

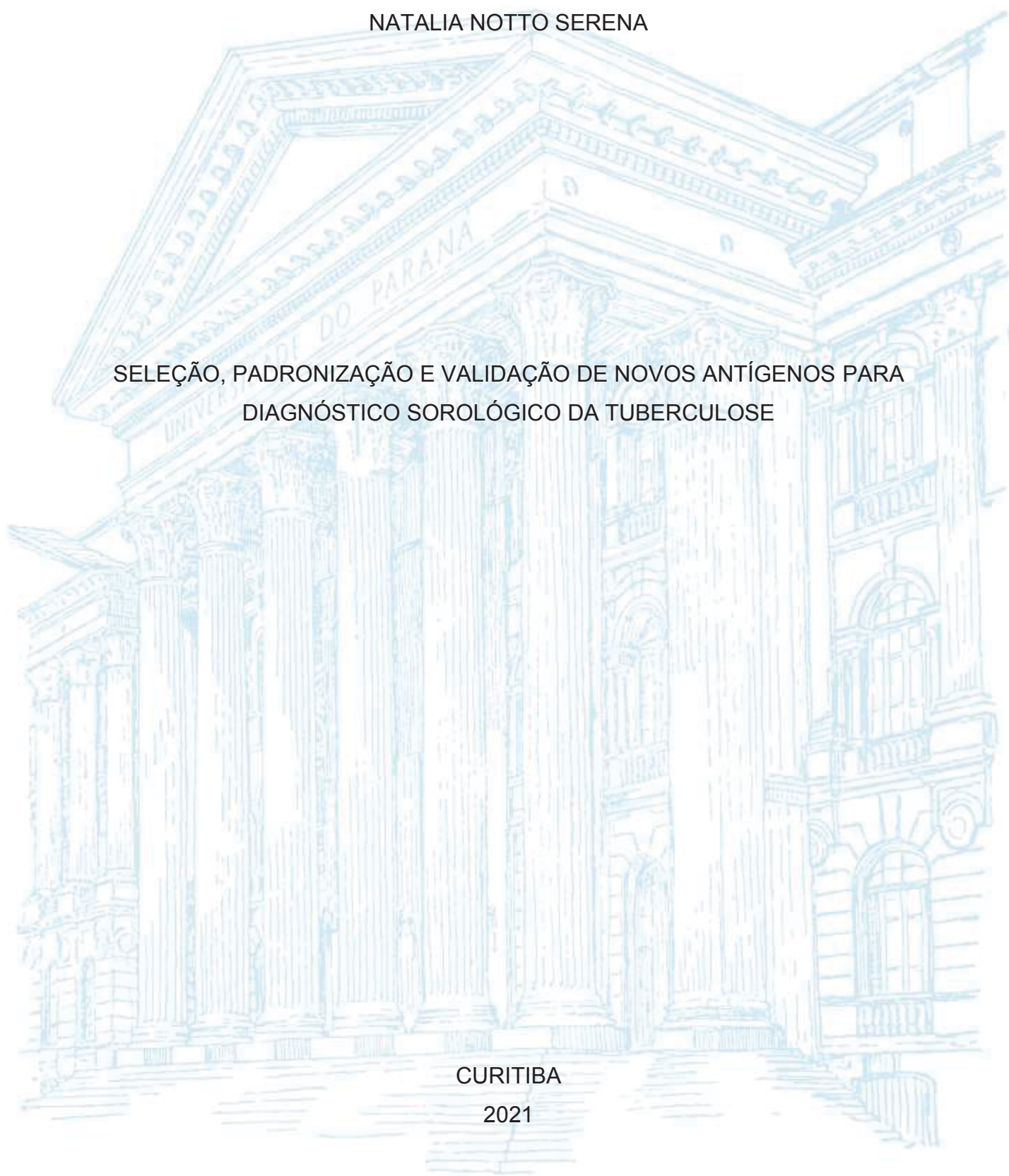
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATALIA NOTTO SERENA

SELEÇÃO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS PARA
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA TUBERCULOSE

CURITIBA

2021



NATALIA NOTTO SERENA

SELEÇÃO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS PARA
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA TUBERCULOSE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Vanete Thomaz Soccol.

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S483s Serena, Natalia Notto
Seleção, padronização e validação de novos antígenos para diagnóstico sorológico da
tuberculose [Recurso eletrônico] / Natalia Notto Serena. – Curitiba, 2021.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de
PósGraduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Vanete Thomaz Soccol.

1. Tuberculose. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Peptídeos. 4. Antígenos. 5. Diagnóstico.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Vanete Thomaz. III. Título.

CDD: 614.542

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATALIA NOTTO SERENA** intitulada: **SELEÇÃO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA TUBERCULOSE**, sob orientação da Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica
19/04/2021 12:01:13.0

VANETE THOMAZ SOCCOL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
20/04/2021 08:32:21.0

MARIA ROSA MACHADO PRADO
Avaliador Externo (FACULDADE E INSTITUTO PEQUENO PRÍNCIPE)

Assinatura Eletrônica
20/04/2021 11:31:50.0

SUSAN GRACE KARP
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
19/04/2021 13:29:16.0

ELIEZER LUCAS PIRES RAMOS
Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela saúde, pela vida e pelas oportunidades.

Aos meus pais e irmão, que sempre se fazem presente e me dão apoio,

Ao meu marido, pela companhia diária, compreensão e força;

À professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, que tem toda minha admiração, pela oportunidade para realizar este trabalho, pela orientação e confiança;

Aos professores, aos técnicos e aos colegas do programa de pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pelos conhecimentos transmitidos e cooperação;

A todo o pessoal do laboratório de Biologia Molecular, sou muito grata pela ajuda e apoio para a realização deste trabalho. Agradeço em especial, Manuel Hospinal Santiani, Violetta Dias Pacce e Raphael Aparecido Boschero.

Ao Hospital Regional da Lapa São Sebastião, pela disponibilização dos soros dos pacientes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

É difícil agradecer cada um que esteve ao meu lado nos momentos em que precisei, mas, sou grata a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa que afeta populações de diferentes partes do mundo. A taxa de infecção por 100 mil habitantes varia de um país a outro, sendo que os países com maior incidência estão no continente africano e em partes da Ásia, seguidos de alguns países da América. Dentre os métodos de controle estão o diagnóstico e tratamento precoces para evitar a disseminação do *Mycobacterium tuberculosis*. Os métodos diagnósticos preconizados são o exame clínico, bacterioscópico e os métodos laboratoriais complementares. Dentre eles estão os métodos imunológicos e moleculares. Todavia, todos possuem vantagens e desvantagens e por esta razão os órgãos responsáveis pela saúde estão sempre incentivando a inovação na área diagnóstica. Este trabalho teve como objetivo a pesquisa de novos antígenos candidatos para testes sorológicos, menos invasivos, e para os quais a estrutura laboratorial da rede pública já tem disponibilidade de equipamentos. Para seleção dos antígenos foi usada a técnica de *phage display*. Para avaliação da imunogenicidade dos mesmos foram usadas as técnicas de imunodeteção em membrana, avaliação *in silico* e teste ELISA. Quatro peptídeos (P.Mt. PD 4, P.Mt. PD 6, P.Mt. PD 7, P.Mt. PD 8) se mostraram reagentes na membrana e na análise de bioinformática apresentaram *scores* que variaram de 0,5338 a 0,9341. Na padronização dos parâmetros concentração de antígenos, diluição de soros, e diluição de conjugado o peptídeo P.Mt. PD 8 apresentou melhor resposta ao diferenciar soros de pacientes positivos de soros negativos. Finalmente a validação deste antígeno frente a soros de pacientes com tuberculose ativa e indivíduos negativos apresentou sensibilidade e especificidade de 100%. O teste de avidéz usado em ensaio imunoenzimático foi realizado para avaliar a força de ligação do anticorpo com o antígeno e foi obtido um índice de 85,72%, mostrando que o peptídeo P.Mt. PD 8 é um excelente candidato ao diagnóstico da tuberculose por ter alta sensibilidade, alta especificidade e alta avidéz.

Palavras-chave: Tuberculose. *Mycobacterium*. Phage display. Peptídeos. Antígenos. Diagnóstico.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious and contagious disease that affects people in different parts of the world. The infection rate per 100,000 inhabitants varies from country to country with the highest incidence being in the African continent and in parts of Asia, followed by some countries in America. Control methods include early diagnosis and treatment to prevent the spread of *Mycobacterium tuberculosis*. The early diagnostic procedures are clinical, bacterioscopic and complementary laboratory methods which include immunological and molecular methods. However, these methods have advantages and disadvantages that make health organizations to encourage research and innovation in the diagnostic field. The aim of this work was the research of new candidate antigens for serologic tests which are less invasive and for which the public health network already has laboratory structure and equipment available. For the selection of antigens, the phage display technique was used and to assess their immunogenicity the techniques of membrane immunodetection, in silico evaluation and ELISA test were used. Four peptides (P.Mt. PD 4, P.Mt. PD 6, P.Mt. PD 7, P.Mt. PD 8) showed to be reagent on the membrane and, in the bioinformatics analyses, presented scores from 0.5338 to 0.9341. The peptide 8 showed better response in differentiating positive from negative sera during the standardization of the parameters antigen concentration, serum dilution and conjugate dilution. Finally, the validation of this antigen against sera obtained from patients with active tuberculosis and negative individuals showed sensitivity and specificity of 100%. The avidity test used in an enzyme immunoassay was carried out to assess the binding strength of the antibody with the antigen and presented an index of 85.72%, showing that peptide 8 is an excellent candidate for the diagnosis of tuberculosis due to its high sensitivity, high specificity and high avidity.

Keywords: Tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis*. Phage display. Peptide. Antigen. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Estimativa mundial de incidência por 100.000 habitantes/ano de Tuberculose em 2019..... | 16 |
| Figura 2- Distribuição da tuberculose no Brasil em 2019. | 17 |
| Figura 3 - Fluxograma: Etapas do estudo. | 28 |
| Figura 4 – Imunodeteção dos peptídeos selecionados por <i>phage display</i> frente a soros de pacientes com tuberculose ativa – Revelação em filme fotográfico | 39 |
| Figura 5 – Diagrama de pareto das padronizações dos peptídeos P.Mt.PD.4, P.Mt.PD. 6, P.Mt.PD.7 e P.Mt.PD.8, que avalia as condições ótimas para o teste. Onde: A: soro, B: antígeno, C: tampão de bloqueio com BSA, D: Conjugado anti-human IgG conjugado a biotina, E: Neutravidin® | 41 |
| Figura 6– Representação gráfica dos resultados obtidos na padronização dos peptídeos como antígenos em teste diagnóstico para tuberculose - avaliando concentração do antígenos, diluição do soro, diluição do anticorpo secundário | 42 |
| Figura 7- Condições ótimas e influência das variáveis para o resultado do teste ELISA, previstos no modelo experimental, utilizando o Peptídeo P.MT.PD 8 como antígeno da reação..... | 43 |
| O gráfico da figura 8 representa a dispersão dos valores das absorbâncias dos soros positivos e negativos testados. Os valores não se sobrepõe, indicando baixa probabilidade de falsos positivos ou falsos negativos no teste..... | 43 |
| Figura 8 – Representação gráfica mostrando a diferença de reatividade entre soros positivos e negativos, utilizando condições da padronização final do teste, utilizando o Peptídeo P.MT.PD 8 como antígeno da reação. | 44 |
| Figura 9 – Curva ROC do teste ELISA para uso em diagnóstico de tuberculose, utilizando o Peptídeo P.MT.PD 8 como antígeno da reação. | 45 |
| Figura 10 – Teste de avides do peptídeo 8 | 46 |
| Figura 11 – Média e desvio padrão, amostras utilizadas para determinação do Índice de avides do Peptídeo P.MT.PD 8..... | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Métodos diagnósticos de tuberculose disponíveis na atualidade – vantagens e desvantagens. | 20 |
| Tabela 2- Métodos de ensaio Imunoenzimático - Características..... | 24 |
| Tabela 4– Variáveis testadas por delineamento experimental (variáveis independentes) para padronização de teste ELISA | 33 |
| Tabela 5 – Sequência de aminoácidos dos peptídeos obtidos por <i>phage display</i> , testados para uso como antígeno em teste diagnóstico. | 37 |
| Tabela 6 – Cobertura e identidade das sequências obtidas pelo <i>Phage display com sequências do grupo MTBC</i> | 38 |
| Tabela 7 - Antigenicidade dos peptídeos obtidos por <i>Phage display</i> , para uso em diagnóstico de Tuberculose, obtidas pelos <i>softwares</i> Vaxijen e IEDB. | 39 |
| Tabela 8 - Equações de modelação da resposta a partir do planejamento experimental. Onde: S – Soro, A – Antígeno, B – Bloqueio, Bi – Biotina, N – Neutravidina | 41 |

LISTA DE EQUAÇÕES

| | |
|---|----|
| Equação da variável resposta Eq.1 | 30 |
| Equação de regressão da variável resposta.Eq.2..... | 38 |
| Equação de regressão da variável resposta.Eq.3..... | 39 |
| Equação de regressão da variável resposta.Eq.4..... | 39 |
| Equação de regressão da variável resposta.Eq.5..... | 39 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 15 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 EPIDEMIOLOGIA..... | 16 |
| 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO | 18 |
| 2.3 A DOENÇA | 18 |
| 2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA..... | 19 |
| 2.5 DIAGNÓSTICO | 19 |
| 2.5.1 Baciloscopia | 21 |
| 2.5.2 Cultura | 21 |
| 2.5.3 Exame radiológico..... | 22 |
| 2.5.4 Prova tuberculínica | 22 |
| 2.5.5 Teste molecular <i>Xpert</i> ® MTB/RIF | 23 |
| 2.5.6 Teste sorológico..... | 23 |
| 2.6 <i>PHAGE DISPLAY</i> | 25 |
| 2.7 TRATAMENTO | 26 |
| 2.8 PREVENÇÃO..... | 26 |
| 3.1 <i>PHAGE DISPLAY</i> | 28 |
| 3.2 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> | 31 |
| 3.3 SÍNTESE QUÍMICA EM MEMBRANA DE CELULOSE E IMUNODETECÇÃO | 31 |
| 3.5 PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA | 33 |
| 3.5.1 Delineamento experimental | 33 |
| 3.5.2 REALIZAÇÃO DO TESTE ELISA | 34 |

| | |
|--|----|
| 3.6 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E NÍVEL DE CORTE DA REAÇÃO | 35 |
| 4 RESULTADOS | 37 |
| 4.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> | 37 |
| 4.2 IMUNODETECÇÃO | 39 |
| 4.3 PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA | 40 |
| 4.3.1 Delineamento experimental para padronização do teste ELISA | 40 |
| 4.4 DETERMINAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE | 43 |
| 4.5 TESTE DE AVIDEZ..... | 45 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 46 |
| 5.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> | 48 |
| 5.2 IMUNODETECÇÃO..... | 48 |
| 5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....; | 49 |
| 5.4 TESTE DE AVIDEZ..... | 50 |
| 5.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE..... | 50 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 52 |
| REFERÊNCIAS..... | 54 |

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, causada por várias espécies de bactéria do gênero *Mycobacterium*, especialmente as do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (LIMA, et al. 2017). A doença é considerada emergência de saúde pública mundial, o que demonstra sua importância ainda na atualidade. O Brasil está na lista dos países prioritários para o controle da tuberculose (OMS, 2019).

A prevalência da TB se dá principalmente em locais com alta concentração populacional e precárias condições socioeconômicas e sanitárias (WHO, 2019). Quando se apresenta na forma ativa, a bactéria é transmitida pela inalação de gotículas dispersas no ar contendo o agente patogênico, que são expelidas pela tosse, espirro e fala de pacientes infectados (KOZAKEVICH; SILVA, 2015).

Como ações de enfrentamento para evitar a disseminação da doença, há o tratamento correto e o diagnóstico precoce, visando promover a interrupção do ciclo de transmissão de *M. tuberculosis* resistente e identificar rapidamente os casos clínicos ativos. Tais ações de enfrentamento são preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), especialmente em países do bloco econômico BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) (OMS, 2019).

De acordo com recomendações do Ministério da Saúde (MS), para o diagnóstico da tuberculose deve-se primeiramente avaliar o quadro clínico do paciente. Para confirmação, são indicados os exames laboratoriais teste *Xpert*® MTB/RIF, prova tuberculínica (PPD), teste microbiológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Estes testes, no entanto, apresentam algumas desvantagens, uns por demandarem tempo para emissão do laudo diagnóstico, o que permite ao portador disseminar o patógeno para outras pessoas; outros por apresentarem reação cruzada com a vacina de BCG e, no caso do teste molecular, ser de alto custo. Frente a esse panorama, são necessárias novas alternativas de diagnóstico para a doença. Uma alternativa apresentada são os testes sorológicos, tecnologia já existente no mercado, que possuem baixo

custo, podem ser aplicados para grandes quantidades de amostras e apresentam resultados que podem ser facilmente visualizados por reações de cor.

Baseando-se nessa tecnologia, esse trabalho visou utilizar peptídeos sintéticos obtidos pela técnica de *phage display* e sequencialmente os resultados foram avaliados utilizando a plataforma de teste ensaio imunoenzimático (ELISA), viabilizando-os para uso como antígenos. Os antígenos obtidos que apresentaram alta sensibilidade e especificidade foram empregados em teste diagnóstico sorológico para avaliação da presença de anticorpos contra *M. tuberculosis* presentes no soro de pacientes.

1.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar antígenos, padronizar e validar teste diagnóstico sorológico para tuberculose humana a partir de peptídeos sintéticos obtidos por *phage display* em plataforma de imunoensaio.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

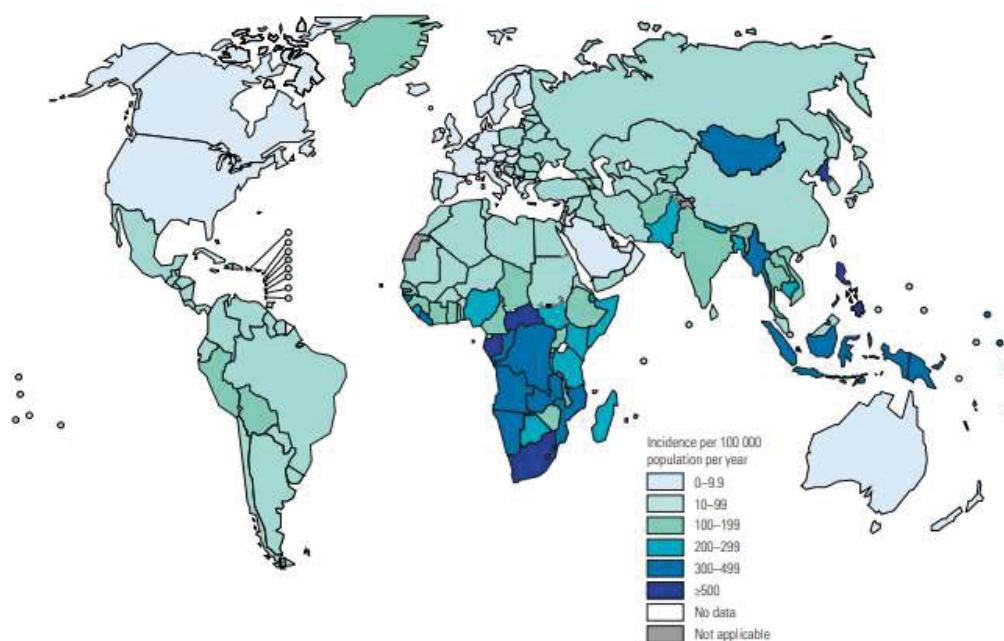
- Avaliar potencial antigênico de peptídeos obtidos pela técnica de *phage display* para uso em diagnóstico de tuberculose;
- Realizar a padronização das condições da reação do teste ELISA utilizando o peptídeo selecionado como antígeno para tuberculose;
- Determinar a sensibilidade, especificidade e avidéz do peptídeo utilizado como antígeno em teste ELISA para diagnóstico de tuberculose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose ainda hoje é considerada um problema de saúde pública mundial, e está entre as dez principais causas de morte em seres humanos. A taxa de incidência da doença no mundo, por 100.000 habitantes/ano, varia de um país a outro (Figura 1). Em 2019, foram contabilizados aproximadamente 10 milhões de novos casos de tuberculose no mundo, e 1,4 milhão de mortes (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2020).

Figura 1- Estimativa mundial de incidência por 100.000 habitantes/ano de Tuberculose em 2019.



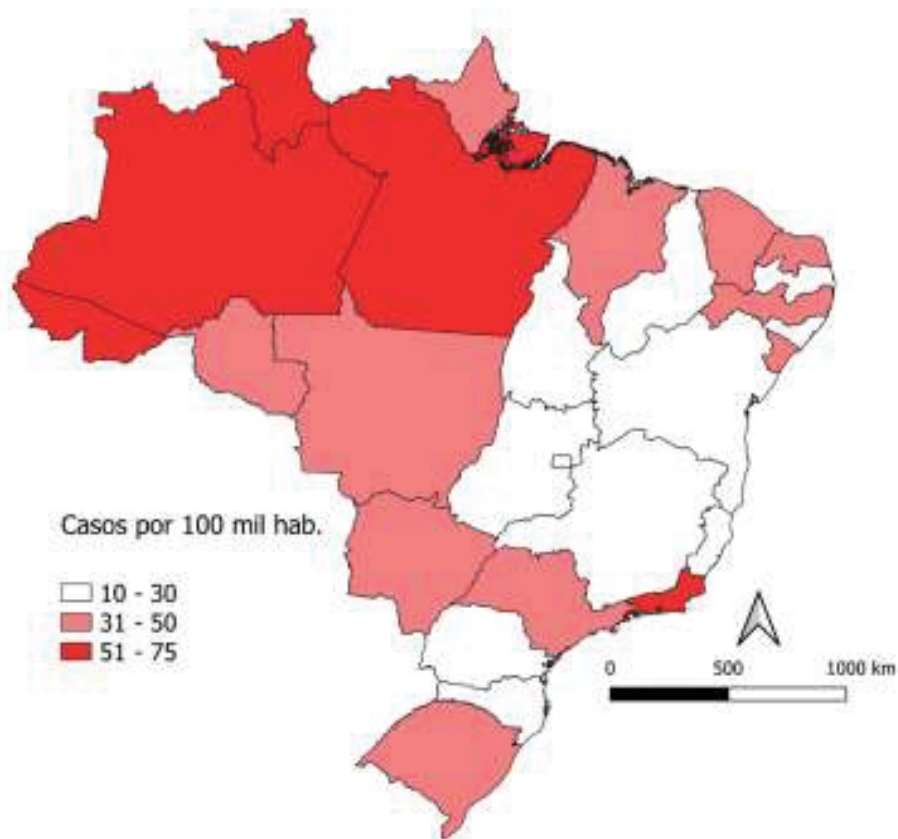
Fonte: OMS, 2020.

Considerada uma doença negligenciada, a tuberculose afeta principalmente países de baixa renda e com alta concentração populacional (Figura 1). Os países com maior incidência estão no continente africano e em partes da Ásia, seguidos de alguns países da América (OMS, 2019).

O Brasil, segundo a classificação da OMS (2019), encontra-se entre os 30 países com maior taxa de infecções de tuberculose do mundo, e está entre

os países prioritários que devem tomar medidas para controle da doença. Foram registrados, em 2019 no país, 73.864 novos casos de tuberculose, gerando um coeficiente de incidência de 35 casos a cada 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020), que varia conforme o estado e região do país (Figura 2).

Figura 2- Distribuição da tuberculose no Brasil em 2019.



Fonte: Ministério da Saúde, 2020.

A variabilidade na incidência de casos pode ser observada conforme as regiões. Estados da Região Norte e o Rio de Janeiro são os mais afetados pela doença, com coeficiente variando de 51 a 75 casos por 100 mil habitantes. No Paraná, em 2019, foram notificados 2209 novos casos e 269 óbitos pela doença. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

A tuberculose é uma doença causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como bacilo de Koch. Foi identificado por Robert Koch, em 1882 (COHEN, et.al. 2017). Este bacilo pertence ao Complexo *M. tuberculosis* (MTBC) (SILVA et al. 2018), que inclui outras espécies de *Mycobacterium* capazes de causar tuberculose, como *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedi*, *M. caprae* e *M. canettii* (SATO et al. 2018).

Os micro-organismos do complexo MTBC são classificados como actinomicetos, tem a característica de ser álcool ácido resistentes (retém fucsina básica em sua parede celular, mesmo na presença de álcool e ácido) e aeróbicos. Se multiplicam de forma lenta, levando semanas para formar colônias visíveis em cultivo. No organismo do hospedeiro são micro-organismos intracelulares que infectam e proliferam-se no interior de macrófagos (PALMER, 2001).

2.3 A DOENÇA

O agente patogênico é transmitido por gotículas contendo o bacilo, que são expelidas por pacientes bacilíferos. Quando ocorre a inalação da gotícula infectada, o sistema imunológico pode inibir a multiplicação da micobactéria, levando ao quadro de tuberculose latente. Todavia, quando o sistema imune não consegue conter o bacilo, ele se multiplica levando ao desenvolvimento da tuberculose ativa (FOGEL, 2015).

Frequentemente a infecção por *M. tuberculosis* atinge os pulmões, mas a disseminação pode ocorrer para qualquer parte do corpo, resultando em tuberculose extrapulmonar (PEIRSE, HOUSTON, 2017). Os órgãos mais atingidos pela forma extrapulmonar são a pele, sistema linfático, rins, intestino, sistema nervoso central, pericárdio e sistema pleural (LOPES, et al. 2006).

Os principais sintomas da doença são tosse produtiva e expectoração, que se iniciam de forma lenta e podem se estender por mais de duas semanas.

O indivíduo também pode apresentar perda de peso, sudorese noturna, hemoptise e febre (SANTOS, 2012), além de fraqueza e dor torácica (SIQUEIRA, 2012).

Como são sintomas inespecíficos, recomenda-se realizar uma busca ativa para casos de tuberculose em pessoas com maior risco. Que são aquelas que tiveram contato com pessoa infectada, residentes de comunidades com alta prevalência de tuberculose, pacientes soropositivos, alcoólatras, fumantes, pessoas em situação de rua, detentos, diabéticos e profissionais de saúde (SIQUEIRA, 2012).

2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA.

Após a infecção do indivíduo pelas gotículas bacilíferas, inicia-se a resposta inflamatória contra a micobactéria. O bacilo inalado é fagocitado por macrófagos que produzirão um fagossomo e podem fundir a vesícula formada aos lisossomos. Nesse processo de fagocitose são produzidas citocinas e quimiocinas que farão a sinalização da presença do patógeno ao sistema imune. O que atrai para o local de infecção, neutrófilos, monócitos e linfócitos (KOZAKEVICH. SILVA. 2015). Essas células se acumulam no local, formando um granuloma, que age como barreira física e imunológica (LOXTON, 2019).

Se esse processo falhar, os bacilos podem se multiplicar e causar a sinalização da produção de IL-1- α , IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias do hospedeiro (FOGEL, 2015). Nesta etapa da resposta inflamatória, a micobactéria começa a proliferar, aproveitando-se da ausência de uma resposta imunológica específica, causando a doença ativa (KOZAKEVICH. SILVA. 2015).

2.5 DIAGNÓSTICO

Segundo recomendações do Ministério da Saúde (MS), para se diagnosticar a tuberculose, avalia-se o quadro clínico do paciente. Após isso, é

realizada a confirmação por exames bacteriológicos (baciloscopia e cultura), teste radiológico e testes moleculares (BRASIL, 2019).

Estão disponíveis para diagnóstico vários métodos, que possuem vantagens e desvantagens. As principais dificuldades encontradas são possibilidade de exames falso-negativo, tempo para obtenção de resultado, e, no caso dos métodos moleculares, alto custo. As principais características de cada método estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1- Métodos diagnósticos de tuberculose disponíveis na atualidade – vantagens e desvantagens.

| MÉTODO | DESCRIÇÃO | VANTAGENS | DESVANTAGENS |
|----------------------------|---|--|---|
| Baciloscopia | Contagem de bacilos por campo microscópico | -Fácil coleta (não invasivo); -Baixo custo; -Rápido. | -Necessário ao menos 5000 bacilos/ml; -Possibilidade de falso negativo. |
| Cultura | Cultivo de bacilos viáveis | -10 a 100 bacilos / ml; -Testa sensibilidade a antibióticos. | -Moroso (40 dias para obter resultado). |
| Radiológico | Exame de imagem | -Não invasivo | -Apenas para tuberculose pulmonar; -Método auxiliar de diagnóstico. |
| Prova tuberculínica | Inoculação com PPD, Hipersensibilidade do tipo tardia | -Baixo custo; -Fácil realização. | -Possibilidade de falso negativo em pacientes TB-HIV; Possibilidade de reação cruzada com BCG -Importado |
| Testes moleculares | <i>Xpert</i> MTB/RIF | -Detecção do gene MTB e resistência a rifampicina -Resultado em duas horas. | -Alto custo; -Necessita de estrutura elétrica estável; -Necessidade de equipamento específico. |
| Sorológico | Presença de molécula em amostras biológicas | -Baixo custo; -Facilidade na automação; -Permite aplicação em grande número de amostras. | -Possibilidade de reação cruzada com BCG. |

Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE (2019); TEIXEIRA, ABRAMO, MUNK (2006); BOMBARDA, et.al. (2001); ABBAS; LICHTMAN; PILLAI. (2012); LIMA, et.al. (2017); SILVA (2014).

2.5.1 Baciloscopia

O método de baciloscopia, ou exame direto, é um exame semiquantitativo, no qual se realiza a contagem de bacilos por campo microscópico (KRITSKI, CONDE, SOUZA, 2000). O exame detecta a presença do bacilo pela coloração com base na característica álcool-ácido resistente do micro-organismo. Pode ser coloração de carbolfucsina (coloração de Ziehl-Neelsen, Kinyoun e Ziehl-Gabbet) ou coloração de fluorocromos (auramina) (KONEMANN, 2001). No Brasil, normalmente utiliza-se a coloração de Ziehl-Neelsen. Nela, os bacilos apresentam-se como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, isolados, aos pares ou em grupos, corados em vermelho (pela ação da fucsina básica) sobre um fundo azul (BARRETO, et al. 2006).

Para apresentar resultado positivo é necessária a presença de bacilo no campo microscópico. Para isso, o material biológico deve possuir pelo menos 5.000 bacilos por mililitro, e o profissional deve ser bem treinado para avaliação da lamina (COELHO, et al. 2008). A sensibilidade da técnica varia entre 33 a 80% para casos de tuberculose pulmonar (PADMAPRIYADARSINI; NARENDRAN; SWAMINATHAN, 2011).

2.5.2 Cultura

A cultura é o método de cultivo da micobactéria para verificação da presença de bacilos viáveis. Pode ser realizada em meio Lowenstein-Jensen (LJ), a base de ovo, com glicerol como fonte de carbono e asparagina como fonte de nitrogênio, ou meio Middlebrook, sólido ou líquido, à base de ágar (BARRETO, 2006). Esse método requer menor número de bacilos no material examinado para ser positivo (10 a 100 bacilos viáveis por mL), se comparado com a baciloscopia. Permite identificar a espécie da micobactéria e testa a sensibilidade aos quimioterápicos. Todavia, a principal desvantagem da técnica é a obtenção do resultado, que leva até 40 dias. Em contrapartida, a

sensibilidade do teste está entre 80 e 85%, com especificidade de 98% (TEIXEIRA, ABRAMO, MUNK, 2006).

2.5.3 Exame radiológico

O exame radiológico é considerado um método diagnóstico auxiliar. É o método de escolha para a avaliação inicial do paciente, utilizado para diagnóstico de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar (LACHI, NAKAYAMA. 2015). Esses pacientes apresentam alterações características na radiografia, como um infiltrado no lobo médio ou inferior do pulmão. As alterações encontradas em pacientes com tuberculose são cavidades de paredes espessas, nódulos centrolobulares, consolidações, espessamento de paredes brônquicas, espessamento bronquiolar, bronquiectasias e massas (BOMBARDA, et al. 2001).

2.5.4 Prova tuberculínica

A prova tuberculínica (PPD - Purified Protein Derivative), teste de Mantoux ou de hipersensibilidade do tipo tardia é considerado um método diagnóstico auxiliar. Consiste na aplicação de um derivado de proteína purificada no antebraço do paciente (0,1 mL), a fim de avaliar a sua reação imune celular (BRANCO, ROCHA. 2012). O derivado de proteína purificada é constituído de componentes solúveis fracionados do cultivo de *M. tuberculosis*, produzidos por crescimento em meio líquido. Após ser injetada no paciente, a resposta esperada é a hipersensibilidade do tipo tardia. Quando ocorre, produz uma área de endureção e tumefação ao redor da aplicação, que é dimensionada com o auxílio de régua milimetrada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI. 2012).

O teste tem sensibilidade diminuída em pacientes imunocomprometidos, pessoas recentemente infectadas e crianças muito jovens. A especificidade é

baixa, pois o PPD contém diversos antígenos amplamente compartilhados entre diferentes espécies de micobactérias, como as micobactérias do ambiente, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. bovis* (BCG). Outra dificuldade é a produção limitada a poucos fabricantes, causando dependência de importação e dificultando o acesso (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK. 2006).

2.5.5 Teste molecular *Xpert*® MTB/RIF

O teste molecular *Xpert*® MTB/RIF é baseado na reação em cadeia da polimerase. Detecta o DNA de *M. tuberculosis* e a resistência à rifampicina, através das mutações do gene. O resultado do teste é obtido em duas horas, e possui alta sensibilidade e especificidade (CASELLA, et al. 2018).

O *Xpert*® MTB/RIF é utilizado para diagnóstico no Brasil em áreas com maior incidência da tuberculose desde 2013. No entanto, encontram-se dificuldades devido a estrutura dos laboratórios de saúde pública, pessoal capacitado para essa nova metodologia diagnóstica, além do alto custo (LOPES, et al. 2020).

2.5.6 Teste sorológico

Testes sorológicos baseiam-se no estudo dos anticorpos e suas reações com antígenos. Para tuberculose, estão disponíveis no mercado dois testes sorológicos. O QuantiFERON-TB, aprovado pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA, Administração de Alimentos e Medicamentos), em 2001, e QuantiFERON-TB-Gold, aprovado em dezembro de 2004 (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2006).

No QuantiFERON-TB, uma amostra do sangue periférico é cultivada em placas previamente preparadas e o sobrenadante é analisado por teste imunoenzimático (ELISA). No entanto, utiliza o PPD como antígeno principal, e apresenta os mesmos problemas de especificidade que o teste cutâneo com o PPD. Este teste foi substituído pelo QuantiFERON-TB-Gold, que emprega

proteínas recombinantes (ESAT-6 e CFP-10) no lugar de PPD. Esse novo ensaio imunológico foi aprovado pelo FDA em dezembro de 2004 (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2006).

2.5.6.1 Teste Imunoenzimático (ELISA)

O teste imunoenzimático (ELISA) é um teste sorológico amplamente utilizado no diagnóstico em várias doenças. Esta técnica se baseia na ligação de um antígeno contra o anticorpo específico, para detecção e quantificação de substâncias pela geração de coloração mensurável (SILVA, 2014). A técnica de ELISA é de fácil visualização, em que os resultados positivos e negativos são facilmente diferenciados (TORTORA;CASE; FUNKE, 2017). É um teste quantitativo, com leitura baseada na intensidade de luz absorvida por espectrofotometria (EMBRAPA, 2015).

Existem variações na técnica, e os principais métodos de ELISA são o direto, indireto e sanduíche. Os métodos se diferenciam com base no material adsorvido ao suporte sólido (antígeno ou anticorpo) e ao material testado (EMBRAPA, 2015). Os métodos estão descritos na tabela 2.

Tabela 2- Métodos de ensaio Imunoenzimático - Características

| MÉTODO | CARACTERÍSTICAS |
|------------------------|---|
| ELISA DIRETO | <ul style="list-style-type: none">• Método de marcação do anticorpo;• Placas revestidas com antígeno-alvo;• A ligação é identificada por colorimetria, quimioluminescência ou fluorescência de ponto final.• Não há etapa de anticorpos secundários. |
| ELISA INDIRETO | <ul style="list-style-type: none">• Anticorpo secundário marcado para detecção;<ul style="list-style-type: none">• Placas revestidas com antígeno;• Utiliza-se conjugado enzima-anticorpo de alta atividade específica. |
| ELISA SANDUÍCHE | <ul style="list-style-type: none">• O mesmo componente da reação, anticorpo, é utilizado como agente insolúvel e reagente marcado com enzima;o antígeno da amostra forma ponte entre os dois reagentes. |

Fonte: Adaptado de SOARES et al. (2012).

No presente trabalho, o teste ELISA indireto foi o método empregado para o teste diagnóstico. Esta variação da técnica é utilizada quando uma amostra deve ser analisada para um antígeno específico. O resultado é avaliado de acordo com a concentração de anticorpo presente no soro, que se relaciona diretamente com a intensidade da cor obtida (GAN, PATEL. 2013).

2.6 PHAGE DISPLAY

A tecnologia do *Phage display* foi introduzida pela primeira vez por George Smith em 1985 (KUMAR et al. 2019), e permite a identificação e isolamento de peptídeos com alta afinidade e especificidade para o alvo de interesse (MIMMI et al. 2019). Os peptídeos obtidos podem ser aplicados como antígenos, para uso em diagnóstico ou como reagentes preventivos (imunoterápicos ou imunoproteção). A seleção dos fagos que expressam mimotopos específicos para uma doença é realizada através da incubação com amostras de soro de pacientes infectados com (MOURA; ALVARENGA; THOMAZ-SOCCOL, 2017).

O princípio da técnica envolve a expressão de sequências de aminoácidos no capsídeo de um bacteriófago, selecionados através da ligação com anticorpos. A partir disso, sequências de aminoácidos podem ser selecionadas para ser aplicadas como peptídeos antigênicos. As sequências selecionadas compõem bibliotecas de fagos. A preparação dessas bibliotecas é a primeira etapa do procedimento de biosseleção (*biopanning*). Para a realização do *biopanning*, incuba-se uma biblioteca de peptídeos exibidos em fagos em uma placa, onde, após a lavagem, apenas os fagos ligados especificamente permanecem. Esses fagos são eluídos e amplificados (MIMMI et al. 2019), pela infecção de células hospedeiras (normalmente *Escherichia coli*) com esses fagos. Após a amplificação, esses fagos são submetidos a novos ciclos de seleção. São necessários três a cinco ciclos para selecionar os clones de fagos específicos (MOURA; ALVARENGA; THOMAZ-SOCCOL, 2017).

2.7 TRATAMENTO

Geralmente, o tratamento para tuberculose envolve um coquetel de drogas, com uma fase inicial intensiva de 2 meses seguida por uma fase de continuação de 4 a 6 meses (FOGEL, 2015). Alguns fatores influenciam o tratamento, como idade, comorbidades e estado imunológico do paciente, virulência do bacilo, susceptibilidade da cepa e aderência ao tratamento (RABAHI et al. 2017). No Brasil, o fornecimento dos medicamentos antituberculose é gratuito, através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT). Os principais medicamentos utilizados para o tratamento são isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) ou estreptomicina (SM) (RABAHI et al. 2017). O tratamento correto da tuberculose está incluído na Estratégia do Fim da Tuberculose, promovida pela OMS. Deve-se priorizar o uso racional dos medicamentos, pois quando utilizadas concentrações subterapêuticas dos medicamentos, pode causar o fracasso do tratamento, recidiva, resistência adquirida e até a morte (SILVA; MIGLIORI; MELLO. 2019).

O principal tipo de resistência é aos fármacos rifampicina e isoniazida, o que caracteriza um tipo de tuberculose chamado multidrogarresistente. Com isso se faz necessária a utilização de medicamentos menos eficazes e mais tóxicos, ocasionando maior ocorrência de efeitos adversos. Conseqüentemente, o tratamento se torna mais longo e com maior custo (BALLESTERO et al. 2019).

2.8 PREVENÇÃO

A meta da OMS é atingir 30 milhões de pessoas com tratamento preventivo de TB no período de 2018–2022. No entanto, a única vacina licenciada para prevenção é a produzida com a cepa de *M. bovis* bacilo *Calmette–Guérin* (BCG) (WHO, 2019).

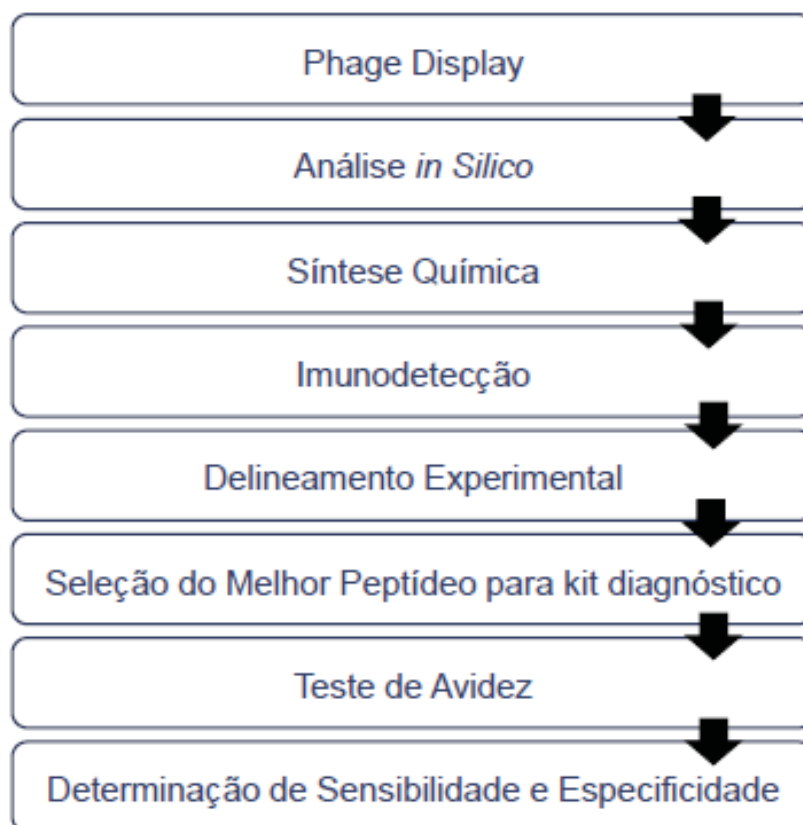
A vacina foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin no início de 1900. Foi produzida utilizando cepa atenuada de *M. bovis*. Atualmente, a recomendação da OMS é que seja administrada uma dose de BCG nos bebês logo após o nascimento nos países onde a incidência de tuberculose é alta. Países com baixa incidência restringem a vacina apenas para bebês de alto risco (FRITSCHI, CURTIS, RITZ, 2020).

A vacina só é eficiente nos casos graves até cerca de 14 anos, e após isso, a eficiência é variável. Isso pode estar relacionado à exposição a micobactérias do meio ambiente, a variações genéticas na população alvo ou nas cepas vacinais e a existência de co-infecções (TEIXEIRA, ABRAMO, MUNK. 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de seleção do antígeno e o desenvolvimento do teste diagnóstico foram realizados em oito etapas, conforme Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma: Etapas do estudo.



Fonte: A autora (2021)

3.1 PHAGE DISPLAY

Os peptídeos utilizados para a produção do teste diagnóstico foram identificados por *phage display*. Para isso, os anticorpos anti- *M. tuberculosis* foram obtidos de 30 pacientes tuberculosos com diagnóstico confirmados pelos serviços especializados. As coletas foram realizadas na cidade de Curitiba e

Lapa, estado do Paraná, no Centro Regional de Especialidades - Barão e no Hospital Regional da Lapa São Sebastião, respectivamente. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Universidade Federal do Paraná (registro CEP/SD:428.108.07.10) e pelo Comitê em Pesquisa Com Seres Humanos da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (processo no. 002/2008).

Quatro bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos (X15, X8CX8, XCX4CX e XCX8CX) foram utilizadas para identificação de mimotopos de antígenos micobacterianos. As bibliotecas foram obtidas de J. Scott, Simon Fraser University, Burnaby BC, Canada (BONNYCASTLE et al. 1996).

A biosseleção foi realizada conforme descrito por Villard et al. 2003. Resumidamente, um imunotubo (Nunc) foi sensibilizado com 5 µg/1,5mL de imunoglobulina anti-*M. tuberculosis* em 100 mM NaHCO₃, pH 8,6 e incubado *overnight* a 4°C. O imunotubo foi lavado com TBST-0,05% (TBS Tween20-0,05%), preenchido com uma solução de bloqueio (TBST-0,05%, BSA a 3%) e incubado durante duas horas a 37 °C. Após a lavagem, o imunotubo foi incubado com fagos de cada uma das bibliotecas, em título correspondente a 100 vezes a complexidade da biblioteca em TSBT-0,05%. Após lavagens com TBST a 0,5% e seguido de lavagens com TBST-0,05%, os fagos ligados foram eluídos com 1,5 mL de 0,1 M de glicina pH 2,2 e 1 mg/mL de BSA. Após a neutralização com 2 M de tris HCl (pH 9) os fagos eluídos foram amplificados por infecção em cultura de *E.coli* K91. Foi realizada nova incubação *overnight* a 37 °C, o sobrenadante foi obtido e precipitado com Poli(etileno glicol) (PEG) /NaCl. Quatro ciclos de seleção foram realizados e nos demais ciclos 2,0 x 10¹¹ fagos amplificados do ciclo anterior foram incubados com IgG anti-*M. tuberculosis*. Os procedimentos foram iguais àqueles aplicados ao primeiro ciclo, exceto para a massa do anticorpo imobilizado no imunotubo que foi 1,5 e 0,5 µg no segundo e subsequentes ciclos, respectivamente.

Após o quarto ciclo de seleção, clones de fagos foram isolados e avaliados quanto à capacidade de ligação a imunoglobulinas IgG anti-*M. tuberculosis*. Para tanto, placas de ELISA foram revestidas com 50 µL de anticorpo anti-bacteriófago (Sigma-Aldrich, EUA) a 1:800 em tampão NaHCO₃ 100 mM, pH 8,6 e mantidas *overnight* a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com

PBS% Tween-20-0,05 (PBST-0,05%) e em seguida bloqueadas com leite em pó desnatado a 2% em PBST-0,05% por uma hora em temperatura de 37 °C. O sobrenadante (50 mL) da cultura de cada um dos clones isolados foi adicionado a um diferente poço da placa e incubado por 2 horas a 37°C. Após a lavagem, as placas foram incubadas com 100 µg/mL de imunoglobulinas IgG total de pacientes tuberculosos em solução de bloqueio por uma hora a 37 °C. Nova lavagem foi realizada e adicionou-se anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:10000 em solução de bloqueio e incubado por uma hora a 37 °C. Após novas lavagens, a reação foi revelada pela adição da solução substrato (0,2 mg/mL de OPD) (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão citrato pH 5,0 contendo 0,2 µL/mL de H₂O₂ a 30%. As placas foram incubadas a temperatura ambiente e no escuro por 15 minutos e a reação foi interrompida por adição de 10 µL de H₂SO₄ 1:20. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm. Os clones mais reativos foram selecionados para o sequenciamento do DNA.

O DNA de cada clone de fago reagente foi extraído usando o *kit* QIAprep Spin M13 (Qiagen, Alemanha). A metodologia foi realizada conforme descrição do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas com o *kit* BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA) e em sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, EUA). O *primer* 5'-TCG GCA AGC TCT TTT AGG-3' foi usado para anelamento. As condições de sequenciamento foram um minuto a 96 °C para desnaturação inicial do DNA seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 segundos, anelamento a 50 °C por cinco segundos e extensão por quatro minutos a 60 °C. Após homogeneização e incubação com isopropanol por 20 minutos à temperatura ambiente os tubos foram centrifugados a 15.000 g por 25 minutos., O isopropanol foi removido por inversão e adicionou-se álcool 70%. Nova centrifugação a 15.000 g por 10 minutos e remoção do etanol por inversão. A secagem do DNA foi feita em estufa a 37 °C e o armazenamento até seu uso foi a -20 °C. A análise da sequência obtida foi realizada no *software* do equipamento. Após a identificação do DNA viral, as sequências foram avaliadas no programa *proteomics tools* disponível em <http://expansy.ch>. Foi utilizada opção de leitura *tools-DNA-Proteins-Translate*, 3'→5', utilizando-se a

primeira janela de leitura-frame), para obtenção da sequência dos aminoácidos codificada pelo segmento de DNA inserido no fago. As sequências dos peptídeos obtidas foram analisadas quanto à similaridade com outras sequências já registradas no *GenBank*.

Após obtenção do peptídeo, o mesmo foi avaliado quanto à capacidade de reação com anticorpos de soro de pacientes portadores de tuberculose, utilizando o teste ELISA previamente padronizado.

A avaliação quanto à similaridade com peptídeos já explorados e com proteínas presentes na vacina BCG foram realizados para evitar falsos-positivos. A avaliação foi realizada por ferramentas de bioinformática.

3.2 ANÁLISE *IN SILICO*

As sequências dos peptídeos propostos foram avaliadas utilizando a ferramenta *Blast-p* (ALTSCHUL et al. 1998), para verificar a identidade e cobertura com os organismos: *M. tuberculosis*, *M. bovis BCG*, *M. terrae*, *M. avium*, *M. smegmatis* e *M. leprae*. Verificou-se ainda, se possuem cobertura e identidade com humanos (*Homo sapiens*, taxid:9606). As propriedades físico-químicas dos peptídeos foram avaliadas utilizando o *software* PepCalc (PepCalc.com, 2015). Utilizando os programas *VaxiJen* v2.0 (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2008) e *Immune Epitope Database* (IEDB) (CALIS et al. 2013), foi determinada a antigenicidade dos epítomos. O programa *VaxiJen* faz a análise baseado em valor de corte de 0.5, sendo considerados antigênicos os epítomos que alcançassem este valor, segundo a predição.

3.3 SÍNTESE QUÍMICA EM MEMBRANA DE CELULOSE E IMUNODETECÇÃO

Os peptídeos obtidos por *phage display* e selecionados por bioinformática foram sintetizados utilizando a metodologia de *spot síntese*

numa membrana de celulose com a proteção 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) em um sintetizador automático (Intavis Bioanalytical Instruments, Alemanha) (FRANK et al. 1991), para a realização da técnica de imunodeteção.

Para o ensaio de imunodeteção em membrana de celulose com os peptídeos sintetizados, a membrana foi incubada primeiramente com metanol durante dois minutos, e depois lavado com a solução tampão TBS-T (NaCl, KCl, Tris(hidroximetil)aminometano e Tween 20 – 0,05%, a pH 7,0) com uma incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir o bloqueio foi efetuado com a solução tampão de bloqueio (caseína hidrofílica 3% m/v, sacarose 0,5% m/v, Tween 20 0,1% v/v e TBS) mantida a 4 °C sob agitação *overnight*. Em seguida, a membrana foi lavada com o tampão de lavagem (TBS-T 0,1%) durante 10 minutos sob agitação. A membrana foi então submetida à incubação com solução diluída do soro humano (37 °C por 90 minutos) provenientes de pacientes comprovadamente positivos para tuberculose por teste de baciloscopia diluídos na proporção 1:400 em tampão de bloqueio.

A membrana foi novamente lavada com a solução tampão TBS-T e incubada com anticorpo secundário anti-IgG-biotina (1:7.500) diluído em tampão de bloqueio durante 60 minutos a 37°C, seguido de uma etapa de incubação com *Streptavidin* (1:7.500) diluído em tampão de bloqueio durante 60 minutos a 37°C. Após três lavagens com o tampão de lavagem, foram visualizadas spots positivas pelo sistema ECL™ Start Western Blotting Detection Reagent (Healthcare Amersham™, Alemanha) em um filme Hyperfilm™ ECL™ (Healthcare Amersham™, Alemanha).

3.4. SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS SELECIONADOS

Os peptídeos selecionados por ensaio de imunodeteção e analisados por ferramentas bioinformáticas foram quimicamente sintetizados, de acordo com o protocolo padrão pela estratégia Fmoc, usando uma resina como suporte sólido insolúvel (MERRIFIED, 1963). Também foi usado um

sintetizador automático de peptídeos MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments, Alemanha), conforme Alban (2014).

3.5 PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA

3.5.1 Delineamento experimental

Para a padronização das condições do teste ELISA foi realizado um desenho experimental fatorial completo em V, incluindo também pontos centrais para a modelação da curvatura (Tabela 4). Foram selecionados cinco fatores para o desenho experimental: concentração de antígeno (peptídeos), porcentagem de soro albumina bovina (BSA) no tampão de bloqueio, diluição do soro, diluição do conjugado (anticorpo secundário anti-IgG-biotina) e diluição da neutravidina-HRP (NeutrAvidin Protein, HRP, Thermo Scientific™). A variável de resposta é definida como a razão entre o valor da absorbância da amostra positiva e o valor da absorbância da amostra negativa (Eq.1).

$$\text{variável resposta} = \frac{\text{Valor absorbância soro positivo}}{\text{Valor absorbância soro negativo}} \dots\dots\dots \text{Eq. 1}$$

Tabela 4– Variáveis testadas por delineamento experimental (variáveis independentes) para padronização de teste ELISA

| Nível | Soro Diluição | Antígeno (ng/ poço) | Bloqueio (%) | Streptavidina diluição | Neutravidina diluição |
|--------------|----------------------|----------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------------|
| -1 | 1:100 | 30 | 2 | 1:10000 | 1:6000 |
| 0 | 1:200 | 75 | 3 | 1:12000 | 1:8000 |
| +1 | 1:300 | 120 | 4 | 1:14000 | 1:10000 |

Fonte: A autora (2021)

Para a correta modelação da curvatura, se fez necessária a inclusão de novos pontos com base no desenho composto central 3^k, e na equação de regressão em unidades não codificadas, calculada pela média dos blocos.

O resultado foi analisado utilizando o Minitab© Statistical Software V. 18.1 (2017 Minitab, Inc.).

3.5.2 REALIZAÇÃO DO TESTE ELISA

A técnica de ELISA foi realizada em placas de poliestireno (Costar 3690, Corning) de 96 poços.

O antígeno em teste foi diluído em tampão de cobertura (*coating buffer*) (solução tampão carbonato, Na₂CO₃ 0,16%, NaHCO₃ 0,29%, pH 9,6) nas condições definidas pela padronização. A placa foi sensibilizada com 100 µL dessa solução por poço e incubada *overnight* a 4 °C. Após esta etapa, para remoção do antígeno não fixado no poço, a solução foi descartada e os poços lavados quatro vezes, com solução de lavagem (NaCl 0,9% - Tween 20 0,05%).

O bloqueio dos poços foi realizado, adicionando-se 120 µL de solução de bloqueio (BSA em PBS pH 7,4) por poço e incubado por uma hora a 37°C. Após incubação, mais quatro lavagens foram realizadas.

Os soros, foram diluídos em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4 - Tween 20 0,05%), então foram adicionados (100 µL) a cada poço e incubados em estufa a 37 °C por uma hora. Foram então realizadas novas etapas de lavagem, por seis vezes, para a remoção dos anticorpos não ligados.

Em seguida foram adicionados 100 µL por poço do anticorpo secundário (conjugado Anti-IgG humano-biotina) diluído em tampão de incubação e as placas foram incubadas por uma hora a 37 °C. As placas foram lavadas quatro vezes e o conjugado neutravidina-peroxidase foi adicionado. Submeteu-se à nova incubação por uma hora a 37 °C.

Após quatro lavagens, adicionou-se o substrato 3, 3',5',5'- tetrametil benzidina (TMB) (Invitrogen™, USA). Após 30 minutos ao abrigo de luz, foi efetuada a parada da reação adicionando-se 25 µL de solução de ácido sulfúrico 5%. A leitura da absorbância foi então realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

3.6 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E NÍVEL DE CORTE DA REAÇÃO

Após a seleção do melhor peptídeo candidato a antígeno e obtenção das melhores condições para o teste, foi realizada a determinação do nível de corte (*cut-off*) do teste, entre soros positivos e negativos. A amostragem consistiu de 50 soros humanos de pacientes portadores de tuberculose ativa e 50 pessoas saudáveis, representando o grupo de controle negativo. Estes dois grupos serviram para a validação do teste e determinação da sensibilidade e especificidade da reação.

A sensibilidade e especificidade da reação entre soros positivos e soros negativos foram determinadas pelo *software MedCalc* (Windows, versão 15.0), com os resultados dos testes de ELISA realizados utilizando o peptídeo produzido como antígeno.

3.7 TESTE DE AVIDEZ

Para realização do teste de avides, o antígeno da reação foi diluído em tampão de cobertura (*coating buffer*) (solução tampão carbonato, Na₂CO₃ 0,16%, NaHCO₃ 0,29%, pH 9,6) na condição de 30 ng/poço. A placa foi sensibilizada com 100 µL dessa solução por poço e incubada *overnight* a 4 °C. Após esta etapa, para remoção do antígeno não fixado no poço, a solução foi descartada e os poços lavados quatro vezes com solução de lavagem (NaCl 0,9% - Tween 20 0,05%).

O bloqueio realizado pela adição de 120 µL de solução de bloqueio (BSA 2,3% em PBS pH 7,4) por poço e incubando-se por uma hora a 37 °C. Após incubação, mais quatro lavagens foram realizadas.

Os soros, positivos e negativos, foram diluídos na proporção 1:100 em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4 - Tween 20 0,05%). Em seguida foram adicionados 100 µL a cada poço e incubou-se em estufa a 37 °C por uma hora. Foram então realizadas novas etapas de lavagem, por seis vezes.

Na próxima etapa, foram adicionados 100 µL por poço de solução de ureia (6 M), incubando-se a 37°C por quinze minutos. Após lavagem, foram adicionados 100 µL por poço do anticorpo secundário (conjugado Anti-IgG humano-biotina) diluído em tampão de incubação e as placas foram incubadas por uma hora a 37 °C. Novas lavagens (quatro) foram realizadas para adição do conjugado neutravidina-peroxidase, diluído em tampão de incubação. Submeteu-se a nova incubação por uma hora a 37 °C.

Após quatro lavagens, adicionou-se o substrato TMB. Após 30 minutos ao abrigo de luz, foi efetuada a parada da reação adicionando-se 25 µL de solução de ácido sulfúrico 5%. A leitura da absorbância foi então realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

3.8 ESTATÍSTICA

O resultado obtido no delineamento experimental foi analisado utilizando o Minitab© Statistical Software V. 18.1 (2017 Minitab, Inc.). O resultado de sensibilidade e especificidade do teste foi analisado utilizando o *software MedCalc* (Windows, versão 15.0), através da curva ROC.

Para análise do resultado do teste de avidéz foram utilizados métodos numéricos para determinação de média e desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Após realizar cinco ciclos de seleção frente às IgG totais de pacientes tuberculosos, a seleção dos fagos reagentes por teste ELISA frente ao antígeno de *M. tuberculosis* (dados não mostrados); vinte e três clones reagentes foram reconhecidos por ligação a anticorpos. Estes clones foram sequenciados e quatro sequências diferentes foram obtidas (Tabela 5).

Tabela 5 – Sequência de aminoácidos dos peptídeos obtidos por *phage display*, testados para uso como antígeno em teste diagnóstico.

| <i>Antígeno</i> | <i>Sequência</i> |
|------------------------|-------------------------|
| P.Mt.PD 4 | 15 aminoácidos |
| P.Mt.PD 6 | 15 aminoácidos |
| P.Mt.PD 7 | 13 aminoácidos |
| P.Mt.PD 8 | 15 aminoácidos |

*Sequências em processo de proteção patentária.
Fonte: A Autora (2021).

As referidas sequências foram analisadas *in silico* quanto a imunogenicidade, identidade e similaridade com sequências patenteadas e com sequências de outros micro-organismos do complexo *Mycobacterium* (*M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. terrae*, *M. smegmatis*) (Tabela 6), utilizando o programa *Blast-p*. Além disso, foram também avaliados em comparação com *Homo sapiens*, que não apresentou similaridade e cobertura significativas. O peso molecular dos peptídeos obtido pelo *software* Pepcalc estão descritos também na tabela 6.

A cobertura e identidade das sequências, quando comparadas com micro-organismos do grupo MTBC, apresentaram resultados entre 42 a 80% para cobertura, e 71 a 100% para identidade. As sequências foram preditas

para avaliar sua antigenicidade utilizando os programas VaxiJen e IEDB. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 6 – Cobertura e identidade das seqüências obtidas pelo *Phage display* com seqüências do grupo MTBC

| Peptídeo | Seqüência (Número de Aminoácidos) | Massa (g/mol) | Cobertura (%) | Identidade (%) | Proteínas homólogas |
|-------------|-----------------------------------|---------------|---------------|----------------|--|
| P.Mt.PD. 4 | 15 aminoácidos | 1832,11 | 58 | 85,71 | Proteína do capsídeo principal da família L1 (<i>M.tuberculosis</i>) |
| | | | 58 | 85,71 | Proteína hipotética <i>M.avium</i> |
| P.Mt.PD. 6 | 13 aminoácidos | 1325,48 | 70 | 71,43 | Piruvato, fosfato diquinase (<i>M.avium</i>) |
| | | | 70 | 87,71 | Proteína hipotética DIJ64_09630 (<i>M.leprae</i>). |
| | | | 50 | 100 | NADH desidrogenase, subunidade G (<i>M.tuberculosis</i>) |
| P.Mt. PD. 7 | 15 aminoácidos | 1547.7 | 80 | 75 | regulador de transcrição da família araC (<i>M.tuberculosis</i>) |
| | | | 50 | 100 | ligante de zinco desidrogenase (<i>M.avium</i>) |
| P.Mt. PD 8 | 15 aminoácidos | 1976.2 g/mol | 42 | 100 | Regulador transcricional da família TetR (<i>M. avium</i>) |
| | | | 42 | 100 | Proteína hipotética CAB90_03877 (<i>M.tuberculosis</i>) |

Fonte: A Autora (2021).

Tabela 7 - Antigenicidade dos peptídeos obtidos por *Phage display*, para uso em diagnóstico de Tuberculose, obtidas pelos softwares Vaxijen e IEDB.

| Sequência | Antigenicidade | |
|--------------------------|----------------|-------|
| | VaxiJen | IEDB |
| <i>P.Mt. PD 4</i> | 0,5338 | 1,046 |
| <i>P.Mt. PD 6</i> | 0,5730 | 1,044 |
| <i>P.Mt. PD 7</i> | 0,9341 | 1,062 |
| <i>P.Mt.PD 8</i> | 0,7588 | 1,053 |

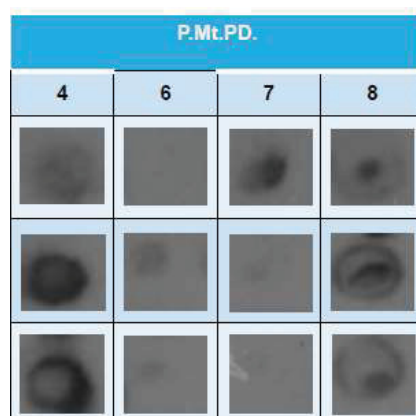
Fonte: a Autora (2021)

O programa VaxiJen considera que peptídeos com resultado acima de 0,5 possuem potencial antigênico. Quando se utiliza o IEDB, quanto maior o resultado obtido, maior o potencial antigênico do peptídeo.

4.2 IMUNODETECÇÃO

A avaliação da afinidade aos anticorpos contidos no soro foi identificada após revelação da membrana, pela sua localização em filme fotográfico (Figura 4).

Figura 4 – Imunodeteccção dos peptídeos seleccionados por *phage display* frente a soros de pacientes com tuberculose ativa – Revelação em filme fotográfico



Fonte: A Autora (2021)

Os peptídeos estudados apresentaram reação com o *pool* de soros positivos (Figura 4). Quando a análise em questão foi realizada utilizando soros

negativos, os peptídeos não apresentaram reatividade (dados não mostrados). Isso é uma indicação de que os peptídeos são bons candidatos para serem testados para uso no diagnóstico da tuberculose.

4.3 PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA

4.3.1 Delineamento experimental para padronização do teste ELISA

Para a realização do delineamento experimental dos peptídeos, um total de 51 combinações foram avaliadas. Foram estudadas cinco variáveis, sendo elas: diluição de soro, concentração de antígeno, concentração de BSA no tampão de bloqueio, diluição do conjugado anti-humano IgG conjugado a biotina e diluição da Neutravidin®. A figura 5 mostra o diagrama de pareto e como as variáveis avaliadas individualmente e a sua combinação influência na variável de resposta, para cada um dos peptídeos avaliados.

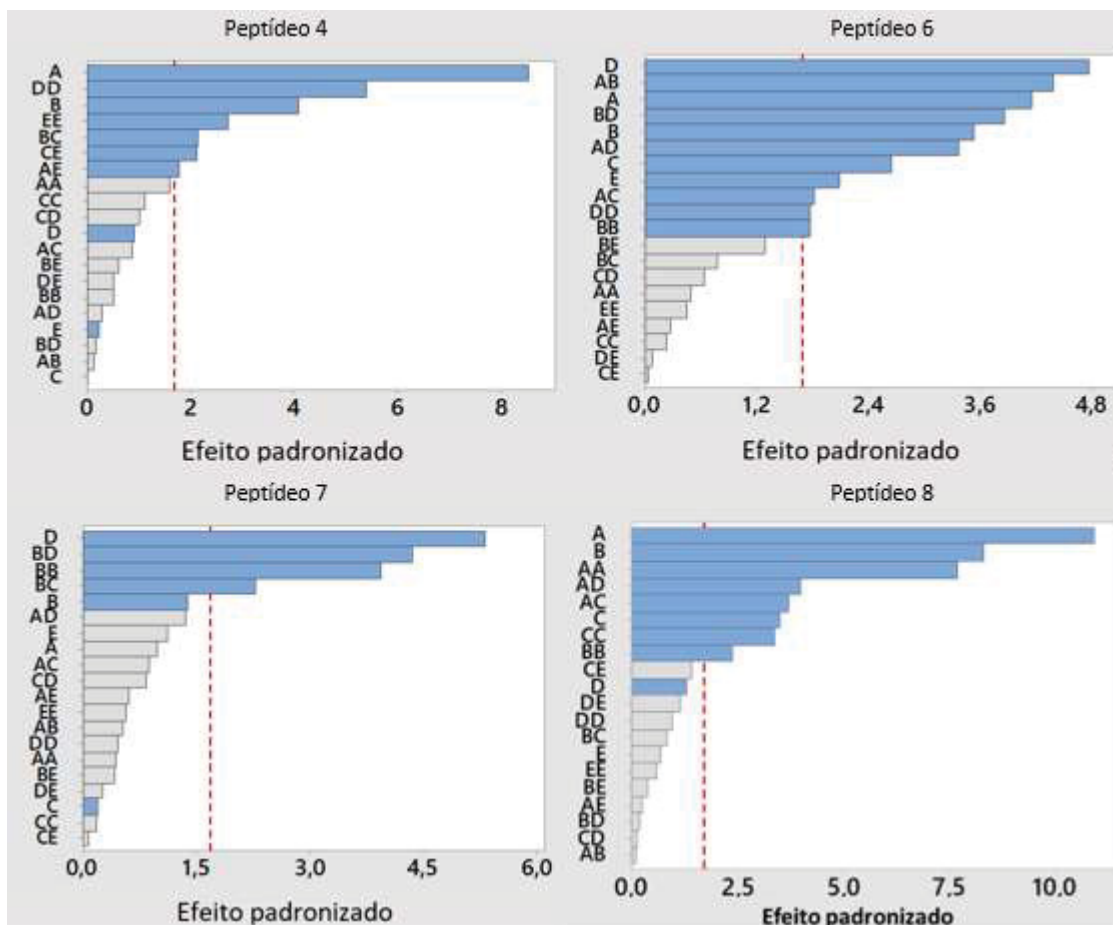
A partir dos resultados do delineamento experimental é possível criar uma equação de modelação de resposta e deduzir quais seriam as condições ideais para maximizar a resposta.

Para os peptídeos P.Mt.PD.4, P.Mt.PD. 6, P.Mt.PD.7 e P.Mt.PD.8, a equações de modelação da resposta (tabela 8) foi capaz de explicar 86,05; 79,06; 67,39 e 97,28% do comportamento da variável de resposta, respectivamente. Com base nesta equação podemos obter as condições ideais para o teste ELISA usando cada um dos peptídeos. as condições ideais são mostradas na tabela 11, e obtemos um valor preditivo da relação entre positivo e negativo 2,58; 3,03; 2,23 e 4,45 respectivamente.

Os resultados obtidos na padronização dos peptídeos, utilizando as melhores condições encontradas estão expressos na figura 6. A diferença entre as absorbâncias dos soros positivos e negativos foi visível para todos os peptídeos. No entanto, a relação entre soros de pacientes infectados com o micro-organismo e soros de indivíduos sadios foi melhor para o peptídeo

P.Mt.TB 8, sendo que os soros positivos apresentaram uma diferença de 4,3 vezes superior aos indivíduos sadios.

Figura 5 – Diagrama de pareto das padronizações dos peptídeos P.Mt.PD.4, P.Mt.PD. 6, P.Mt.PD.7 e P.Mt.PD.8, que avalia as condições ótimas paraa o teste. Onde: A: soro, B: antígeno, C: tampão de bloqueio com BSA, D: Conjugado anti-human IgG conjugado a biotina, E: Neutravidin®



A autora (2021)

Tabela 8 - Equações de modelação da resposta a partir do planejamento experimental. Onde: S – Soro, A – Antígeno, B – Bloqueio, Bi – Biotina, N – Neutravidina

| | |
|--|-------|
| $\begin{aligned} \text{Resposta} = & 28,52 - 0,01503*S + 0,0019*A + 0,267*B - 0,003521*Bi - \\ & 0,001219*N + 0,000023*S*S + 0,000015*A*A - 0,1019*B*B + 0,000000*Bi*Bi \\ & + 0,000000*N*N - 0,000001*S*A - 0,000332*S*B + 0,000000*S*Bi \\ & + 0,000000*S*N - 0,001860*A*B + 0,000000*A*Bi - 0,000000*A*N \\ & + 0,000019*B*Bi + 0,000041*B*N - 0,000000*Bi*N \end{aligned}$ | Eq. 2 |
| $\begin{aligned} \text{Resposta} = & 10,32 + 0,00415*S - 0,0030*A + 0,237*B - 0,00128*Bi - \\ & 0,000244*N + 0,000009*S*S + 0,000117*A*A - 0,041*B*B + 0,000000*Bi*Bi \\ & + 0,000000*N*N + 0,000054*S*A - 0,000850*S*B - 0,000001*S*Bi - 0,000000*S*N \\ & + 0,00106*A*B - 0,000002*A*Bi - 0,000001*A*N + 0,000021*B*Bi - 0,000004*B*N - \\ & 0,000000*Bi*N \end{aligned}$ | Eq. 3 |
| $\begin{aligned} \text{Resposta} = & -2,32 - 0,00833*S - 0,0072*A + 0,340*B + 0,000534*Bi \\ & + 0,000438*N + 0,000019*S^2 + 0,000141*A^2 - 0,0155*B^2 - 0,000000*Bi^2 - \end{aligned}$ | Eq. 4 |

$$0,000000*N^2 - 0,000004*S*A + 0,000039*S*B + 0,000000*S*Bi - 0,000000*S*N + 0,001557*A*B - 0,000002*A*Bi + 0,000000*A*N - 0,000016*B*Bi - 0,000020*B*N + 0,000000*Bi*N$$

$$\text{Resposta} = 6,54 - 0,0299S - 0,02112 A + 0,612 B - 0,000450 Bi + 0,000092N + 0,000057 S*S + 0,000097 A*A - 0,0943 B*B + 0,000000 Bi*Bi - 0,000000 N*N + 0,000004 S*A + 0,000475 S*B + 0,000000 S*Bi - 0,000000 S*N - 0,000007 A*B + 0,000000 A*Bi + 0,000000 A*N - 0,000004 B*Bi - 0,000010 B*N - 0,000000 B*N.$$

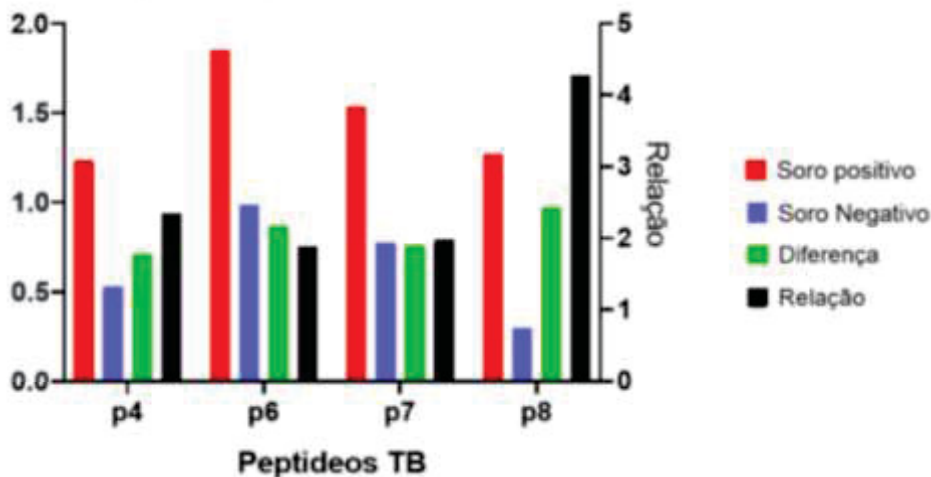
Eq. 5

Tabela 9 – Melhores condições de variáveis para uso em teste ELISA para diagnóstico de Tuberculose, obtidas após delineamento experimental

| Peptídeo | Diluição de Soro | Concentração de Antígeno (ng/poço) | Tampão de Bloqueio com BSA (%) | Conjugado anti-humano IgG ligado a biotina | Neutravidina |
|-----------|------------------|------------------------------------|--------------------------------|--|--------------|
| P.Mt.PD.4 | 1:100 | 30 | 4% | 1:14000 | 1:10000 |
| P.Mt.PD.6 | 1:100 | 30 | 2% | 1:10000 | 1:10000 |
| P.Mt.PD.7 | 1:300 | 120 | 4% | 1:10000 | 1:6000 |
| P.Mt.PD.8 | 1:100 | 30 | 2,63% | 1:10000 | 1:10000 |

Fonte: A autora (2021)

Figura 6– Representação gráfica dos resultados obtidos na padronização dos peptídeos como antígenos em teste diagnóstico para tuberculose - avaliando concentração do antígenos, diluição do soro, diluição do anticorpo secundário



Fonte: A autora (2021)

A melhor resposta foi apresentada pelo peptídeo P.MT.PD 8, assim, os gráficos da Figura 7 detalham as condições ótimas previstas pelo modelo experimental, de acordo com a influência de cada variável no resultado final.

Figura 7- Condições ótimas e influência das variáveis para o resultado do teste ELISA, previstos no modelo experimental, utilizando o Peptídeo P.MT.PD 8 como antígeno da reação.



Fonte: A autora (2021).

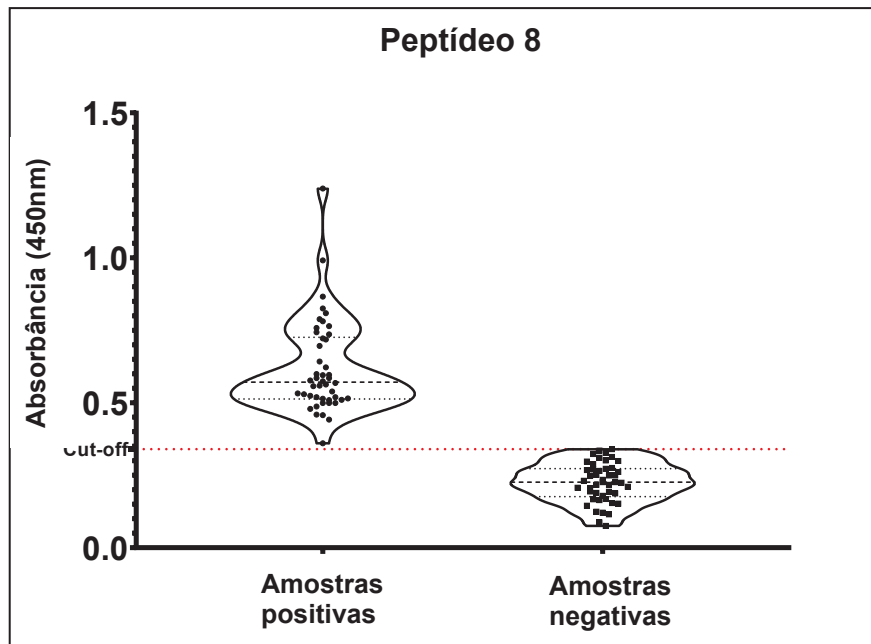
As linhas tracejadas representam o ajuste ideal do teste. Desta forma, a relação entre amostras positivas e amostras negativas está prevista, em 95% de confiança, de 2,46 (2,27 – 2,65). As condições padronizadas pelo modelo foram utilizadas para determinação de sensibilidade e especificidade do teste desenvolvido.

4.4 DETERMINAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A sensibilidade e especificidade do teste utilizando o Peptídeo P.MT.PD 8 como antígeno foram avaliadas através de teste ELISA e soros de uma população de 50 pacientes e 50 indivíduos sadios. Seguiram-se as condições de teste determinadas pelo modelo experimental seguida da padronização.

O gráfico da figura 8 representa a dispersão dos valores das absorbâncias dos soros positivos e negativos testados. Os valores não se sobrepõem, indicando baixa probabilidade de falsos positivos ou falsos negativos no teste.

Figura 8 – Representação gráfica mostrando a diferença de reatividade entre soros positivos e negativos, utilizando condições da padronização final do teste, utilizando o Peptídeo P.MT.PD 8 como antígeno da reação.

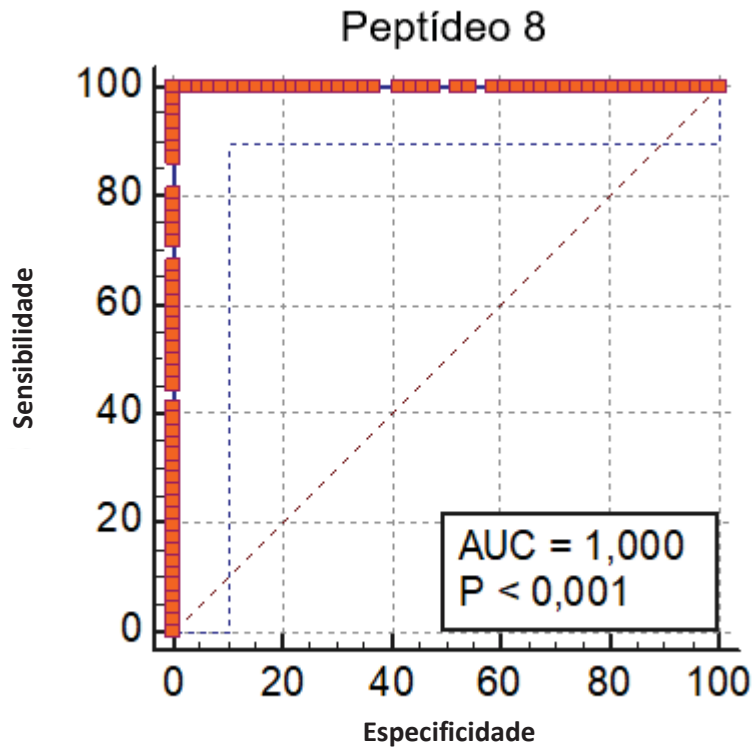


Fonte: A Autora (2021).

Os resultados das absorbâncias dos 50 soros positivos e 50 soros negativos e a análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) mostraram 100% de sensibilidade e especificidade (Figura 9) para o teste padronizado, utilizando como antígeno o peptídeo P.Mt.PD.8.

A área sob a curva (AUC) obtida para o teste foi de 1,000.

Figura 9 – Curva ROC do teste ELISA para uso em diagnóstico de tuberculose, utilizando o Peptídeo P.MT.PD 8 como antígeno da reação.



Fonte: A autora (2021)

A tabela 10 apresenta os valores obtidos para o Índice de Youden do teste (1), e seu intervalo de confiança.

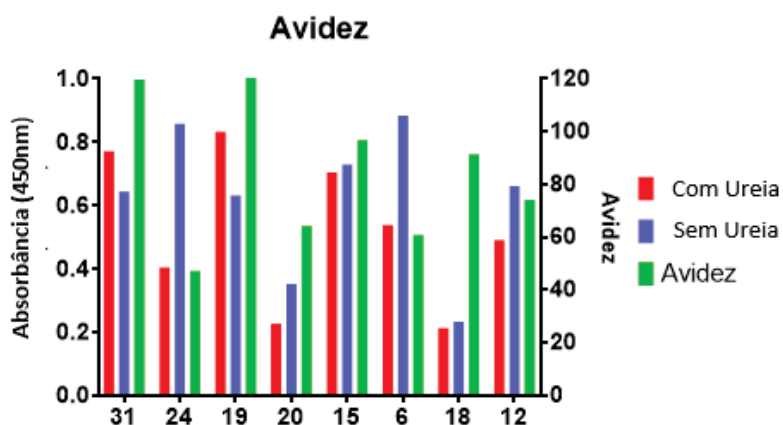
| Tabela 10- Intervalo de confiança | |
|-----------------------------------|-----------------|
| Índice de Youden | |
| Índice de Youden (J) | 1 |
| 95% Intervalo de confiança | 1,0000 a 1,0000 |
| Critério associado | >0,34 |
| 95% Intervalo de confiança | >0,335 to >0,34 |
| Sensibilidade | 100 |
| Especificidade | 100 |

Fonte: A autora (2021)

4.5 TESTE DE AVIDEZ

O teste de avididade foi realizado utilizando soros de pacientes positivos para tuberculose. Os mais reativos estão com os resultados representados no gráfico da Figura 10.

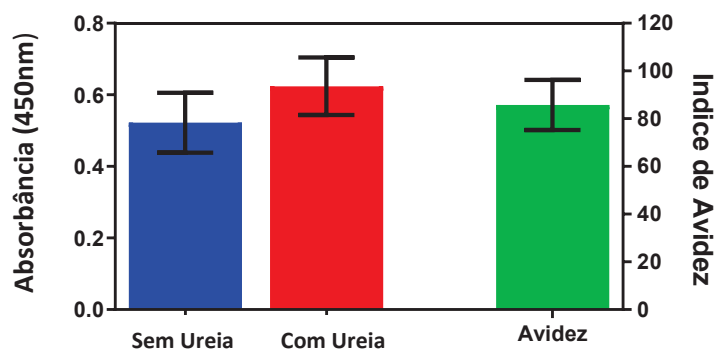
Figura 10 – Teste de avididade do peptídeo 8



Fonte: A autora (2021)

A média e desvio padrão de todas as amostras estão representados no gráfico da figura 11. Os testes realizados sem ureia e com ureia não diferem estatisticamente.

Figura 11 – Média e desvio padrão, amostras utilizadas para determinação do Índice de avididade do Peptídeo P.MT.PD 8



Fonte: A autora (2021)

O índice de avididade obtido para o peptídeo 8 foi de 85,72%.

5 DISCUSSÃO

A tuberculose é considerada uma emergência de saúde pública desde a década de 1990 (FURIN J, COX H, 2019; MASCHIO, et al. 2017). Assim, um método diagnóstico para a identificação rápida de casos clínicos ativos é uma das ações preconizadas pela OMS para conter o avanço da doença (OMS, 2020).

A proposta de antígeno e método sorológico aqui desenvolvido mostrou-se altamente sensível e capaz de diferenciar indivíduos doentes de saudáveis. O método desenvolvido apresenta vantagens com relação aos métodos utilizados para diagnóstico atualmente. Como exemplos, cita-se a baciloscopia, que apesar de possuir baixo custo e facilidade de execução, só é positiva quando há grande número de bactérias no material observado, o que pode levar a resultados falso-negativo (COELHO et al. 2008). A cultura da bactéria, tem a desvantagem de ser um método demorado, que precisa em média 40 dias para obter o resultado. O teste cutâneo, ou teste da hipersensibilidade tardia, avalia o contato prévio do organismo com antígeno da bactéria (GUILLÉN, 2011) e apesar do baixo custo, é um teste importado, apresentando dificuldades para obtenção (LIMA et al. 2017).

Os testes sorológicos, objetivo desse trabalho, são métodos atrativos devido a fácil realização e possibilidade de aplicação na fase inicial da doença. Além disso, podem ser aplicados a uma grande quantidade de amostras. Tais testes detectam anticorpos específicos no soro, sendo rápido e robusto o suficiente para ser implementado em condições adversas, como em países em desenvolvimento.

A técnica utilizada para obtenção do antígeno utilizado para o teste demonstrou resultados satisfatórios, pois o *phage display* é uma excelente ferramenta para selecionar peptídeos ou proteínas com ligação específica e com propriedades de um grande número de variantes. Um ponto positivo a se considerar é a enorme diversidade de proteínas variantes que podem ser apresentadas. Além disso, fornece meios de rastrear rapidamente um grande

número de proteínas contra potenciais parceiros de ligação, com alto rendimento (WILLATS et al. 2002).

Os resultados das sequências dos peptídeos e as condições do teste foram comparados com patentes e pedidos de patentes disponíveis na literatura. O peptídeo P.MT.PD 8 não tem nenhuma sequência similar patenteada. Quanto a padronização do teste ELISA, na invenção WO2012088577A2, por exemplo, utilizou-se conjugado peroxidase na diluição 1:1000 (mais concentrado, impactando no custo do teste) e soro 1:20 (necessidade de mais amostra biológica) (OLIVEIRA et al. 2011). A invenção US5916558A, trabalha com antígeno na concentração 400 µg/µL e conjugado peroxidase na diluição 1:1.200 (VAN-VOOREN, 1999). Demais pedidos de patentes analisados apresentam invenções com proteínas recombinantes como antígenos, o que aumenta o custo do teste, mas não se aplica na comparação.

5.1 ANÁLISE *IN SILICO*

A análise *in silico* (bioinformática), umas das metodologias utilizadas para confirmação dos peptídeos, permite a extração de resultados úteis a partir de grandes quantidades de dados, reduzindo o número de experimentos e, conseqüentemente, o custo (VERLI, 2014).

A comparação das sequências quanto sua similaridade foi realizada para verificar se possuem sequências em comum com micro-organismos do complexo MTBC. Como demonstrado na tabela, as sequências apresentaram valores aproximados de 42% de cobertura e 100% de identidade *M. tuberculosis*, o que significa que podem ser utilizadas para um exame diagnóstico, pois provavelmente apresentará alta especificidade. Não apresentaram cobertura e identidade com *M. bovis*, reduzindo significativamente o risco de resultados falsos positivos, principalmente em pessoas vacinadas com a vacina BCG (cepa de *M. bovis*). Quando comparados com a sequência de *Homo sapiens*, não apresentaram similaridade e cobertura significativa, resultado importante, pois se tivesse similaridade poderia gerar resultados insatisfatórios para o teste.

Quando comparadas com as sequências dos outros micro-organismos do complexo *Mycobacterium*, os peptídeos não apresentaram mais que 87% de identidade. Já, quando comparadas com a sequência do *M. tuberculosis*, apresentaram resultados de 90 a 100% de identidade. Esse resultado indica que os peptídeos podem ser aplicados em teste diagnóstico para pessoas infectadas com MTB.

Quando avaliada a antigenicidade dos peptídeos, os quatro se apresentaram como potenciais antígenos. A antigenicidade de um peptídeo se refere à sua de interação com o sítio de ligação do anticorpo. Assim, uma proteína ou peptídeo considerados antigênicos é aquele capaz de ser reconhecido com alta sensibilidade e especificidade por soro de pacientes infectados (DIAS et al. 2017).

A antigenicidade das sequências em estudo variaram de 0,5338 a 0,9341 pelo *software VaxiJen*. Essa plataforma se baseia em um valor de corte de 0,5, sendo assim, em ordem crescente, os peptídeos 4, 6, 8 e 7 se apresentaram como potenciais antígenos. Quando avaliados pelo programa IEDB, os resultados apresentados variaram entre 1,044 a 1,062. Interpreta-se esse resultado como quanto maior o valor obtido para o peptídeo, maior a chance de se apresentar como provável antígeno. Por essa ferramenta, o peptídeo com maior potencial antigênico seria o 7, seguido do peptídeo 8.

5.2 IMUNODETECÇÃO

Para determinar a especificidade da ligação do peptídeo frente aos anticorpos primários específicos, foi utilizado pool de soros de pacientes expostos previamente a *M. tuberculosis* em análise de imunodeteccção em membrana.

Após revelação da reação na membrana, verificou-se que os quatro peptídeos apresentaram reação com o *pool* de soros. Os peptídeos 4 e 8 apresentaram reação nas três réplicas da reação. Os peptídeos 6 e 7 apresentaram reação em duas e uma réplica, respectivamente.

Quando avaliados com soros de indivíduos saudáveis, os peptídeos não apresentaram reação, indicando ser bons candidatos para uso em teste diagnóstico e diferenciação entre indivíduos doentes e saudáveis.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O diagrama de pareto apresentado na Figura 5 avalia qual variável usada no teste ELISA apresenta maior influência na resposta. As barras azuis representam as variáveis com maior influência, e as linhas tracejadas a condição ideal para o teste.

Para o Peptídeo 4, a variável com maior influência foi a diluição do soro utilizado, seguida diluição do anticorpo secundário (anti IgG humano conjugado a biotina). A variável com maior influência para o Peptídeo 6 foi a diluição do anticorpo secundário, seguida da diluição do soro e concentração do antígeno. Para o Peptídeo 7, da mesma forma, a variável com maior influência foi a diluição do anticorpo secundário, seguida da concentração do antígeno. A variável com maior influência na resposta do Peptídeo 8 foi a diluição de soro seguida da concentração de antígeno. Apesar de serem as variáveis que mais influenciam, é possível observar que todas as variáveis testadas têm influência no resultado final dos testes.

Utilizando as condições ideais determinadas pelo diagrama, foram realizados testes ELISA com *pool* de soros de pacientes com tuberculose (C+) e soros de indivíduos sadios (C-). A partir da relação entre C+ e C-, foi determinado qual peptídeo apresentou melhor resposta (resultados representados no gráfico da Figura 6). O peptídeo 8 apresentou relação de 4,3 vezes entre resultados de C+ e C-, mostrando-se superior aos demais peptídeos. Assim, foi o peptídeo de escolha para uso como antígeno no teste diagnóstico, e determinação de sensibilidade, especificidade e índice de avidéz.

As condições ideais determinadas para o teste estão representadas nos gráficos da figura 7. A concentração de antígeno para o teste apresentar melhor resposta possível é de 30ng/poço, concentração de BSA na solução de

bloqueio 2,63%, diluição de soro 1:100 e diluição do conjugado e neutravidina 1:10000. As condições determinadas necessitam de baixas concentrações de reagente, impactando diretamente no custo do teste desenvolvido.

Essas condições foram utilizadas para a análise utilizando amostragem de 50 soros de pacientes com tuberculose e 50 indivíduos sadios. Observa-se, no gráfico apresentado na Figura 8, que os resultados positivos e negativos não se sobrepõem. Esse resultado representa um ponto positivo, visto que um teste diagnóstico deve possuir capacidade de discriminar devidamente indivíduos doentes e sadios (MALACARNE et al. 2019).

5.4 TESTE DE ÍNDICE DE AVIDEZ

O teste de avides é realizado para avaliar a força de ligação do complexo antígeno-anticorpo formado. O valor de avides é considerado alto quando é igual ou superior a 60,0% (SÃO PAULO, 2021). A análise é realizada com adição de ureia como agente dissociante, para a dissociação dos anticorpos de baixa avides.

Observando-se o gráfico da Figura 10, é possível observar que a ureia diminuiu o índice de absorvância das amostras testadas. Essa condição é explicada deduzindo-se que houve a quebra de ligações fracas ou de anticorpos de baixa avides. A média e desvio padrão das amostras testadas estão apresentadas no gráfico da Figura 11, assim como o índice de avides obtido, que foi de 85,75%. O peptídeo 8 pode então ser considerado um peptídeo de alta avides, o que significa que apresenta fortes ligações quando se liga ao anticorpo, boa característica para aplicação em teste diagnóstico.

5.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

De acordo com SOARES et al. (2012) sensibilidade é definida pela proporção de indivíduos doentes que testam positivo. Especificidade são os

indivíduos saudáveis que testam negativo. Para determinação desse resultado, foi construída a curva ROC do teste, que auxilia a verificar o poder discriminativo de um teste (BORGES, 2016). Com base na curva ROC obtida, o teste é considerado altamente sensível (100%) e específico (100%) (Figura 10 e tabela 11).

Os valores obtidos para sensibilidade e especificidade são promissores. Comparando-se com os testes utilizados atualmente, como o *Xpert* MTB/RIF, que apresenta a sensibilidade variando entre 72,5 e 98,2% nas amostras com baciloscopia negativa e positiva, respectivamente, e a especificidade de 99,0% (MALACARNE, et.al. 2019), baciloscopia com sensibilidade entre 40 e 60% e cultura 80 a 85% (BRASIL, 2020), o teste desenvolvido utilizando o peptídeo 8 como antígeno apresentou maior sensibilidade e especificidade.

Ainda, foi determinada a AUC, que avalia a precisão de como ocorre a separação entre os resultados de absorvância dos soros dos indivíduos doentes e não doentes. Uma área igual a 0,5 representa que o teste não é discriminativo (BORGES, 2016), e área igual a 1 representa um teste ótimo (VAZ, 2009). O Índice de Youden avalia a precisão do teste diagnóstico, e o resultado igual a 1 representa o melhor teste (BORGES, 2016). O teste em questão apresentou AUC e Índice Youden igual a 1. Avaliando-se os resultados obtidos, é possível afirmar que o Peptídeo 8 (P.Mt.PD 8) é um excelente candidato para uso como antígeno em teste diagnóstico. Atinge o objetivo de desenvolver um teste acessível e de baixo custo, além de altamente sensível e específico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os peptídeos obtidos pela técnica de *phage display* avaliados apresentaram bom potencial antigênico. O uso dos peptídeos como antígenos foi padronizado por meio de delineamento experimental, para obtenção das melhores condições para aplicação em teste diagnóstico utilizando a plataforma ELISA, o que determinou a utilização de baixa quantidade de reagentes, impactando diretamente no custo do teste. Um teste que utiliza menor concentração de reagentes fica mais acessível, atingindo o objetivo proposto de um diagnóstico rápido e de fácil acesso.

Dentre os peptídeos testados, o peptídeo P.Mt.PD.8 apresentou os melhores resultados na diferenciação entre soros de pacientes positivos e indivíduos negativos para tuberculose, se mostrando melhor candidato para uso em teste diagnóstico. Esse peptídeo foi então o de escolha para a determinação de sensibilidade, especificidade e índice de avidéz em teste ELISA.

Os resultados dos testes de sensibilidade e especificidade indicaram que o peptídeo em questão apresenta boa capacidade de diagnosticar corretamente soros positivos para tuberculose. O peptídeo P.Mt.PD.8 apresentou 100% de sensibilidade e 100% especificidade. O método descrito nessa dissertação apresentou resultados com maior sensibilidade e especificidade se comparado com os métodos utilizados atualmente para diagnóstico laboratorial da tuberculose.

Para próximos trabalhos, sugere-se validação do teste com maior amostragem de soros, para possibilitar introdução do teste no mercado. Sugere-se também a padronização e validação dos peptídeos 4, 6 e 7.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S.H.I.V. **Imunologia celular e molecular**. 7ed. Rio de Janeiro, Elsevier: 2012.

ALBAN, S.; MOURA, J.; THOMAZ-SOCCOL V. **Uso de peptídeos miméticos de *Mycobacterium leprae* para diagnóstico e vacina**. Depositante: Universidade Federal Do Paraná. BR00221103624550, 03 maio 2011, 03 maio 2014.

ALBAN, S.M. **Desenvolvimento de Plataformas Nanotecnológicas para o Diagnóstico de Doenças Negligenciadas utilizando Peptídeos Sintéticos Miméticos**. Universidade Federal do Paraná, 2014.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, set. 1997.

ARAUJO, Ludmilla. **Otimização do Processo de Produção de Proteínas Recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* em *Escherichia coli* para uso em Diagnóstico de Tuberculose**. Tese de doutorado. 2014.

BALLESTERO, J.G.A.; et al. Estratégias de controle e atenção à tuberculose multirresistente: uma revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.43, n.20, publicado online. 2019.

BARRETO, A.M.W.; et.al.Diagnóstico laboratorial: tuberculose. **Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences**. v.5, n.2, 2006.

BOMBARDA, S.; et.al. Imagem em tuberculose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.27, n.6. 2001.

BONNYCASTLE, L.L., MEHROKE, J.S., RASHED, M., GONG, X., SCOTT, J.K., Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. **Journal of Molecular Biology**; v.258, n.5, p.747-762, 1996.

BORGES, L.S.R. Medidas de Acurácia Diagnóstica na Pesquisa Cardiovascular. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 29, n.3 p.218-222, 2016.

BRANCO, B.C.; ROCHA, R.M. Interpretação Clínica Atual do Teste do PPD: Uma abordagem elucidativa. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.16, n.2, p.249-252, 2012.

CALLIS, J.J.A. et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. **PLOS Computational Biology**, v.8, n.1, p.361, 2013.

CASELLA, M., et al. Teste molecular rápido para tuberculose: impacto de seu uso rotineiro em um hospital de referência. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.44, n.2, 2018

COELHO, A.C., et.al. Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de paratuberculose ovina. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v.60, n.5., p.1097-1102, 2008.

COHEN, I.R., et al. Strain Variation in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: Its role in Biology, Epidemiology and Control. **Springer**, v.1019. 2017.

DALL'STELLA, R. **Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Tuberculina com Cepas Brasileiras de *Mycobacterium tuberculosis* para Diagnóstico da Tuberculose em Humanos**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2003.

DALL'STELLA, R.; KRIEGER, M. A. ; BURGER, M.; CHAHAD-EHLERS, S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Development of bioprocess for the production of purific protein derivative with Brazilian strais of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis use. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 278-287, 2007.

DELONG, E.R; DELONG, D.M; CLARKEPEARSON DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. **Biometrics**. v. 44, n. 3, p.837-845, 1988.

DIAS, D. S. et al. Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of a conserved *Leishmania* hypothetical protein against visceral leishmaniasis. **Parasitology**, p. 1–12, 2017.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. Bioinformatic Approach for Identifying Parasite and Fungal Candidate Subunit Vaccines. **The Open Vaccine Journal**, v. 1, n. 1, p. 22–26, 2008.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. **Diagnóstico Veterinário por Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima: Revisão Atualizada**. 1ed. Embrapa Pecuária Sul, 2015.

FOGEL, N. Tuberculosis: a disease without boundaries. **Tuberculosis**. v.95, n.5, p. 527-531. 2015.

FRITSCHI, N.; CURTIS, N.; RITZ, N. Bacille Calmette Guérin (BCG) and new TB vaccines: Specific, cross-mycobacterial and off-target effects. **Pediatric Respiratory Reviews**, v.20, Disponível online. 2020.

FRANK, R., GULER, S., KRAUSE, S. AND LINDENMAIER, W. Facile and rapid “spot-synthesis” of large numbers of peptides on membrane sheets, in Peptides 1990: Proceedings of the 21st European Peptide Symposium (Giralt, E. and Andreu, D., eds.), p. 151–152. 1991.

FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. Tuberculosis. **Lancet**, v.393, p.1642-1656, 2019.

GAN, S.D.; PATEL, K.R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Research Techniques Made Simple**, v.133, n.9, p.1-3, 2013.

KONEMANN, E.W. et.al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5.ed. Medsi, São Paulo, 2001.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G.R.M. **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria**. Atheneu, São Paulo: 2000.

KOZAKEVICH, G.V.; SILVA, R.M. da. Tuberculose: Revisão de Literatura. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v.44, n.4, p. 34-47. 2015.

KUMAR, R.; et al. Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p.907-918. 2019.

LACHI, T.; NAKAYAMA, M. Aspectos radiológicos da tuberculose pulmonar em indígenas de Dourados, MS, Brasil. **Radiologia Brasileira**, v.5, p.275–281. 2015.

LIMA, T.M. de.; et al. Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico de tuberculose. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.8, n.2, p. 67-78. 2017.

LOPES, A.J., et.al. **Tuberculose extrapulmonar**: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão*, v.15.n.4, p.253-261. 2006.

LOXTON, A.G. Bcells and their regulatory functions during Tuberculosis: Latency and active disease. **Molecular Immunology**, v.111, p. 145-151. 2019.

MALACARNE, J. etal. Desempenho de testes para o diagnóstico de tuberculose pulmonar em populações indígenas no Brasil: a contribuição do Teste Rápido Molecular. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.45, n.2, 2019.

MALAGHINI, M. **Proteínas Recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* para Auxílio Diagnóstico da Tuberculose**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2008.

MALAGHINI, M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M.A.; PRETI, H.; KRITSKI, A.; SOCCOL, C.R. Recombinant antigen production for assays of intradermoreaction for diagnosis and surveillance of tuberculosis. **Journal of Biotechnology** , v. 156, p. 56-58, 2011.

MERRIFIED M., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide". **Journal of American Chemistry Society**, v. 85, n.14, p. 2149–2154, 1963.

MIMMI, S.; et al. Phage Display: An Overview in Context to Drug Discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.40, n.2, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2018. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/>> Acesso em: 06/05/2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Panorama da tuberculose no Brasil. 2017. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/tuberculose/eventos/tb18_forum_panorama_tb_no_brasil.pdf Acesso em: 20/05/2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2020. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/24/Boletim-tuberculose-2020-marcas--1-.pdf>> Acesso em: 03/09/2020.

MOURA, J.; ALVARENGA, L. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Biotechnological Role of Phage-Display Peptides for the Diagnosis of Neglected Tropical Diseases. In: THOMAZ-SOCCOL, V.; PANDEY, A. e RESENDE, R. R. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications**. Elsevier, 2017. p. 161 – 180.

OLIVEIRA, S.C. et al. **Proteína recombinante de *Mycobacterium sp.*, teste imunodiagnóstico e vacina para tuberculose**. Depositante: Universidade Federal de Minas Gerais. BR nº WO2012088577A2. 29/12/2011.

Organização Mundial da Saúde - WHO. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/311259/9789241550512-eng.pdf?ua=1&ua=1> Acesso em: 06/05/2019.

PADMAPRIYADARSINI, C.; NARENDRAN, G.; SWAMINATHAN, S. Diagnosis e treatment of tuberculosis in HIV co-infected patients. **Indian Journal of Medical Research**, v.134, n. 6, p.850-865, 2011.

PALMER, P.E.S. The Imaging of Tuberculosis: With Epidemiological, Pathological, and Clinical Correlation. v.1, **Springer**, 2001.

PEIRSE, M.; HOUSTON, A. Extrapulmonary tuberculosis. **Medicine**. v.45, n.12, p. 747-752. 2017.

PEPCALC, *software*. Disponível em < PepCalc.com > Acesso em: 01/04/2021.

RABAHI, M.F. et al. Tratamento da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.43, n.6, p. 472-486. 2017.

SANTOS, J.M.L.dos. **Protocolos Clínicos e de Regulação**. Elsevier, São Paulo: 2012.

SÃO PAULO. Prefeitura de São Paulo. Disponível em: <https://telessaude.prefeitura.sp.gov.br/> Acesso em: 10/01/2021.

SATO, E.T. et al. **Atualização terapêutica de Prado, Ramos e Valle: Diagnóstico e tratamento**. 26ed. Artes Médicas, São Paulo. 2018.

SILVA, A.G.T. **Imunologia aplicada: fundamentos, técnicas laboratoriais e diagnósticos**. 1ED. São Paulo, Érica: 2014.

SILVA, D.R.; MELLO, F.C.Q.; MIGLIORI, G.B. Tuberculosis series. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. n. 2, v.45. Brasil, 2020.

SILVA, M.E.N.; et al. Aspectos gerais da tuberculose: uma atualização sobre o agente etiológico e o tratamento. Revista RBAC. Online. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/aspectos-gerais-da-tuberculose-uma-atualizacao-sobre-o-agente-etilogico-e-o-tratamento/> Acesso em: 02/08/2020.

SIQUEIRA, H.R. Enforque clínico da tuberculose pulmonar. **Pulmão**. v.21, n.1, p.15-18. 2012.

SOARES, J.L.M.F. et al. **Métodos diagnósticos**: consulta rápida. 2ed. Porto Alegre, Artmed: 2012.

THOMAZ-SOCCOL, V.; ALBAN, S. ; SEGER, J. ; SCOPELL, E. **Peptídeos miméticos de *Leishmania spp* processo para sua obtenção e suas aplicações**. Depositante: Universidade Federal Do Paraná. BR1020150177240, 24 julho 2015, 21 nov. 2017.

VAN VOOREN, J.P.; et al. **Recombinant polypeptides and peptides, nucleic acids coding for the same and use of these polypeptides and peptides in the diagnostic of tuberculosis**. Depositante: Innogenetics NV nº US5916558A. 18/09/1989, 28/06/1999.

VAZ, J.C.L. **Regiões de Incerteza para a Curva ROC em Testes Diagnósticos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.

VERLI, H. **Bioinformática**: Da Biologia à Flexibilidade Molecular. SBBq, 1ed. São Paulo. 2014.

VILLARD, S., et al. Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. **Blood**, New York, v. 102, n. 3, p. 949-952,2003

TAHARA, S. Universidade de São Paulo (USP). 2008. Disponível em: <http://www5.eesc.usp.br/portaldeconhecimentos/index.php/por/Conteudo/Planejamento-de-Experimentos> Acesso em: 20/02/2020.

TEIXEIRA, H.C.; ABRAMO, C.; MUNK, M.E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.33, n.3. online. 2006.

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiologia**. 12ed, Artmed, São Paulo: 2017.

WILLATS, W.G.T. Phage display: practicalities and prospects. **Plant Molecular Biology**. V. 50, p. 837–854, 2002.