2002. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 3684–3689.
- Campos H 2006. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. *Pulmão RJ* 15: 29–35.
- Campos R, Pianta C 2001. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul–Brasil. *Bol Saúde* 15: 61–71.
- Capone D 2006. Patogenia E Imunologia. *Rev. do Hospital Univ. Pedro Ernesto, UERJ* 5: 27–34.
- Castelo Filho A, Kritski AL, Barreto ÂW, Lemos ACM, Netto AR, Guimarães 2004. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *J. Bras. Pneumol.* 30: S57–S86.
- Chaitra MG, Nayak R, Shaila MS 2007. Modulation of immune responses in mice to recombinant antigens from PE and PPE families of proteins of Mycobacterium tuberculosis by the Ribi adjuvant. *Vaccine* 25: 7168–7176.

- Chakhaiyar P, Nagalakshmi Y, Aruna B, Murthy KJR, Katoch VM, Hasnain SE 2004. 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.* 190: 1237–1244.
- Chan ED, Heifets L, Iseman MD 2000. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber Lung Dis.* 80(3):131-40.
- Chan J, Mehta S, Bharrhan S, Chen Y, Achkar JM, Casadevall A, Flynn J 2004. The role of B cells and humoral immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Seminars in Immunology* 26: 588–600
- Chen J, Su X, Zhang Y, Wang S, Shao L, Wu J, Wang F, Zhang S, Wang J, Weng X, Wang H, Zhang W 2009. Novel recombinant RD2- and RD11-encoded Mycobacterium tuberculosis antigens are potential candidates for diagnosis of tuberculosis infections in BCG-vaccinated individuals. *Microbes Infect.* 11: 876–885
- Chin ST, Ignatius J, Suraiya S, Tye GJ, Sarmiento ME, Acosta A, Norazmi MN, Lim TS 2015. Comparative study of IgA V H 3 gene usage in healthy TST – and TST + population exposed to tuberculosis: deep sequencing analysis. *Immunology* 144: 302–311.
- Choudhary RK, Choudhary RK, Mukhopadhyay S, Mukhopadhyay S, Chakhaiyar P, Chakhaiyar P, Sharma N, Sharma N, Murthy KJR, Murthy KJR, Katoch VM, Katoch VM, Hasnain SE, Hasnain SE 2003. PPE Antigen Rv2430c of. *Society* 71: 6338–6343.
- Choudhary RK, Pullakhandam R, Ehtesham NZ, Hasnain SE 2004. Expression and characterization of Rv2430c, a novel immunodominant antigen of Mycobacterium tuberculosis. *Protein Expr. Purif.* 36: 249–253.
- Cole ST 2002. Comparative and functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Microbiology* 148: 2919–2928.
- Costa DC 1985. Considerações sobre a tendência da tuberculose no Brasil. *Cad. Saude Publica* 1: 313–326.
- Cuccu B, Freer G, Genovesi A, Garzelli C, Rindi L 2011. Identification of a human immunodominant T-cell epitope of mycobacterium tuberculosis antigen PPE44. *BMC Microbiol.* 11: 167.
- Cudahy P, Shenoi S 2016. Diagnostics for pulmonary tuberculosis. *Postgrad Med J;* 92(1086): 187–193
- Delogu G, Sali M, Fadda G 2013. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 5.
- Demay C, Liens B, Burguire T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N 2012. SITVITWEB - A publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 12: 755–766.
- Deng W, Li W, Zeng J, Zhao Q, Li C, Zhao Y, Xie J 2014. Mycobacterium tuberculosis PPE family protein rv1808 manipulates cytokines profile via co-activation of MAPK and NFκB signaling pathways. *Cell. Physiol. Biochem.* 33: 273–288.
- Deng W, Xie J 2012. Ins and outs of Mycobacterium tuberculosis PPE family in pathogenesis and implications for novel measures against tuberculosis. *J. Cell. Biochem.* 113: 1087–

- Dillon DC, Alderson MR, Day CH, Lewinsohn DM, Coler R, Bement T, Campos-Neto a, Skeiky Y a, Orme IM, Roberts a, Steen S, Dalemans W, Badaro R, Reed SG 1999. Molecular characterization and human T-cell responses to a member of a novel Mycobacterium tuberculosis *Mtb39* gene family. *Infect. Immun.* 67: 2941–2950.
- Dye C, Bassili A, Bierrenbach AL, Broekmans JF, Chadha VK, Glaziou P, Gopi PG, Hosseini M, Kim SJ, Manissero D, Onozaki I, Rieder HL, Scheele S, Leth F van, Werf M van der, Williams BG 2008. Measuring tuberculosis burden, trends, and the impact of control programmes. *Lancet. Infect. Dis.* 8: 233–243.
- Feng X, Yang X, Xiu B, Qie S, Dai Z, Chen K, Zhao P, Zhang L, Nicholson RA, Wang G, Song X, Zhang H 2014. IgG, IgM and IgA antibodies against the novel polyprotein in active tuberculosis. *BMC Infect. Dis.* 14: 336.
- Filho CB 2001. *História social da tuberculose e do tuberculoso : 1900-1950.*
- Fleming MF, Krupitsky E, Tsoy M, Zvartau E, Brazhenko N, Jakubowiak W, McCaul ME 2006. Alcohol and drug use disorders, HIV status and drug resistance in a sample of Russian TB patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10: 565–570.
- Fogel N 2015. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis* 95: 527–531.
- Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D, Singh R, Malhotra D, Ramnani VK, Prasad GBKS, Chandra R, Fraziano M, Colizzi V, Bisen PS 2003. Diagnosis of tuberculosis: Available technologies, limitations, and possibilities. *J. Clin. Lab. Anal.* 17: 155–163.
- Galdston I 1954. The White Plague, Tuberculosis; Man and Society. *Bulletin of the Medical Library Association.* 42(1):142-143.
- 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. 2014. Boletim Tuberculose. Secretária do Estado do Rio de Janeiro. Gerência de Pneumologia Sanitária \DTI\COVEP\SVEA\SVS\SES: 1–28.
- Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, Helden PD van, Warren RM 2006. Evolution and expansion of the Mycobacterium tuberculosis PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. *BMC Evolutionary Biology.* 6:95
- Gideon HP, Flynn JL 2013. Latent tuberculosis : what the host “ sees ”? *Immunol Rev. NIH.* 50: 202–212.
- Reis MCG. 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. 2007 67pp
- Gomes HM, Elias AR, Oelemann MAC, Pereira MA da S, Montes FFO, Marsico AG, Kritski AL, Filho L dos A, Caldas PC, Possuelo LG, Cafrune P, Rossetti ML, Lucena N, Saad MHF, Cavalcanti HR, Leite CQF, Brito RC de, Lopes ML, Lima K, Souza M, Trindade R de C, Zozio T, Sola C, Rastogi N, Suffys PN 2012. Spoligotypes of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 12: 649–656.
- Gutlapalli R, Sykam A, Tenali SP, Chandran P, Suneetha S, Suneetha LM 2016. Detection of tuberculosis in HIV co-infected individuals: Use of multiple ELISA responses to 38kDa, lipoarabinomannan and ESAT– 6 of M. tuberculosis. *J. Clin. Diagnostic Res.* 10: KC01–

KC04.

- Harrington JJ, Ho JL, Lapa E Silva JR, Conde MB, Kritski AL, Fonseca LS, Saad MHF 2000. Mycobacterium tuberculosis lipid antigens: Use of multi-antigen based enzyme immunoassay for free and complex dissociated antibodies. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4: 161–167.
- Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OY-C, Gernaey AM, Galili E, Eshed V, Greenblatt CL, Lemma E, Bar-Gal GK, Spigelman M 2008. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS One* 3: e3426.
- Hijjar MA, Gerhardt G, Teixeira GM, Procópio MJ 2007. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. *Rev Saúde Pública* 41: 50–58.
- Hoagland D, Liu J, Lee RB, Lee RE 2016. New agents for the treatment of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*
- Hoff ST, Abebe M, Ravn P, Range N, Malenganisho W, Rodriques DS, Kallas EG, Søbørg C, Mark Doherty T, Andersen P, Weldingh K 2007. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis--specific antibody responses in populations with different levels of exposure from Tanzania, Ethiopia, Brazil, and Denmark. *Clin. Infect. Dis.* 45: 575–582.
- Huber FD, Sánchez A, Gomes HM, Vasconcellos S, Massari V, Barreto A, Cesconi V, Almeida Machado SM de, Gomgnimbou MK, Sola C, Larouzé B, Suffys PN, Saad MHF 2014. Insights into the population structure of Mycobacterium tuberculosis using spoligotyping and RDRio in a southeastern Brazilian prison unit. *Infect. Genet. Evol.* 26: 194–202.
- Ingen J van, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, Soolingen D van 2012. Characterization of Mycobacterium orygis as M. tuberculosis complex subspecies. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 653–655.
- Inghammar M, Ekblom A, Engström G, Ljungberg B, Romanus V, Löfdahl CG, Egesten A 2010. COPD and the risk of tuberculosis - a population-based cohort study. *PLoS One* 5: 1–7.
- Jenum S, Dhanasekaran S, Lodha R, Mukherjee A, Kumar Saini D, Singh S, Singh V, Medigeshi G, Haks MC, Ottenhoff THM, Doherty TM, Kabra SK, Ritz C, Grewal HMS 2016. Approaching a diagnostic point-of-care test for pediatric tuberculosis through evaluation of immune biomarkers across the clinical disease spectrum. *Sci. Rep.* 6: 18520.
- Jeon HS, Shin a.-R, Son Y-J, Kim J-M, Jang Y, Kim S, Lee K-I, Choi CH, Park J-K, Kim H-J 2015. An evaluation of the use of immunoglobulin A antibody response against mycobacterial antigens for the diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 27: 344–351.
- Kalra M, Khuller GK, Grover A, Behera D, Wanchu A, Verma I 2010. Utility of a combination of RD1 and RD2 antigens as a diagnostic marker for tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 66: 153–161.
- Kapur V, Whittam TS, Musser JM 1994. Is Mycobacterium tuberculosis 15,000 years old? *J Infect Dis.* 170(5):1348-9.
- Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE 2004. Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. *Cell. Microbiol.* 6: 105–116.

- Karboul A, Mazza A, Gey Van Pittius NC, Ho JL, Brousseau R, Mardassi H 2008. Frequent homologous recombination events in Mycobacterium tuberculosis PE/PPE multigene families: Potential role in antigenic variability. *J. Bacteriol.* 190: 7838–7846.
- Kanunfre KA. Tuberculose pulmonar: aumento da eficiência diagnóstica pela associação de métodos microbiológicos e imunológicos para pesquisa de anticorpos IgG anti - Mycobacterium tuberculosis por Western blotting e interferon-gama. Tese PhD. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2007. 141 pp.
- Khan N, Alam K, Nair S, Valluri VL, Murthy KJR, Mukhopadhyay S 2008. Association of strong immune responses to PPE protein Rv1168c with active tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 974–980.
- Khan K, Hirji MM, Miniota J, Hu W, Wang J, Gardam M, Rawal S, Ellis E, Chan A, Creatore MI, Rea E 2015. Domestic impact of tuberculosis screening among new immigrants to Ontario, Canada. *CMAJ:* 187(16)
- Kim SY, Park MS, Kim YS, Kim SK, Chang J, Lee HJ, Cho SN, Kang YA 2012. The Responses of Multiple Cytokines Following Incubation of Whole Blood from TB Patients, Latently Infected Individuals and Controls with the TB Antigens ESAT-6, CFP-10 and TB7.7. *Scand. J. Immunol.* 76: 580–586.
- Korb V, Chuturgoon A, Moodley D 2016. Mycobacterium tuberculosis: Manipulator of Protective Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 131.
- Kunnath-Velayudhan S, Porcelli SA 2013a. Recent Advances in Defining the Immunoproteome of Mycobacterium tuberculosis. *Front. Immunol.* 4: 335.
- Kunnath-Velayudhan S, Salamon H, Wang H-Y, Davidow AL, Molina DM, Huynh VT, Cirillo DM, Michel G, Talbot E a, Perkins MD, Felgner PL, Liang X, Gennaro ML 2010. Dynamic antibody responses to the Mycobacterium tuberculosis proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 14703–14708.
- Kutlu A, Bozkurt B, Ciftci F, Bozkanat E 2007. Th1-Th2 interaction: Is more complex than a see-saw? *Scand. J. Immunol.* 65: 393–395.
- Legesse M, Ameni G, Medhin G, Mamo G, Franken KLMC, Ottenhoff THM, Bjune G, Abebe F 2013. 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.* 78: 266–274.
- Lequin RM 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* 51: 2415–2418.
- Li Y, Miltner E, Wu M, Petrofsky M, Bermudez LE 2005. A Mycobacterium avium PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. *Cell. Microbiol.* 7: 539–548.
- Liaquat A, Iram S, Hussain S, Yusuf NW, Azeem H 2015. Concomitant presence of culture-proven active pulmonary tuberculosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease - A Hospital based study. *Pakistan J. Med. Sci.* 31: 1344–1348.
- Lönnroth K, Williams BG, Stadlin S, Jaramillo E, Dye C 2008. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis - a systematic review. *BMC Public Health* 8: 289.
- Losi M, Knights AJ, Mariani F, Altieri AM, Paone G, Loxton AG, Chegou NN, Kenneth J, Alma MG, Colizzi V, Walzl G, Saltini C, Boyle J, Amicosante M 2015. QuantiFERON-

TB performance enhanced by novel *Mycobacterium tuberculosis* -specific antigens: TABLE 1. *Eur. Respir. J.*: ERJ – 01015–02015.

- Louw JS, Mabaso M, Peltzer K 2016. Change in Health-Related Quality of Life among Pulmonary Tuberculosis Patients at Primary Health Care Settings in South Africa: A Prospective Cohort Study. *PLoS One* 11: e0151892.
- Lyadova I V., Pantelev A V. 2015. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm.* 2015.
- Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D, Gennaro ML 1998. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infection and Immunity*. Vol. 66, No. 8. p. 3936–3940
- Maciel MDS, Siqueira-batista R, Mendes PD, Gomes AP 2012. A história da tuberculose no Brasil : os muitos tons ( de cinza ) da miséria \*. *Rev. Bras. Clínica Médica* 10: 226–230.
- Maltez FA, Ramalho Rde, Belém Mde 2014. História de doenças infecciosas. Tipografia Artes Gráficas.
- Mattos AMM, Chaves AS, Franken KLMLC, Figueiredo BBM, Ferreira AP, Ottenhoff THM, Teixeira HC 2016. Detection of IgG1 antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* DosR and Rpf antigens in tuberculosis patients before and after chemotherapy. *Tuberculosis* 96: 65–70.
- Mertens J, Flisher A, Ward C, Bresick G, Sterling S, Weisner C 2010. Medical Conditions of Hazardous Drinkers and Drug Users in Primary Care Clinics in Cape Town, South Africa. *Prim. Care* 39: 1–26.
- Moutinho ILD 2011. Tuberculose : aspectos imunológicos na infecção e na doença. 21: 42–48.
- Murray P, Rosenthal SK, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. Elsevier Editora Ltda. 2009. 6th edição.
- Nair S, Pandey AD, Mukhopadhyay S 2011. The PPE18 protein of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits NF- $\kappa$ B/rel-mediated proinflammatory cytokine production by upregulating and phosphorylating suppressor of cytokine signaling 3 protein. *J. Immunol.* 186: 5413–5424.
- Nair S, Ramaswamy P a, Ghosh S, Joshi DC, Pathak N, Siddiqui I, Sharma P, Hasnain SE, Mande SC, Mukhopadhyay S 2009. The PPE18 of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage. *J. Immunol.* 183: 6269–6281.
- Nerlich AG, Lösch S 2009. Paleopathology of human tuberculosis and the potential role of climate. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009: 437187.
- NICE 2016. Tuberculosis Prevention, diagnosis, management and service organisation.
- Ocepek M, Pate M, Zolnir-Dove M, Poljak M 2005. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3555–3557.
- Flynn UJL, Chan J 2001. Immunology of Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 93–129.
- Okkels LM, Brock I, Brock I, Follmann F, Follmann F, Agger EM, Agger EM, Rosenkrands I, Rosenkrands I, Andersen P, Andersen P 2003. PPE Protein (Rv3873) from DNA Segment RD1 of. *Society* 71: 6116–6123.
- Parkash O, Singh BP, Pai M 2009. Regions of differences encoded antigens as targets for

- immunodiagnosis of tuberculosis in humans. *Scand. J. Immunol.* 70: 345–357.
- Perrin P 2015. Human and tuberculosis co-evolution: An integrative view. *Tuberculosis* 33: 1–5.
- Plessis WJ du, Walzl G, Loxton AG 2016. B cells as multi-functional players during *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Tuberculosis (Edinb)*. 97: 118–125
- Pôrto Â 2007. Representações sociais da tuberculose: estigma e preconceito. *Rev. Saude Publica* 41: 43–49.
- Rie A Van, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W 2010. Xpert(®) *MTB/RIF* for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10: 937–946.
- Rindi L, Peroni I, Lari N, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C 2007. Variation of the expression of *Mycobacterium tuberculosis* ppe44 gene among clinical isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51: 381–387.
- Rocha ALDC, Barreto AMW, Sant’Anna CC, Campos CED, (Kiki) CACB, Capone D, Bethlem EP, Martins FM, Melo FAF De, Vicentin G, Filho GG, Mourão GT 2008. *Controle da Tuberculose*.
- Rodrigues ACP dos S 2015. Tuberculose, um problema de saúde pública. *Univ. Lusófona Humanidades e Tecnol. ciências e Tecnol. saúde-Lisboa*: 1–65.
- Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A 2014. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.*
- Romano M, Rindi L, Korf H, Bonanni D, Adnet PY, Jurion F, Garzelli C, Huygen K 2008. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis subunit vaccines expressing PPE44 (Rv2770c). *Vaccine* 26: 6053–6063.
- Rosano GL, Ceccarelli EA 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* 5: 1–17.
- Ruffino-Netto A 2002. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35: 51–58.
- Sampson SL 2011. Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface. *Clin. Dev. Immunol.* 2011.
- Sardella IG 2015. 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.* 05.
- Sardella IG, Singh M, Kumpfer S, Heringer RR, Saad MHF, Sohler MP 2010. Evaluation of Lionex TB kits and mycobacterial antigens for IgG and IgA detection in cerebrospinal fluid from tuberculosis meningitis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 722–728.
- Scatena LM, Villa TCS, Netto AR, Kritski AL, Monteiro de Figueiredo TMR, Vendramini SHF, Araújo Assis MM de, Motta MCS da 2009. Dificuldades de acesso a serviços de saúde para diagnóstico de tuberculose em municípios do Brasil. *Rev. Saude Publica* 43: 389–397.
- Silva Jr. JB da 2004. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. *J. Bras. Pneumol.* 30: S57–S86.
- Silva VMC, Sardella IG, Luiz RR, Cunha AJL a, Cavalcanti AH, Mahavir S, Barreto MM,

- Rodrigues RS, Carvalho TF, Saad MHF 2008. Immunoreactivity of five antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in patients attending a public health care facility in an area with high endemicity for TB. *Microbiol. Immunol.* 52: 544–550.
- Silva MV Da, Tiburcio MGS, Machado JR, Silva DAA, Rodrigues DBR, Rodrigues V, Oliveira CJF 2015. Complexity and Controversies over the Cytokine Profiles of T Helper Cell Subpopulations in Tuberculosis. *J. Immunol. Res.* 2015.
- Singh KK, Dong Y, Patibandla SA, McMurray DN, Arora VK, Laal S 2005. Immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE55 (Rv3347c) protein during incipient and clinical tuberculosis. *Infect. Immun.* 73: 5004–5014.
- Shingadia D & Novelli V (2008) The tuberculin skin test: a hundred, not out? *Arch Dis Child* 93: 189–190
- Smith I 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 463–496.
- Song Y, Lee B-R, Cho S, Cho Y-B, Kim S-W, Kang TJ, Kim SC, Cho B-K, Avery S, Barrick J, Lenski R, Blattner F, Plunkett G, Bloch C, Cameron D, Bashor C, Collins J, Chang M, Eachus R, Trieu W, Ro D, Cheng K, Lee B, Masuda T, Conrad T, Frazier M, Joyce A, Conrad T, Lewis N, Palsson B, Denamur E, Matic I, Dhamankar H, Prather K, Dragosits M, Mozhayskiy V, Quinones-Soto S, Ferenci T, Forde B, O’Toole P, Freddolino P, Amini S, Tavazoie S, Grant S, Jessee J, Bloom F, Hanahan D, Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Kato A, Tanabe H, Utsumi R, Kraigsley A, Finkel S, Langley K, Villarejo M, Fowler A, Nielsen R, Paul J, Albrechtsen A, Olsen L, Vetting M, Roderick S, Peters J, Thate T, Craig N, Serruto D, Galeotti C, Stevenson G, Neal B, Liu D, Stoebel D, Hokamp K, Last M, Vollmer W, Rechenberg M von, Holtje J, Wang L, Spira B, Zhou Z, Xia X, Qian Z, Lee S 2015. Determination of single nucleotide variants in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  by using short-read sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 362: 577–587.
- Soolingen D Van, Hoogenboezem T, Haas PEW De, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, Embden JDA Van 1997. A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1236–1245.
- Souza MV de N, Vasconcelos TRA 2005. Fármacos no combate à tuberculose: Passado, presente e futuro. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 4, 678-682.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 9869–9874.
- Srivastava R, Kumar D, Waskar MN, Sharma M, Katoch VM, Srivastava BS 2006. Identification of a repetitive sequence belonging to a PPE gene of *Mycobacterium tuberculosis* and its use in diagnosis of tuberculosis. *J. Med. Microbiol.* 55: 1071–1077.
- Stam C, Collins A, Shiloh M 2015. Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and consequences to both host and bacillus. *NIH Immunol Rev.* 264 (1): 204-219.
- Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, Schiller I, Laal S, Ramsay A, Hopewell PC, Pai M 2011. Commercial Serological Tests for the Diagnosis of Active Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med* 8(8): e1001062

- Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N 2014. Xpert® *MTB/RIF* assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane database Syst. Rev.* 1.
- Stitbulov R, Filho EJ. “Pneumopatias na Gestaç o” In: Fernandes ALG, Mendes ESPS, Terra FM (org). Sociedade Paulista de Pneumologia e Fisiologia/SPPT - Pneumologia, atualização e reciclagem Ed Atheneu, São Paulo, p. 28-29, 1999
- Teixeira HC, Abramo C, Munk ME 2007. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *J. Bras. Pneumol.* 33: 323–334.
- Teran R, Waard JH de 2015. Recent advances in the laboratory diagnosis of tuberculosis. *eJIFCC* Volume 26 no 4
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL 2012. Microbiologia. Doenç as Microbianas do trato respiratório. *Arthmed. Brasil.* 674-704pp.
- Viana-Niero C, Leão SC 2004. Limitações do uso do fragmento mtp40 como marcador de diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*. *J. Bras. Pneumol.* 30: 407–407.
- Vigilância S De 2013. Tuberculose: alinhada com o social, afinada com a tecnologia. *Bol. Epidemiológico* 44: 1–6.
- Volkman T, Moonan PK, Miramontes R, Oeltmann JE 2016. Excess Alcohol Use and Death among Tuberculosis Patients in the United States, 1997-2012. *J. Tuberc. Res.* 4: 18–22.
- Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, Laval F, Daffe M, Smith I 2006. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 60: 312–330.
- Wang J, Qie Y, Zhang H, Zhu B, Xu Y, Liu W, Chen J, Wang H 2008. PPE protein (Rv3425) from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis*: A novel immunodominant antigen of *Mycobacterium tuberculosis* induces humoral and cellular immune responses in mice. *Microbiol. Immunol.* 52: 224–230.
- Wang JL, Qie YQ, Zhu BD, Zhang HM, Xu Y, Wang QZ, Chen JZ, Liu W, Wang HH 2009. Evaluation of a recombinant BCG expressing antigen Ag85B and PPE protein Rv3425 from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis* in C57BL/6 mice. *Med. Microbiol. Immunol.* 198: 5–11.
- Who 2013. Global Tuberculosis Report 2013. *World Heal. Organ.:* 306.
- Who 2014. Global tuberculosis report 2014 (WHO/HTM/TB/2014.08).
- Yang H, Kruh-Garcia NA, Dobos KM 2012. Purified protein derivatives of tuberculin - past, present, and future. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 66: 273–280.
- Yang H, Sha W, Song P, Liu Z, Qin L, Huang X, Lu J, Wang J, Duthie MS, Xiao H, Hu Z 2016. Screening and identification of immunoreactive peptide mimotopes for the enhanced serodiagnosis of tuberculosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 2279–2287.
- Zhang H, Wang J, Lei J, Zhang M, Yang Y, Chen Y, Wang H 2007. PPE protein (Rv3425) from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis*: A potential B-cell antigen used for serological diagnosis to distinguish vaccinated controls from tuberculosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 139–145.