

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DA ASSINATURA TRANSCRICIONAL DE 3 GENES DO
HOSPEDEIRO COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO
PARA TUBERCULOSE ATIVA EM POPULAÇÕES DE ALTO RISCO**

FLORA MARTINEZ FIGUEIRA MOREIRA

DOURADOS – MS

2021

FLORA MARTINEZ FIGUEIRA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ASSINATURA TRANSCRICIONAL DE 3 GENES DO
HOSPEDEIRO COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO
PARA TUBERCULOSE ATIVA EM POPULAÇÕES DE ALTO RISCO**

Área do CNPq: 40101096

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Julio Henrique Rosa Croda
Coorientador: Prof. MD. Jason Andrews

DOURADOS – MS

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M838a Moreira, Flora Martínez Figueira

Avaliação da assinatura transcricional de 3 genes do hospedeiro como ferramenta de diagnóstico e prognóstico para tuberculose ativa em populações de alto risco [recurso eletrônico] / Flora Martínez Figueira Moreira. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Julio Henrique Rosa Croda.

Coorientadora: Jason Andrews.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Tuberculose. 2. Diagnóstico. 3. busca ativa de casos. 4. Biomarcador. 5. Triagem. I. Croda, Julio Henrique Rosa. II. Andrews, Jason. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



UFGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR **FLORA MARTINEZ FIGUEIRA MOREIRA** ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO “DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO-PARASITÁRIAS”.

Aos dezanove dias do mês de julho de dois mil e vinte e um, às 15 horas, em sessão pública, realizou-se por videoconferência a Defesa de Tese de Doutorado intitulada “**Avaliação da assinatura transcricional de 3-gene do hospedeiro como ferramenta de diagnóstico e prognóstico para tuberculose ativa em populações de alto risco**” apresentada pela aluna **Flora Martinez Figueira Moreira**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof. Dr. Júlio Henrique Rosa Croda - PPGCS/UFGD-UFMS (presidente), Dr. Afranio Lineu Kritski/UFRJ, Dr. James Venturini/UFMS, Dr.^a Kesia Esther da Silva/Stanford e Dr.^a Simone Simionatto - PPGCS/UFGD. Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata ter apresentado a sua explanação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo *jus* ao título de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. **O presidente da banca abaixo assinado atesta que todos os membros participaram de forma remota¹ desta defesa de tese, considerando a candidata APROVADA, conforme declarações anexas.** Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelo presidente da Comissão Examinadora.

Dourados, 19 de julho de 2021.

Dr. Júlio Henrique Rosa Croda - PPGCS/UFGD-UFMS
Dr. Afranio Lineu Kritski/UFRJ (participação remota)
Dr. James Venturini/UFMS (participação remota)
Dr.^a Kesia Esther da Silva/Stanford (participação remota)
Dr.^a Simone Simionatto - PPGCS/UFGD (participação remota)

¹ Participação remota dos membros da banca conforme § 3º do Art. 1º da Portaria RTR/UFGD n. 200, de 16/03/2020 e Art. 2º e 5º da Instrução Normativa PROPP/UFGD Nº 1, de 17/03/2020

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Avaliação da assinatura transcricional de 3 genes do hospedeiro como ferramenta de diagnóstico e prognóstico para tuberculose ativa em populações de alto risco

RESUMO

Introdução: A Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou a necessidade do desenvolvimento de testes rápidos não baseados em escarro para rastreamento da tuberculose (TB) entre as populações de alto risco. O objetivo dessa tese foi investigar o desempenho da assinatura transcricional de 3 genes do hospedeiro como biomarcador sanguíneo de capacidade diagnóstica e prognóstica para TB ativa em populações de alto risco. **Métodos:** Foram realizados dois estudos (*Estudos I e II*) aninhados à coortes prospectivas. *Estudo I:* Foi validado a assinatura de 3 genes (*GBP5* [*Guanylate Binding Protein 5*], *DUSP3* [*Dual Specificity Protein Phosphatase 3*] and *KLF2* [*Kruppel-like factor 2*]) em três coortes independentes: (coorte 1) adolescentes de uma comunidade rural da África do Sul, com infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* (ILT_B); (coorte 2) triagem sistêmica da TB ativa em populações privadas de liberdade (PPL) de dois presídios do Brasil; e (coorte 3) monitoramento de resposta ao tratamento (1, 4 e 24 semanas) em adultos com cultura positiva para TB, atendidos em clínicas de atenção primária de saúde da África do Sul. Em todas as três coortes foram fornecidas amostras de sangue total para avaliar a expressão de RNA mensageiro (mRNA) dos 3 genes por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa (RT-qPCR). Amostras de escarro para cultura em meio sólido ou líquido foram solicitadas a todos os participantes para a confirmação da doença. *Estudo II:* Foi avaliado a acurácia da triagem diagnóstica de um novo teste protótipo de expressão rápida da assinatura de 3 genes Xpert-MTB-Host-Response (Xpert-MTB-HR) e comparamos ao desempenho da proteína-C reativa (CRP) usando um dispositivo *point-of-care* durante a triagem sistemática para TB ativa em PPL. Todos os indivíduos encarcerados foram triados por meio da coleta de escarro e confirmados pelo Xpert MTB/RIF e por cultura em meio sólido. Destes foram selecionados 100 casos confirmados de TB e 200 controles (sem TB) e comparamos o desempenho do Xpert-MTB-HR e da CRP. Avaliamos a curva característica de operação do receptor sob a curva (AUC), assumindo 90% de sensibilidade e 70% de especificidade, conforme os parâmetros de referência do perfil de produto alvo (TPP) proposto pela OMS. **Resultados:** *Estudo I:* Na coorte 1, o escore de 3 genes identificou progressão de ILTB para TB ativa 6 meses antes, com sensibilidade de 86% e especificidade de 84% (AUC, 0,86; 95% IC: 0,77-0,96). Na coorte 2, com sensibilidade de 90,91%, o escore de 3 genes atingiu 68,75% de especificidade para busca

de casos ativos (AUC, 0,87; 95% IC: 0,79-0,94). Na coorte 3, com sensibilidade de 90,11%, o escore de 3 genes atingiu 89,19% de especificidade para distinguir TB ativa de controles saudáveis e pacientes com outras doenças pulmonares (AUROC, 0,94; 95% IC: 0,88-0,99). Além disso, o escore de 3 genes identificou pacientes que evoluíram com falência no tratamento anti-TB (AUC, 0,93; 95% IC: 0,83-1,00). Coletivamente, em todas as coortes (1-3), o escore dos 3 genes identificou pacientes com TB ativa com sensibilidade de 90%, especificidade de 70% e valor preditivo negativo acima de 95% com prevalências de 4% a 25%. *Estudo II:* Com sensibilidade de 90%, o Xpert-MTB-HR teve especificidade significativamente maior (53,0%, 95% IC: 45,0-69,0%) do que CRP (28,1%, 95% IC: 20,2-41,8%), mas nenhum atendeu aos padrões de referência TPP de 70% de especificidade. Entre os indivíduos com maior carga bacilar no escarro, a sensibilidade foi alta (97%) para o Xpert-MTB-HR com especificidade de 70%. **Conclusão:** *Estudo I:* Conclui-se que nas três coortes prospectivas independentes o escore, os 3 genes se aproximam dos padrões de referência TPP para teste de triagem não baseado em escarro com alto valor preditivo negativo. *Estudo II:* Entretanto, ao avaliar o potencial diagnóstico para a busca ativa de casos, o Xpert-MTB-HR e a CRP não atenderam aos padrões de referência do TPP para um teste de triagem. No entanto, o Xpert-MTB-HR apresentou elevada sensibilidade na detecção de indivíduos com média ou alta carga bacilar no escarro.

Palavras chaves: Tuberculose; Diagnóstico; Resposta do hospedeiro; Biomarcador, Triagem, Busca ativa de casos.

Evaluation of the host 3 genes transcriptional signature as a diagnostic and prognostic tool for active tuberculosis in high-risk populations

ABSTRACT

Introduction: The World Health Organization (WHO) has identified the need for development of a non-sputum-free triage test for tuberculosis (TB) among high-risk populations. The aim of this thesis was to investigate the performance of the host 3-gene transcriptional signature as a blood biomarker of diagnostic and prognostic ability for active TB in high-risk populations.

Methods: Two diagnostic study within a prospective were carried out. *Study I:* We validated the 3 genes signature (*GBP5* [Guanylate Binding Protein 5], *DUSP3* [Dual Specificity Protein Phosphatase 3] and *KLF2* [Kruppel-like factor 2]) in three independent cohorts: (cohort 1) adolescents from a community rural South Africa with infection latent *Mycobacterium tuberculosis* (ILT_B); (cohort 2) systemic screening for active TB in persons deprived of liberty from two prisons in Brazil; and (cohort 3) monitoring response to treatment (1, 4, and 24 weeks) for adults with positive culture for TB seen in primary health care clinics in South Africa. All three cohorts have provided whole blood samples to assess the expression of messenger RNA (mRNA) of the 3 genes by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Sputum samples for culture and confirmation of the disease were requested for all participants. *Study II:* We investigated the accuracy of blood-based screening using a cartridge-based rapid 3 genes expression prototype test Xpert-MTB-Host-Response (Xpert-MTB-HR) and a *point-of-care* C-reactive protein (CRP) for mass screening for active TB in persons deprived of liberty. All incarcerated individuals were screened by sputum collection and confirmed by Xpert MTB/RIF and solid medium culture. Of these, 100 confirmed TB cases and 200 controls (without TB) were selected and compared the performance of Xpert-MTB-HR and CRP. We evaluated the receiver operating characteristic area under curve (AUC) and assessed at 90% sensitivity and 70% specificity, consistent with WHO target product profile (TPP) benchmarks. **Results:** *Study I:* In the cohort 1, the 3 gene score identified progression from ILTB to active TB 6 months earlier, with a sensitivity of 86% and specificity of 84% (AUC, 0.86; 95% CI: 0.77-0.96). In the cohort 2, with a sensitivity of 90.91%, the 3 gene score achieved 68.75% specificity for active cases finding (AUC, 0.87; 95% CI: 0.79-0.94). In the cohort 3, with a sensitivity of 90.11%, the 3 genes score achieved 89.19% specificity and 99.42% for distinguishing active TB from healthy controls and patients with other lung diseases (AUROC, 0, 94; 95% CI: 0.88-0.99). Further, the 3 genes score also distinguished patients who

had failed treatment (AUC, 0.93; 95% CI: 0.83-1.00). Collectively, in all cohorts (1-3), the 3-gene score identified patients with active TB with a sensitivity of 90%, specificity of 70%, and a negative predictive value above 95% with prevalence of 4% to 25%. *Study II:* With 90% sensitivity, Xpert-MTB-HR had significantly higher specificity (53.0%, 95% CI: 45.0-69.0%) than CRP (28.1%, 95% CI: 20.2-41.8%), but none met the TPP reference standards of 70% specificity. Among individuals with the highest bacillary load in sputum, the sensitivity was very high (97%) for the Xpert-MTB-HR with a specificity of 70%. **Conclusion:** *Study I:* It is concluded that across the 3 independent prospective cohorts, the 3 genes TB score approaches the TPP reference standards for non-sputum-based triage test with high negative predictive value. *Study II:* However, when evaluating the diagnostic potential for active cases finding the CRP and the Xpert-MTB-HR did not meet the TPP benchmarks for a triage test. Although, Xpert-MTB-HR was highly sensitive in detecting individuals with medium or high sputum bacillary burden.

Keywords: tuberculosis; diagnostic; host response; biomarker; triage; active case finding.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES – FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Estimativa do coeficiente de incidência da TB no mundo em 2019	17
Figura 2. A resposta imune inata e adaptativa	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo álcool-ácido-resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CAD	<i>Computer-aided detection</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
COVID-19	doença por Coronavírus 2019
CRP	<i>C-reactive protein</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>DUSP3</i>	<i>Dual Specificity Protein Phosphatase 3</i>
<i>GBP5</i>	<i>Guanylate Binding Protein 5</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Viruses</i>
IFN- γ	Interferon Gama
IGRA	<i>Interferon Gamma Release Assay</i>
ILTB	Infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>KLF2</i>	<i>Kruppel-like factor 2</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NHGRI	<i>National Human Genome Research Institute</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Outras doenças pulmonares
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
POC	<i>Point of Care</i>
PVHIV	Pessoa Vivendo com HIV
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
PPL	População Privada de Liberdade
RIF	Rifampicina
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNA-Seq	<i>Ribonucleic Acid Sequencing</i>
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
TB	Tuberculose
TGS	<i>Third Generation Sequencing</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TPP	<i>Target Product Profiles</i>
TRM	Teste Rápido Molecular
tRNA	<i>Transfer Ribonucleic Acid</i>
TST	Teste Tuberculínico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISAO DE LITERATURA.....	14
2.1 Etiologia e Patogênese da TB	14
2.2 Epidemiologia e estratégias de controle da TB.....	15
2.3 Manifestações clínicas e diagnóstico da TB	18
2.4 Resposta Imune do Hospedeiro.....	20
2.5 Estudos transcriptômicos em TB	22
2.5.1 Expressão gênica	22
2.5.2 Métodos para quantificação da expressão gênica.....	23
2.5.3 Biomarcadores sanguíneos de expressão gênica	25
3 OBJETIVOS	28
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
5 APÊNDICES	36
5.1 Artigo 1 - Assessment of Validity of a Blood-Based 3-Gene Signature Score for Progression and Diagnosis of Tuberculosis, Disease Severity, and Treatment Response....	37
5.2 Artigo 2 - Blood-based host biomarker diagnostics in active case finding for pulmonary tuberculosis: a diagnostic case-control study	58
6 CONCLUSÕES	80
7 ANEXOS	82
7.1 Aprovação da Proposta de Projeto de Pesquisa pela UFGD.....	83
7.2 Aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP.....	84
7.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	94
7.4 Aprovações do Comitê de Ética e Pesquisa de Stanford	96

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa de distribuição universal e é considerada, apesar dos avanços em seu diagnóstico e tratamento, uma das doenças infecciosas que mais mata no mundo (WHO, 2020). Anualmente cerca de 10 milhões de pessoas adoecem por TB. A maior concentração dos casos de TB ocorre em populações vulneráveis, que consistem em grupos populacionais marginalizados e com acesso limitado a cuidados de saúde. Essas populações vivem em condições favoráveis a uma alta incidência da doença em razão de suas condições socioeconômicas, de desnutrição e étnicas, bem como convivência em ambientes de confinamento e/ou com superlotação de pessoas (WHO, 2020).

Embora existam estratégias e esforços globais para a redução da incidência da TB no mundo por meio da identificação de casos de TB ativa em indivíduos de alto risco, seu declínio ainda está longe das metas propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (UPLEKAR *et al.*, 2015; WHO, 2021c). Além disso, existe uma preocupação adicional em relação aos cuidados e serviço de saúde devido a pandemia da doença por Coronavírus 2019 (COVID-19). Tanto a prestação de serviços de saúde para TB (diagnóstico, serviços de atenção e prevenção) quanto o acesso a esses serviços, foram severamente impactados por essa pandemia (STOP TB PARTNERSHIP, 2021; THE GLOBAL FUND, 2021).

Dados provisórios compilados pela OMS indicam que cerca de 1,4 milhão a menos de pessoas receberam cuidados para tuberculose em 2020 do que em 2019 - uma redução de 21% em relação a 2019 (WHO, 2021b). Esse declínio drástico nas notificações indicam que essas pessoas não foram diagnosticadas ou não foram oficialmente notificados aos programas nacionais de TB e, portanto, não foram tratadas (STOP TB PARTNERSHIP, 2021; THE GLOBAL FUND, 2021).

Dados emergentes da Índia e da África do Sul demonstrou que as pessoas coinfectadas com COVID-19 apresentam mortalidade três vezes maior do que as pessoas infectadas apenas com TB (WHO, 2021b). Isso torna o rastreamento de contato, localização de casos e testes bidirecionais de TB e COVID-19 essenciais (CHAKAYA *et al.*, 2021). Diante disso, as medidas para detecção ativa dos casos de TB, – definido como a identificação sistemática de pessoas com TB presumida ativa, em um grupo-alvo pré-determinado, por meio de testes, exames ou outros procedimentos – deve ser aprimorado, uma vez que o diagnóstico precoce e preciso é considerado fundamental para melhorar o controle da TB (WHO, 2021d).

Nessa perspectiva, há necessidade urgente de estratégias mais eficazes para a detecção precoce de casos de TB ativa em populações vulneráveis. Tais medidas precisam ser aplicadas

para atingir a meta global em diagnosticar e tratar pelo menos 40 milhões de pessoas com TB até 2022 (WHO, 2021d). A busca de novas ferramentas de diagnóstico rápido e de baixo custo para TB é uma opção. Um dos maiores obstáculos para o diagnóstico precoce dessa doença é que a maioria das abordagens dependem de testes laboratoriais que, por sua vez, são dependentes de amostras de expectoração. Em alguns indivíduos a produção de escarro é insuficiente ou escassa, como em pacientes com a doença menos avançada, coinfectados com HIV e em crianças (WALLIS *et al.*, 2013). Além disso, tanto o volume quanto a qualidade da amostra coletada diminuem em resposta ao tratamento, não sendo possível a obtenção de amostra suficiente para a realização de análises bacteriológicas após algumas semanas de tratamento (LAWN; ZUMLA, 2011).

Em resposta a esse desafio, a OMS definiu as necessidades diagnósticas de maior importância para TB por meio de parâmetros de referência, chamados de perfis de produto-alvo (do inglês *Target Product Profiles – TPP*) para o desenvolvimento de testes não baseado em escarro. Os requisitos necessários para os testes de triagem sistemática para TB ativa são: desenvolvimento de testes rápidos para uso em *point-of-care* (POC); baseados em biomarcadores; e que apresentem sensibilidade >90% e especificidade >70% (WHO, 2014).

O desenvolvimento e a avaliação de tais testes de diagnósticos estão no topo da lista de prioridades da pesquisa mundial (WHO, 2014). Portanto, existe um esforço considerável empreendido para desenvolver e validar biomarcadores sanguíneos, focando-se principalmente em marcadores de resposta imune do hospedeiro, incluindo assinaturas metabômicas, proteômicas e transcriptômicas capazes de detectar todas as formas da doença (MACLEAN *et al.*, 2019).

Sweeney e colaboradores (2016) descobriram, após análise de perfis de transcriptoma disponíveis publicamente e obtidos do sangue total de pacientes com sintomas compatíveis com TB, que a pontuação combinatória de 3 genes expressos pelo hospedeiro (*GBP5 [Guanylate Binding Protein 5]*, *DUSP3 [Dual Specificity Protein Phosphatase 3]* and *KLF2 [Kruppel-like factor 2]*) tiveram alta precisão em distinguir pacientes com TB ativa daqueles com outras doenças. (SWEENEY *et al.*, 2016).

Sabendo que estudos de acurácia diagnóstica representam uma etapa fundamental na validação de testes, e com base nos padrões de referência do TPP proposto pela OMS (DENKINGER *et al.*, 2019), durante a elaboração dessa tese foi desenvolvido dois estudos prospectivos, de validação e avaliação de triagem diagnóstica. No *Estudo I*, foi avaliado prospectivamente a validade da assinatura de 3 genes (referidos anteriormente) como uma ferramenta de diagnóstico, progressão e de monitoramento de resposta ao tratamento da

TB em três independentes coortes de alto risco do Brasil e África do Sul (Apêndice 5.1). No *Estudo II*, dando continuidade aos resultados obtidos no estudo anterior, e em parceria com a Cepheid (Sunnyvale - CA, EUA), investigamos a precisão diagnóstica de um cartucho protótipo (Xpert-MTB-Host-Response) baseado na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (do inglês *Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction* – RT-qPCR), para uso na Plataforma GeneXpert, disponível comercialmente. Esse protótipo quantifica os níveis relativos de mRNA desses 3 genes em uma amostra de sangue total em menos de 1 hora. Assim podemos avaliar a acurácia do novo teste durante triagem da TB ativa em populações privadas de liberdade (PPL) de duas prisões do Brasil (Apêndice 5.2).

Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar a capacidade diagnóstica e prognóstica de um novo teste de assinatura de 3 genes do hospedeiro como biomarcador sanguíneo para TB ativa em populações de alto risco.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Etiologia e Patogênese da TB

A TB é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), descoberto em 1882 por Robert Koch. MTB é um bacilo aeróbio estrito, considerado intracelular facultativo por sua capacidade de se multiplicar e sobreviver no interior de células fagocitárias, como macrófagos e outras células do hospedeiro (PAI, Madhukar *et al.*, 2016).

O bacilo MTB possui crescimento lento (tempo de duplicação entre 18-48 horas), sua parede celular é espessa, formada por uma grande quantidade e variedade de lipídeos, que confere a esses bacilos propriedade álcool-ácido resistentes (BAAR), e estão diretamente relacionados a sua patogênese e virulência (PAI, Madhukar *et al.*, 2016).

A principal porta de entrada no organismo é pela via aérea, após a inalação de núcleos secos de gotículas (núcleo de Wells) que contém 1 a 3 bacilos, os quais são inalados e podem chegar até os alvéolos. Desse modo, a transmissão ocorre quando as cavidades, que se formam nos pulmões, se rompem nos brônquios, permitindo a liberação dos bacilos por aerossóis produzidos durante tosse, espirro ou fala, havendo, dessa maneira, a possibilidade de contaminação para outros indivíduos (LAWN; ZUMLA, 2011).

A TB pulmonar é a principal forma da doença, caracterizada por necrosante inflamação granulomatosa do pulmão. É também a mais relevante para a saúde pública, pois essa forma, especialmente a bacilífera, é a responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença (LAWN; ZUMLA, 2011). Além disso, a doença pode se disseminar para outros órgãos do corpo, então denominado TB extrapulmonar (15% dos casos). Nesses quadros, geralmente o indivíduo não é infectante, já que bacilos não são expelidos através dos aerossóis, mesmo que apresente sinais e sintomas da doença (BRASIL., 2019; PAI, Madhukar *et al.*, 2016).

As vias de progressão da doença após a exposição inicial dependem da resposta imune do hospedeiro, dessa forma o MTB pode ser eliminado pela resposta imune, persistir como ILTB ou progredir para TB ativa (SIMMONS *et al.*, 2018). O indivíduo infectado pode permanecer no estado de ILTB, a doença pode persistir dessa forma, progredir naturalmente de forma lenta ou rápida para TB ativa, ou se manifestar como um espectro de estados incipientes e subclínicos antes de evoluir para doença sintomática ou eventual resolução da doença. A recuperação espontânea pode ocorrer em qualquer uma dessas trajetórias clínicas (DRAIN *et al.*, 2018).

Dessa forma, baseado nas características fisiopatológicas, as vias da progressão da TB são dividida em 5 categorias (DRAIN *et al.*, 2018; SIMMONS *et al.*, 2018):

- Infecção por TB eliminada – infecção eliminada por respostas imunes inatas e/ou adquiridas ou cura da infecção com medicamentos anti-TB. Aqui o indivíduo não tem mais MTB viável, mas ainda pode ter evidências imunológicas de infecção anterior.
- Infecção latente da TB – uma infecção com MTB viável para a qual não se espera que ocorra progressão para TB ativa em um futuro próximo, há ausência de qualquer manifestação clínica, radiológica ou microbiológica. Atualmente, não há uma maneira direta de confirmar a ILTB ou sua carga microbiológica pois os testes existentes – ensaio de liberação de interferon gama (do inglês *Interferon Gamma Release Assay* – IGRA) e teste de reatividade cutânea com derivado de proteína purificado (do inglês *Purified Protein Derivative* – PPD) – detectam imunorreatividade a antígenos específicos de MTB semelhantes à TB (PAI, M; KALANTRI; DHEDA, 2006a).
- Infecção por TB incipiente – uma infecção pelo MTB viável que provavelmente progride para doença ativa na ausência de intervenção adicional, mas ainda não induz sintomas clínicos, anormalidades radiográficas ou evidência microbiológica consistente com doença TB ativa.
- TB subclínica – uma doença causada pelo MTB viável que não causa sintomas clínicos relacionados à TB, mas causa outras anormalidades que podem ser detectadas por meio de ensaios radiológicos ou microbiológicos existentes.
- TB ativa – doença causada pelo MTB viável e causa sintomas clínicos com anormalidades radiográficas ou evidências microbiológicas consistentes com a TB ativa.

Embora conheçamos alguns fatores de risco da TB, é necessário compreender a variabilidade individual na resposta do hospedeiro que leva à sua progressão ou regressão da infecção. Por essa razão, pesquisas com biomarcadores podem ajudar a compreender mudanças na expressão do gene, a fim de identificar os indivíduos com maior risco de progressão e monitorar respostas imunes do hospedeiro contra patógenos.

2.2 Epidemiologia e estratégias de controle da TB

A TB é uma doença de impacto global que está entre as dez principais causas de morte no mundo. Desde 1997 a OMS publica anualmente um relatório Global da TB que fornece uma avaliação atualizada da situação global da TB e resume progresso e esforços na prevenção, diagnóstico e tratamento da doença a nível nacional e global (WHO, 2020). O último relatório da revelou que em 2019 aproximadamente 10 milhões de pessoas desenvolveram a TB. Além disso, 1,4 milhão de pessoas morreram pela doença, com estimativa de 1,2 milhão de mortes

entre pessoas sem infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês *Human Immuno-Deficiency Virus* – HIV), e de 208 mil mortes em pessoas vivendo com o HIV (PVHIV) (WHO, 2020).

A TB acomete predominantemente populações de baixa e média renda e em situação de vulnerabilidade. No ano de 2019, a maioria dos casos de TB ocorreu nas regiões do Sudeste Asiático (44%), África (25%) e Pacífico Ocidental (18%). Apenas 2,9% dos casos ocorreram nas Américas. No entanto, o Brasil é o único país das Américas listado entre os 20 países altamente endêmicos, embora apresente baixo coeficiente de incidência (46 casos por 100 mil habitantes) (Figura 1) (WHO, 2020).

Alguns grupos populacionais podem apresentar maior vulnerabilidade, entre eles indígenas, pessoas em situação de rua, PVHIV e PPL possuem alta carga de TB, pois vivem em condições que favorecem a alta transmissibilidade da doença (BRASIL, 2019). Superlotação, saneamento insuficiente, ventilação deficiente e cuidados de saúde inadequados nas prisões facilitam a propagação e persistência de TB e outras doenças infecciosas nesses ambientes.

Globalmente, as prisões abrigam de forma consistente uma carga muito elevada de TB, com taxas 30 vezes mais elevadas do que aqueles da população geral (BAUSSANO *et al.*, 2010). Um estudo de revisão sistemática e meta análises a nível global mostrou que as taxas de incidência da TB são muito maiores nas prisões do que na população em geral, com taxas de incidência variando de 4 na América do Norte e de 27 América do Sul, e em média acima de dez no mundo (CORDS *et al.*, 2021). Um outro estudo conduzido nas Américas Central e do Sul, constatou que as notificações de TB nas prisões aumentaram em 269% desde o ano 2000, impulsionado principalmente pelo crescimento no tamanho da população encarcerada (WALTER, K. S. *et al.*, 2021). Estudo conduzido no Brasil revelou que a prevalência de TB ativa entre PPL excede 3.900 casos por 100.000 pessoas, entre as mais altas relatadas no mundo (SANTOS *et al.*, 2020). Além disso, a doença afeta pessoas de ambos os sexos em todas as faixas etárias, entretanto a incidência é maior nos homens (com idade ≥ 15 anos), correspondendo a 56% de todos os casos. As mulheres representaram 32% e as crianças (com idade < 15 anos) 12%. Entre todos os casos de TB, 8,2% ocorreram em PVHIV (WHO, 2020).

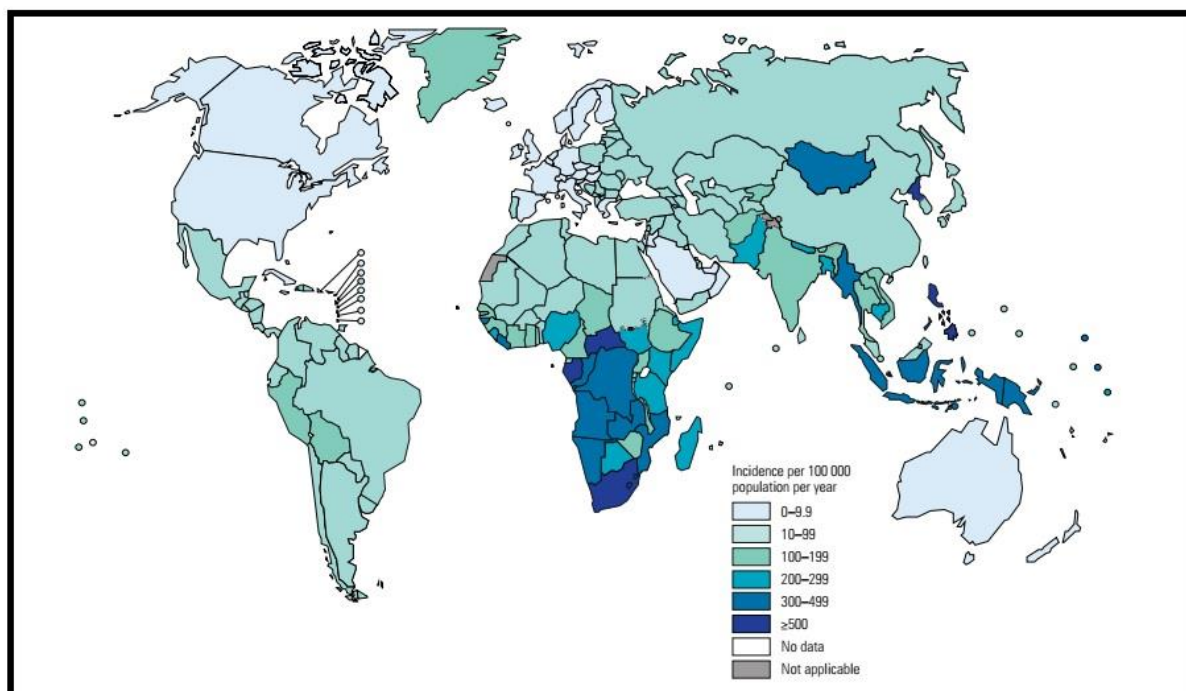


Figura 1. Estimativa do coeficiente de incidência da TB no mundo em 2019. Fonte: Global Tuberculosis Report 2020 (WHO, 2020).

Ademais, estimativas indicam que um quarto da população mundial esteja infectada com ILTB, e, portanto, esses indivíduos estão propensos a desenvolver a TB ativa em algum momento ao longo da vida (HOUBEN; DODD, 2016; WHO, 2020). O risco de progressão precoce para TB ativa é maior em crianças do que em adultos (TRAUER *et al.*, 2016). Estima-se que apenas 5-10% dos adultos com ILTB progredirão para TB ativa (BEHR; EDELSTEIN; RAMAKRISHNAN, 2019; WHO, 2020). O risco de progressão da doença é maior naqueles com desnutrição, dependência química (drogas e alcoolismo), além de doenças degenerativas e imunossupressoras (KITONSA *et al.*, 2020; KYU *et al.*, 2018; PATRA *et al.*, 2014).

Indivíduos que desenvolvem TB ativa podem ser infectantes por algum tempo antes do diagnóstico clínico, facilitando assim a disseminação da doença (LAWN; ZUMLA, 2011). Em regiões de alto risco e que carecem de sistemas de saúde pública, cada caso de TB ativa pode causar 10 a 20 infecções adicionais (WHO, 2020).

Apesar da disponibilidade da vacina do Bacillus Calmette-Guérin (BCG), que faz parte do programa nacional de imunização infantil em vários países, tem efeito protetor comprovado contra meningite e TB disseminada em crianças, mas não previne efetivamente a infecção primária ou reativação da TB pulmonar em adultos (MANGTANI *et al.*, 2014; WHO, 2021a). Na ausência de uma vacina eficaz para TB pulmonar, a principal estratégia de controle da doença é o diagnóstico precoce seguido por uma terapia monitorada (WHO, 2020). Embora

exista um tratamento específico para TB, esse possui regimes prolongados (de no mínimo 6 meses de duração), tornando-os um desafio, tanto para os doentes quanto para os sistemas de saúde, principalmente em países de baixa e média renda, nos quais a carga da doença normalmente extrapola os recursos econômicos (WHO, 2020). Além disso, o surgimento cepas bacterianas resistentes aos medicamentos desafiam o alcance das metas propostas, aumentando a gravidade da doença, na qual os tratamentos são duas vezes mais longos, com medicamentos mais caros e com baixa tolerabilidade (RAVIGLIONE; SMITH, 2007).

Em 2015, a OMS aprovou um plano de estratégias para acabar com a TB, no qual várias metas foram estabelecidas entre as quais: tratar 40 milhões de pessoas com TB e alcançar ao menos 30 milhões de pessoas com tratamento preventivo para ILTB até 2022. O objetivo é a redução de 90% das mortes e de 80% na taxa de incidência da doença até 2030 (UPLEKAR *et al.*, 2015; WHO, 2021c). Financiar a prevenção e o tratamento da TB é um grande desafio e embora os fundos dedicados à luta contra a TB tenham aumentado nos últimos 10 anos, ainda existem lacunas de financiamento que exigem investimentos por parte de governos e organizações em nível nacional e internacional. Em 2020, a maior parte do financiamento disponível para TB (85%) foi obtido por fontes domésticas, com Brasil, Federação Russa, Índia, China e África do Sul fornecendo 57% do total global. O Fundo Global de Luta Contra a Aids, Malária e Tuberculose foi a maior fonte de financiamento internacional para TB, enquanto os Estados Unidos continuam sendo o maior financiador bilateral para acabar com a doença (WHO, 2020).

Todos os esforços para prevenção e tratamento provavelmente serão perdidos sem ações e investimentos urgentes, pois o declínio na incidência tem sido consideravelmente lento, dificultando o cumprimento das metas globais. Atingir as metas globais até 2030 exigirá avanços tecnológicos, com auxílio de pesquisa e inovação para o desenvolvimento de testes rápidos para diagnóstico (idealmente dispositivos POC), bem como vacinas e tratamentos novos, mais seguros e eficazes (WHO, 2020).

2.3 Manifestações clínicas e diagnóstico da TB

A TB é diagnosticada por meio de um conjunto de evidências clínico-epidemiológicas, com base nos sinais e sintomas, seguido da confirmação microbiológica (BRASIL., 2019). A investigação clínica, como a busca ativa de sintomático respiratório é uma importante estratégia para o controle da TB, uma vez que permite a detecção precoce das formas pulmonares (BRASIL., 2019). A tosse é o sintoma mais comum, persistente seca ou produtiva,

frequentemente acompanhada por outros sintomas como, febre baixa, suor noturno, perda de peso e posteriormente, dor no peito e dificuldade respiratória.

Recentemente a OMS publicou novas diretrizes para triagem sistemática para TB ativa e tem recomendado o uso de algumas ferramentas para triagem, como técnicas de imagem – radiografia de tórax (raio X) e do software de detecção auxiliada por computador (do inglês *Computer-aided detection* - CAD) – e a introdução do uso da Proteína-C reativa (do inglês *C-reactive protein* - CRP) para o rastreamento da TB entre PVHIV (WHO, 2021d).

A CRP é um indicador de inflamação da fase aguda que pode ser quantificada em dispositivos POC por meio da coleta de sangue capilar ou periférica. As concentrações séricas e plasmáticas desta proteína aumentam em resposta à inflamação induzida por doenças como TB ativa. Essa proteína tem mostrado sensibilidade semelhante e especificidade superior ou semelhante para TB pulmonar em comparação a outros marcadores não específicos de inflamação (YOON *et al.*, 2017). Testes bioquímicos, citológicos, histopatológicos também auxiliam na investigação presuntiva, e devem ser usados em conjuntos com exames microbiológicos para confirmação da doença (PAI, M; KALANTRI; DHEDA, 2006b).

Os exames microbiológicos (baciloscopia e cultura), que detectam a presença da bactéria ou componentes de sua estrutura, e o teste rápido molecular (TRM), que detecta sequências específicas do ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid* - DNA) do MTB, são importantes para o diagnóstico da TB, porém são exames que dependem de amostras de expectoração. Para os casos de TB extrapulmonar usa-se amostras de fluidos corporais para detecção da doença (BRASIL., 2019).

Em países endêmicos a baciloscopia de escarro ou pesquisa direta do BAAR é o método diagnóstico bacteriológico mais utilizada devido sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Este exame apresenta boa especificidade em áreas de alta taxa de prevalência, porém sua sensibilidade é limitada, e detecta de 54 - 80% dos casos de TB pulmonar (BEYNON *et al.*, 2018; BRASIL., 2019).

A cultura é um método de cultivo *in-vitro* de elevada especificidade (98%) e sensibilidade (80 - 85%) no diagnóstico da TB, pois permite a identificação da micobactéria isolada. Além disso, a cultura é essencial para o teste de resistência fenotípica aos medicamentos. Meios sólidos à base de ovo, (Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh) e meios líquidos (Middlebrook Bouillon, Kirchner) são usados para a cultura de micobactérias e detectam um pequeno número de bacilos (10 - 100/mL) na amostra examinada. Os meios sólidos têm a vantagem de serem de menor custo e apresentam um baixo índice de contaminação. A desvantagem do meio sólido é o tempo de detecção do crescimento bacteriano,

que varia de 14 a 30 dias, podendo estender-se por até oito semanas. Em comparação ao BAAR, a cultura é complexa, cara, e requer especial contenção de biossegurança (BRASIL., 2019; BRODIE; SCHLUGER, 2005).

O TRM Xpert® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) é um teste molecular automatizado e desenvolvido para ser utilizado na Plataforma GeneXpert. Disponível na rede pública de saúde, o teste é baseado na reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction* - PCR) e detecta a amplificação de DNA do bacilo MTB, além de identificar mutações do gene *rpoB*, o qual é associado com a resistência à rifampicina (RIF). Possui a vantagem de ser baseado em um sistema de cartucho fechado, diminuindo o risco da formação de aerossol durante o processamento, entretanto sua sensibilidade é inadequada em pacientes com doença paucibacilar ou HIV. A fim de superar essa limitação, foi desenvolvido Xpert® MTB/RIF Ultra (Xpert Ultra) o qual possui alta sensibilidade (98%) e a vantagem de ser um teste mais rápido que o anterior (menos de 90 minutos para liberação do resultado) (BRASIL., 2019; DORMAN *et al.*, 2018). De forma geral, a desvantagem do teste Xpert e Xpert Ultra é que o teste detecta bacilos viáveis e inviáveis, por isso não é utilizado para controle de tratamento, nem tampouco substitui a realização da cultura. Contudo, por se tratar de um produto tecnológico, o GeneXpert abriu caminho para os testes da próxima geração, possibilitando o desenvolvimento de outras formas de detecção (DORMAN *et al.*, 2018).

2.4 Resposta Imune do Hospedeiro

O corpo humano possui uma série de barreiras de defesa externas para evitar a invasão por patógenos que podem causar infecções e doenças. Quando esses mecanismos falham o sistema imunológico – um complexo interno sistema de órgãos, tecidos, células, moléculas e processos químicos – é ativado para garantir a sobrevivência do hospedeiro. A proteção imunológica contra a TB inclui respostas inata e adaptativa, que estão envolvidas na eliminação e contenção do patógeno. Para que o estabelecimento de uma resposta protetora ocorra é necessário a interação eficiente entre células dendríticas, macrófagos e células efetoras antígeno-específica T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 2) (COOPER, 2009).

Na infecção, após a entrada de partículas de aerossóis infectantes no sistema respiratório, o MTB é engolfado por macrófagos alveolares que passam a produzir citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que ajudam a recrutar outras células da resposta imune inata incluindo macrófagos, monócitos e granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos) (SRIVASTAVA; ERNST; DESVIGNES, 2014). Após a ingestão dos bacilos os macrófagos e

células dendríticas destroem e processam seus antígenos apresentando-os aos linfócitos T (resposta imune adaptativa) os quais recrutam e ativam mais macrófagos para conter a fase inicial de multiplicação bacteriana (MARINO *et al.*, 2004; MIHRET, 2012). As células T aumentam a atividade antibacteriana dos macrófagos ao liberar citocinas, como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o que geralmente resulta na interrupção ou eliminação da infecção (SRIVASTAVA; ERNST, 2014).

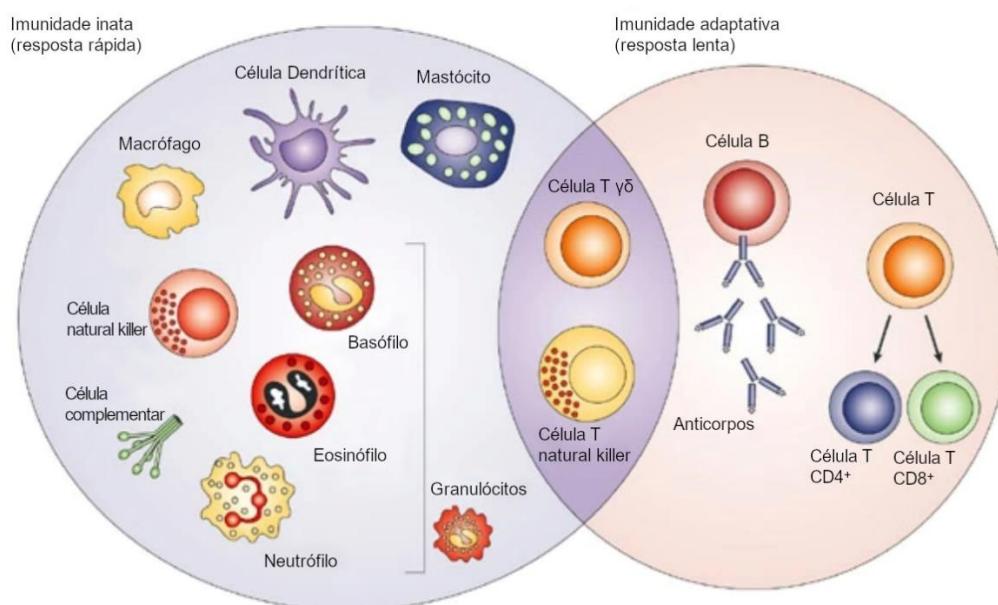


Figura 2. A resposta imune inata e adaptativa. Figura editada. Fonte: Nature Reviews | Cancer (DRANOFF, 2004).

Macrófagos desempenham um papel crucial na infecção, eles podem conter disseminação do MTB por apoptose ou, ao contrário, dependendo do estado imune do hospedeiro. O MTB internalizado pode bloquear o sistema fusão fagolisossômico, inibindo a apoptose da célula hospedeira e dessa forma contribui para a sua disseminação via necrose seguida de infecção das células vizinhas (O'Garra *et al.*, 2013). (ERNST, 2012; LAWN; ZUMLA, 2011).

Dessa forma, antígenos específicos de células T induzem a formação de granulomas em torno dos macrófagos infectados para conter propagação bacteriana. A formação de granulomas impede o crescimento e a disseminação de MTB no organismo, mas não elimina a possibilidade de desenvolvimento subsequente de TB no futuro (REECE; KAUFMANN, 2012). O centro necrótico do granuloma tem baixas concentrações de oxigênio e oferece, portanto, um ambiente hostil para os bacilos (ULRICHS; KAUFMANN, 2006). O granuloma pode persistir por muitos anos contendo MTB em um estado dormente ou latente (ILTB). No entanto, a falha em conter

a infecção pode resultar na descarga de patógenos com doença clínica ativa e transmissão (PAI, Madhukar *et al.*, 2016).

Dessa forma, afim de manter a versatilidade e adaptabilidade a um organismo uma ampla gama de mecanismos são usados pelas células do sistema imunológico para aumentar ou diminuir a síntese de produtos gênicos específicos (moléculas e proteínas) que tem funções de regular certas funções, como por exemplo durante a invasão de agentes infecciosos. O reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno de MTB induz uma rede de vias de sinalização coordenadas que levam a perfis de expressão gênica distintos nas células de defesa em diferentes estágios de infecção (KUMAR, 2021).

Assim, por meio da regulação da expressão gênica algumas moléculas regulatórias, tipicamente proteína, tem a capacidade de interagir com fatores apropriados no ambiente celular, de modo que seu papel regulador responda às necessidades da célula para uma necessidade específica (DUNHAM *et al.*, 2012; KUMAR, 2021). Nesse contexto a análise da expressão gênica, em qualquer uma das células específicas envolvidas com as respostas imunes ou em amostras complexas de células sanguíneas, é de suma importância para compreender os mecanismos imunológicos que o hospedeiro utiliza para eliminar agentes infecciosos e/ou identificar biomarcadores específicos presentes durante infecção que ajudarão no prognóstico, diagnóstico ou tratamento de doenças (DULIN *et al.*, 2013).

2.5 Estudos transcriptômicos em TB

2.5.1 Expressão gênica

O genoma humano é constituído de DNA, uma macromolécula compartilhada por todas as células de um organismo que contém informações necessárias para construir e manter as células. Essas instruções são apresentadas na forma de pares de bases de quatro substâncias químicas diferentes, organizadas em 20.000 a 25.000 genes. Para que as instruções sejam realizadas, o DNA deve ser transcrito em RNA mensageiro (mRNA). Essas leituras de genes são chamadas de transcritos, e um transcriptoma é uma coleção de todas as leituras de genes presentes em uma célula (DUNHAM *et al.*, 2012).

O mRNA desempenha um papel importante na síntese proteica. Neste processo o mRNA é transcrito dos genes; em seguida, os transcritos são entregues aos ribossomos localizados no citoplasma da célula; então, os ribossomos leem, ou traduzem, a sequência de bases de bases específicas do mRNA para o processo de síntese proteínas. O DNA também

pode ser transcrito em outros tipos de RNA – RNA ribossômico (rRNA) e RNA de transferência (tRNA) – que não codificam proteínas (O'CONNOR; ADAMS, 2010).

Uma sequência de mRNA reflete a sequência do DNA a partir do qual foi transcrita. Conseqüentemente, ao analisar toda a coleção de sequências de mRNA em uma célula (o transcriptoma), é possível determinar quando e onde cada gene é ativado ou desativado nas células e tecidos de um organismo, isso é chamado de regulação gênica (ADAMS, 2008).

Dependendo da técnica usada, é possível quantificar o número de transcritos e determinar a atividade gênica - também chamada de expressão gênica - em uma determinada célula ou tecido (ADAMS, 2008). A transcriptômica do hospedeiro é uma abordagem poderosa para a descoberta de assinaturas genéticas. As análises transcriptômicas humanas fornecem informações sobre quais genes são expressos no tecido. Ao comparar esses perfis transcriptômicos de indivíduos com uma doença vs. aqueles sem, é possível identificar genes que diferem em sua expressão e, portanto, fazem parte da assinatura de uma doença (SINGHANIA *et al.*, 2018).

Identificar tais assinaturas tem dois benefícios principais: Primeiro, podem ser usadas como ferramentas de diagnóstico para identificar os indivíduos afetados. Em segundo lugar, podem indicar quais genes, vias e células são alterados por uma doença, melhorando assim a compreensão da doença e permitindo o desenho de novas intervenções terapêuticas ou profiláticas (KUMAR GUPTA; NOURSADEGHI, 2021; SINGHANIA *et al.*, 2018).

A função de muitos dos genes ainda não é conhecida. Por isso, recursos como bancos de dados transcriptômicos, como o *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), tem auxiliado as pesquisas pois fornecem uma lista de todos os tecidos nos quais um gene é expresso, fornecendo pistas sobre sua possível função (NIH, 2021).

2.5.2 Métodos para quantificação da expressão gênica

Existem vários métodos para quantificar os níveis de mRNA, cada um dos quais tem sua própria vantagem e desvantagens, além de depender do objetivo do estudo proposto. O RT-qPCR é um método simples e amplamente utilizado para quantificação dos níveis de mRNA que consiste em duas etapas: transcrição reversa (RT) e PCR quantitativo em tempo real. Em geral, o RT-qPCR é sensível, preciso e altamente reproduzível e detecta quantidades muito pequenas de mRNA de um gene. RT-qPCR ainda é considerado o "padrão ouro" para quantificação de mRNA tornando-o preferível para estudos de validação (BACHMAN, 2013).

Além de detectar e quantificar transcrições simples, é possível investigar o perfil transcricional de uma célula ou tecido. Tal perfil pode ser realizado usando tecnologias baseadas em tag e tecnologia de microarranjo. Os métodos baseados em tag incluem análise serial de expressão gênica (do inglês *Serial Analysis of Gene Expression* – SAGE) e de sequenciamento de RNA (RNA-Seq).

SAGE é um método usado para obter perfis de expressão gênica abrangentes, imparciais e quantitativas e requer quantidades relativamente pequenas de material de partida (RNA ou células) sem a necessidade de uma etapa de amplificação. A principal vantagem desse método é que esse reflete a quantidade de vezes em que cada sequência curta (tag) única de uma transcrição é detectada em uma amostra e, portanto, fornece níveis absolutos de mRNA (HU; POLYAK, 2006). A técnica de RNA-Seq é uma técnica que pode avaliar a quantidade e sequências de RNA em uma amostra usando sequenciamento de próxima geração (do inglês *Next Generation Sequencing* – NGS). Essa técnica gera sequência simultaneamente e dados que podem ser combinados com um genoma de referência. Informações adicionais que podem ser obtidas usando esta abordagem é a identificação do conteúdo celular total dos RNAs, incluindo mRNA, rRNA e tRNA. Além de informações de quais genes são ativados em uma célula, o nível de expressão e em que momentos essas são ativadas ou desativadas (GARBER *et al.*, 2011).

A tecnologia de microarranjo (também conhecida como microarranjo de cDNA ou Chip de microarranjo) é um método rápido, confiável e reproduzível para se obter perfis de expressão gênica. Os microarranjos têm sido utilizados para perfis transcricionais em grandes coortes, porque fornecem uma forma de alto rendimento, quantificando a expressão gênica de várias células, tecidos ou organismos em um único experimento (GRESHAM; DUNHAM; BOTSTEIN, 2008).

Logo depois que o NGS foi estabelecido, os métodos de sequenciamento de terceira geração (do inglês *Third Generation Sequencing* – TGS) surgiram. Acredita-se que esses métodos revolucionem o campo das ciências da vida em uma maneira sem precedentes, pois se espera que reduzam a taxa de erro de sequenciamento, o tempo para resultados de dias para horas, e o custo geral por execução. Além de permitir o sequenciamento direto de moléculas de RNA, enquanto omite a síntese de cDNA e etapas de amplificação (WEE *et al.*, 2019).

2.5.3 Biomarcadores sanguíneos de expressão gênica

Com o advento de tecnologias para quantificação da expressão gênica foi possível a descoberta de biomarcadores de expressão gênica e subsequente aplicação ao campo de diagnóstico clínico (KUMAR GUPTA; NOURSADEGHI, 2021). Um biomarcador é definido como a ação de moléculas que é objetivamente medido e avaliado como um indicador de um processo biológico normal, um processo patogênico ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (DOWNING, 2001).

O sangue total não é apenas um tecido acessível que permite a investigação de candidatos a biomarcadores, mas tem o potencial de transmitir a informação de diferentes órgãos e tecidos. As células sanguíneas interagem com todos os tecidos do corpo e desempenham um papel fundamental no transporte de oxigênio, nutrientes e resíduos, bem como na imunidade, sinalização e defesa (LIEW *et al.*, 2006).

O perfil molecular das células sanguíneas circulantes reflete aspectos fisiológicos e patológicos de eventos que ocorrem em diferentes tecidos do corpo. À medida que o sangue conecta os sistemas do corpo, esse se junta e interage com todos os órgãos e tecidos. As células do sangue periférico compartilham mais de 80% do transcriptoma com cérebro, cólon, coração, rim, fígado, pulmão, próstata, baço e estômago (WHITNEY *et al.*, 2003).

Assim, o perfil expressão do sangue total não é apenas um meio para explorar vários processos fisiológicos, mas também um meio de identificação de padrões de expressão que oferecem uma visão ampla do estado de saúde do organismo e imunidade geral. Portanto, a investigação de perfis transcriptômicos sanguíneos do hospedeiro representa uma nova abordagem para identificar biomarcadores específicos presentes durante infecção que ajudarão no prognóstico, diagnóstico e/ou monitoramento do tratamento de doenças (DULIN *et al.*, 2013).

Idealmente, os testes diagnósticos devem ser simples (por exemplo, detecção por RT-qPCR de um pequeno número de genes) para garantir a reprodutibilidade. Além disso, um teste barato permitirá um uso mais amplo, como em configurações de poucos recursos. No entanto, para decidir quais genes devem ser incluídos em um teste diagnóstico é necessária uma investigação ampla. A abordagem mais comumente usada é realizar primeiro triagens do transcriptoma inteiro para selecionar os melhores genes discriminatórios entre coortes de interesse, que serão então validados no nível do gene individual (KUMAR GUPTA; NOURSADEGHI, 2021; ROE *et al.*, 2020).

Além disso, para estudos de diagnóstico, é crucial validar a assinatura em uma população de estudo que represente a população real de pacientes para os quais o diagnóstico será aplicado. Assim, é especialmente importante incluir indivíduos de outra etnia ou localização geográfica como uma coorte de validação para testar a robustez da assinatura transcriptômica (ZAK *et al.*, 2016). Nesse sentido, vários estudos com assinaturas transcricionais do hospedeiro baseado em sangue e, discriminando entre pacientes com TB e controles saudáveis e/ou pacientes com outras doenças mostraram-se promissores para o diagnóstico da TB ativa, predizendo a progressão da infecção para a doença e no monitoramento do tratamento (BERRY *et al.*, 2010; BLANKLEY *et al.*, 2016; BLOOM *et al.*, 2013; CLIFF *et al.*, 2013; DAWANY *et al.*, 2014; KAFOROU *et al.*, 2013; MAERTZDORF *et al.*, 2012; MENDELSON *et al.*, 2021; MISTRY *et al.*, 2007; OTTENHOFF *et al.*, 2012; SWEENEY *et al.*, 2016; TURNER *et al.*, 2020; WALTER, N. D. *et al.*, 2016).

MacLean e colaboradores (2019) realizaram um estudo de revisão sistemática que avaliou a qualidade de biomarcadores, incluindo assinaturas metabolômicas, proteômicas e transcriptômicas capazes de detectar TB ativa. Nesse estudo, das 443 publicações selecionadas entre os anos de 2010 e 2017 foram identificados 1008 biomarcadores, sendo 90% referentes a biomarcadores do hospedeiro. Do total de biomarcadores analisados apenas 4% apresentaram alta qualidade segundo os critérios mínimos de TPP recomendados pela OMS (MACLEAN *et al.*, 2019). Entre os quais estão incluídos a validação da assinatura de 44 transcritos de mRNA em um estudo de caso-controle (KAFOROU *et al.*, 2013); assinaturas transcricionais mais compactas com proteínas *GBP5* (LAUX DA COSTA *et al.*, 2015); e uma assinatura de *GBP5* e o fator *KLF2* – revelando que o conjunto desses dois genes podem ser úteis para diagnóstico da TB ativa, e auxiliar no monitoramento do tratamento (FRANCISCO *et al.*, 2017).

Além disso, um estudo de revisão sistemática e de meta análises analisou múltiplas assinaturas de transcrição sanguínea para avaliação do diagnóstico e de progressão para TB ativa (TB incipiente). Porém os biomarcadores analisados apenas atenderam aos riscos de TB a curto prazo (de 3 a 6 meses), não correspondendo aos parâmetros mínimos dos TPPs para sensibilidade e especificidade em distinguir TB incipiente (GUPTA *et al.*, 2020). Outro estudo avaliou o perfil de expressão gênica baseado na resposta imunológica do hospedeiro buscando a compreensão dos biomarcadores associados a progressão da infecção latente para TB ativa. O intuito era identificar novos marcadores de sangue total que podem distinguir a TB ativa de outras doenças pulmonares (OPD), que posteriormente podem ser avaliados como um preditor de reativação de TB. Entre 23 genes candidatos que diferenciaram pacientes com TB ativa daqueles com OPD, nove genes (*CD274*, *CEACAM1*, *CRI1*, *FCGR1A / B*, *IFITM1*, *IRAK3*,

LILRA6, *MAPK14*, *PDCD1LG2*) demonstraram sensibilidade e especificidade de 100%. Sete genes (*C1QB*, *C2*, *CCR2*, *CCRL2*, *LILRB4*, *MAPK14*, *MSR1*) distingue TB de ILTB com sensibilidade e especificidade entre 82 e 100%. Esse estudo identificou candidatos de gene único que distinguem a TB de OPD e ILTB com alta sensibilidade e especificidade (ambos > 82%), que podem ser avaliados como diagnóstico para doença e como marcadores preditivos para TB (PETRILLI *et al.*, 2020).

Embora ainda haja um longo caminho para enfrentar todos os obstáculos associados ao controle e erradicação da TB, a análise transcriptômica do hospedeiro é uma ferramenta importante para avançar em direção a esse objetivo. Os estudos transcriptômicos do hospedeiro não apenas identificaram novos alvos para testes diagnósticos e prognósticos, mas também melhoraram nosso conhecimento sobre os mecanismos imunológicos específicos da TB. Ao mesmo tempo, esses estudos destacaram questões como a necessidade de levar em consideração patologias semelhantes e status de coinfeção em coortes de doenças, a importância de comparar sangue total vs. subconjuntos de células e em outros tecidos, além da versatilidade das ferramentas de bioinformática disponíveis para a identificação de assinaturas de genes.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o desempenho da assinatura transcricional da assinatura de 3 genes do hospedeiro como biomarcador sanguíneo de capacidade diagnóstica, previsão de progressão para TB ativa e de resposta ao tratamento em populações de alto risco.

3.2 Específicos

- Validar a assinatura de 3 genes como uma ferramenta prognóstica, diagnóstica, e de resposta ao tratamento da TB ativa em diferentes coortes independentes.
- Avaliar a acurácia diagnóstica de um novo protótipo de expressão de 3 genes – Xpert-MTB-Host-Response – como teste rápido de triagem em massa para TB ativa em população privada de liberdade.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, Jill U. **Transcriptome: Connecting the Genome to Gene Function**. [S. l.], 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/transcriptome-connecting-the-genome-to-gene-function-605/#>. Acesso em: 3 mar. 2021.

BACHMAN, Julia. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). **Methods in enzymology**, United States, v. 530, p. 67–74, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>

BAUSSANO, Iacopo *et al.* Tuberculosis incidence in prisons: a systematic review. **PLoS medicine**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. e1000381, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000381>

BEHR, Marcel A; EDELSTEIN, Paul H; RAMAKRISHNAN, Lalita. Is Mycobacterium tuberculosis infection life long? **BMJ (Clinical research ed.)**, [s. l.], v. 367, p. 15770–15770, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.15770>

BERRY, Matthew P R *et al.* An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. **Nature**, [s. l.], v. 466, n. 7309, p. 973–977, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature09247>

BEYNON, Fenella *et al.* Correlation of Xpert MTB/RIF with measures to assess Mycobacterium tuberculosis bacillary burden in high HIV burden areas of Southern Africa. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 5201, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23066-2>

BLANKLEY, Simon *et al.* The transcriptional signature of active tuberculosis reflects symptom status in extra-pulmonary and pulmonary tuberculosis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1–14, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162220>

BLOOM, Chloe I *et al.* Transcriptional blood signatures distinguish pulmonary tuberculosis, pulmonary sarcoidosis, pneumonias and lung cancers. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. e70630–e70630, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070630>

BRASIL. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: [s. n.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/978-85-334-2696-2>.

BRODIE, Daniel; SCHLUGER, Neil W. The diagnosis of tuberculosis. **Clinics in chest medicine**, United States, v. 26, n. 2, p. 247–271, vi, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2005.02.012>

CHAKAYA, Jeremiah *et al.* Global Tuberculosis Report 2020 – Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.107>

CLIFF, Jacqueline M *et al.* Distinct phases of blood gene expression pattern through tuberculosis treatment reflect modulation of the humoral immune response. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 207, n. 1, p. 18–29, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis499>

COOPER, Andrea M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annual review of immunology**, [s. l.], v. 27, p. 393–422, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703>

CORDS, Olivia *et al.* Incidence and prevalence of tuberculosis in incarcerated populations: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Public Health**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. e300–e308, 2021. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00025-6)

DAWANY, Noor *et al.* Identification of a 251 gene expression signature that can accurately detect M. tuberculosis in patients with and without HIV co-infection. **PloS one**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e89925–e89925, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089925>

DENKINGER, Claudia M *et al.* Guidance for the Evaluation of Tuberculosis Diagnostics That Meet the World Health Organization (WHO) Target Product Profiles: An Introduction to WHO Process and Study Design Principles. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 220, n. Supplement_3, p. S91–S98, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz097>

DORMAN, Susan E *et al.* Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. **The Lancet. Infectious diseases**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 76–84, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30691-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30691-6)

DOWNING, G D. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical pharmacology and therapeutics**, United States, v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>

DRAIN, Paul K *et al.* Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. e00021-18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-18>

DRANOFF, Glenn. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 11–22, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc1252>

DULIN, David *et al.* Studying genomic processes at the single-molecule level: introducing the tools and applications. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 9–22, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg3316>

DUNHAM, Ian *et al.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, [s. l.], v. 489, n. 7414, p. 57–74, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11247>

ERNST, Joel D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature reviews. Immunology**, England, v. 12, n. 8, p. 581–591, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3259>

FRANCISCO, Ngiambudulu M. *et al.* Diagnostic accuracy of a selected signature gene set that discriminates active pulmonary tuberculosis and other pulmonary diseases. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 499–510, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.09.012>

GARBER, Manuel *et al.* Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature Methods**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 469–477, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1613>

GRESHAM, David; DUNHAM, Maitreya J; BOTSTEIN, David. Comparing whole genomes using DNA microarrays. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 291–302, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg2335>

GUPTA, Rishi K *et al.* Concise whole blood transcriptional signatures for incipient tuberculosis: a systematic review and patient-level pooled meta-analysis. **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 482, p. 1–28, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30282-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30282-6)

Houben, Rein M G J; DODD, Peter J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. **PLoS medicine**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. e1002152–e1002152, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002152>

HU, Min; POLYAK, Kornelia. Serial analysis of gene expression. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 1743–1760, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.269>

KAFOROU, Myrsini *et al.* Detection of Tuberculosis in HIV-Infected and -Uninfected African Adults Using Whole Blood RNA Expression Signatures: A Case-Control Study. **PLOS Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. e1001538, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001538>

KITONSA, Peter J *et al.* Evaluation of underweight status may improve identification of the highest-risk patients during outpatient evaluation for pulmonary tuberculosis. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. e0243542, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243542>

KUMAR, Shashank. **Clinical Biochemistry and Drug Development: From Fundamentals to Output**. [S. l.]: Apple Academic Press, 2021.

KUMAR GUPTA, Rishi; NOURSADEGHI, Mahdad. Blood transcriptomic biomarkers for tuberculosis screening: time to redefine our target populations? **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. e736–e737, 2021. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(21\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00088-7)

KYU, Hmwe H *et al.* The global burden of tuberculosis: results from the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 261–284, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30703-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30703-X)

LAUX DA COSTA, Lucas *et al.* A real-time PCR signature to discriminate between tuberculosis and other pulmonary diseases. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 95, n. 4, p. 421–425, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.04.008>

LAWN, Stephen D; ZUMLA, Alimuddin I. Tuberculosis. **Lancet (London, England)**, England, v. 378, n. 9785, p. 57–72, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62173-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62173-3)

LIEW, Choong-Chin *et al.* The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. **The Journal of laboratory and clinical**

medicine, United States, v. 147, n. 3, p. 126–132, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.10.005>

MACLEAN, Emily *et al.* A systematic review of biomarkers to detect active tuberculosis. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 748–758, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0380-2>

MAERTZDORF, Jeroen *et al.* Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 109, n. 20, p. 7853–7858, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1121072109>

MANGTANI, Punam *et al.* Protection by BCG Vaccine Against Tuberculosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 470–480, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/cit790>

MARINO, Simeone *et al.* Dendritic cell trafficking and antigen presentation in the human immune response to Mycobacterium tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, United States, v. 173, n. 1, p. 494–506, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.494>

MENDELSON, Simon C *et al.* Validation of a host blood transcriptomic biomarker for pulmonary tuberculosis in people living with HIV: a prospective diagnostic and prognostic accuracy study. **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. e841–e853, 2021. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(21\)00045-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00045-0)

MIHRET, Adane. The role of dendritic cells in Mycobacterium tuberculosis infection. **Virulence**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 654–659, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/viru.22586>

MISTRY, R *et al.* Gene-expression patterns in whole blood identify subjects at risk for recurrent tuberculosis. **J Infect Dis**, [s. l.], v. 195, n. 3, p. 357–365, 2007. Disponível em: [https://doi.org/JID36908 \[pii\]10.1086/510397](https://doi.org/JID36908 [pii]10.1086/510397)

NIH. **National Human Genome Research Institute**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.genome.gov/>. Acesso em: 3 mar. 2021.

O'CONNOR, Clare; ADAMS, Jill U. **Essentials of Cell Biology**. Cambridge: Nature Education, 2010. *E-book*.

OTTENHOFF, Tom H M *et al.* Genome-wide expression profiling identifies type 1 interferon response pathways in active tuberculosis. **PLoS one**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. e45839, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045839>

PAI, M; KALANTRI, S; DHEDA, K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis. **Expert Rev Mol Diagn**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 413–422, 2006a. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/14737159.6.3.413>

PAI, M; KALANTRI, S; DHEDA, K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II. Active tuberculosis and drug resistance. **Expert Rev Mol Diagn**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 423–432, 2006b. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/14737159.6.3.423>

PAI, Madhukar *et al.* Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 16076, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>

PATRA, Jayadeep *et al.* Tobacco Smoking, Alcohol Drinking, Diabetes, Low Body Mass Index and the Risk of Self-Reported Symptoms of Active Tuberculosis: Individual Participant Data (IPD) Meta-Analyses of 72,684 Individuals in 14 High Tuberculosis Burden Countries. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. e96433, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096433>

PETRILLI, Jéssica D. *et al.* Whole blood mRNA expression-based targets to discriminate active tuberculosis from latent infection and other pulmonary diseases. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78793-2>

RAVIGLIONE, Mario C; SMITH, Ian M. XDR Tuberculosis — Implications for Global Public Health. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 356, n. 7, p. 656–659, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMp068273>

REECE, Stephen T; KAUFMANN, Stefan H E. Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? **Current opinion in microbiology**, England, v. 15, n. 1, p. 63–70, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.006>

ROE, Jennifer *et al.* Blood transcriptomic stratification of short-term risk in contacts of tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 731–737, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz252>

SANTOS, Andrea da Silva *et al.* Yield, Efficiency and Costs of Mass Screening Algorithms for Tuberculosis in Brazilian Prisons. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], p. 1–29, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa135>

SIMMONS, Jason D *et al.* Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 575–589, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0025-3>

SINGHANIA, Akul *et al.* The value of transcriptomics in advancing knowledge of the immune response and diagnosis in tuberculosis. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 1159–1168, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0225-9>

SRIVASTAVA, Smita; ERNST, Joel D. Cell-to-cell transfer of M. tuberculosis antigens optimizes CD4 T cell priming. **Cell host & microbe**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 741–752, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.007>

SRIVASTAVA, Smita; ERNST, Joel D; DESVIGNES, Ludovic. Beyond macrophages: the diversity of mononuclear cells in tuberculosis. **Immunological reviews**, [s. l.], v. 262, n. 1, p. 179–192, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imr.12217>

STOP TB PARTNERSHIP. **12 Months of COVID-19 Eliminated 12 Years of Progress in the Global Fight Against Tuberculosis**. [S. l.], 2021. Disponível em: http://www.stoptb.org/news/stories/2021/ns21_011.html. Acesso em: 28 mar. 2021.

SWEENEY, Timothy E. *et al.* Genome-wide expression for diagnosis of pulmonary

tuberculosis: a multicohort analysis. **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 213–224, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00048-5)

THE GLOBAL FUND. **TB testing in 2020 dropped drastically due to COVID-19**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.theglobalfund.org/en/news/2021-03-24-tb-testing-in-2020-dropped-dramatically-due-to-covid-19/>. Acesso em: 28 mar. 2021.

TRAUER, James M *et al.* Risk of Active Tuberculosis in the Five Years Following Infection . . . 15%? **Chest**, United States, v. 149, n. 2, p. 516–525, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2015.11.017>

TURNER, Carolin T *et al.* Blood transcriptional biomarkers for active pulmonary tuberculosis in a high-burden setting: a prospective, observational, diagnostic accuracy study. **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 407–419, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30469-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30469-2)

ULRICH, T; KAUFMANN, S H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. **J Pathol**, [s. l.], v. 208, n. 2, p. 261–269, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/path.1906>

UPLEKAR, Mukund *et al.* WHO's new End TB Strategy. **The Lancet**, [s. l.], v. 385, n. 9979, p. 1799–1801, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60570-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60570-0)

WALLIS, Robert S. *et al.* Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 362–372, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70034-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70034-3)

WALTER, Katharine S *et al.* The escalating tuberculosis crisis in central and South American prisons. **The Lancet**, [s. l.], 2021. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32578-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32578-2)

WALTER, Nicholas D *et al.* Blood Transcriptional Biomarkers for Active Tuberculosis among Patients in the United States: a Case-Control Study with Systematic Cross-Classifer Evaluation. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 274–282, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01990-15>

WEE, YongKiat *et al.* The bioinformatics tools for the genome assembly and analysis based on third-generation sequencing. **Briefings in functional genomics**, England, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bfgp/ely037>

WHITNEY, Adeline R *et al.* Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 1896–1901, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.252784499>

WHO. **BCG vaccine**. [S. l.], 2021a. Disponível em: <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/bcg>. Acesso em: 18 fev. 2021.

WHO. **Global tuberculosis report 2020**. Geneva: World Health Organization, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.

WHO. **High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting.** [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/135617/WHO_HTM_TB_2014.18_eng.pdf?sequence=1.

WHO. **Impact of the COVID-19 pandemic on TB detection and mortality in 2020.** [S. l.], 2021b. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/impact-of-the-covid-19-pandemic-on-tb-detection-and-mortality-in-2020>. Acesso em: 28 mar. 2021.

WHO. **The End TB Strategy.** [S. l.], 2021c. Disponível em: <https://www.who.int/tb/strategy/en/>. Acesso em: 14 jan. 2021.

WHO. **WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 2: screening – systematic screening for tuberculosis disease.** Geneva: [s. n.], 2021d. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340255/9789240022676-eng.pdf>.

YOON, Christina *et al.* Point-of-care C-reactive protein-based tuberculosis screening for people living with HIV: a diagnostic accuracy study. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 1285–1292, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30488-7)

ZAK, Daniel E *et al.* A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10035, p. 2312–2322, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01316-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01316-1)

5 APÊNDICES

5.1 Artigo 1 - Assessment of Validity of a Blood-Based 3-Gene Signature Score for Progression and Diagnosis of Tuberculosis, Disease Severity, and Treatment Response

Jama Network Open (ISSN 2574-3805 – Impact Factor 5.03)

Published: October 26, 2018. doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.3779

Hayley C. Warsinske, PhD; Aditya M. Rao, BA; Flora M. F. Moreira, MSc; Paulo Cesar P. Santos, BS; Andrew B. Liu, MS; Madeleine Scott, BA; Stephaus T. Malherbe, PhD; Katharina Ronacher, PhD; Gerhard Walzl, PhD; Jill Winter, PhD; Timothy E. Sweeney, MD; Julio Croda, PhD, MD; Jason R. Andrews, MD; Purvesh Khatri, PhD

Author Affiliations: Institute for Immunity, Transplantation, and Infection, Stanford University, Stanford, California (Warsinske, Rao, Liu, Scott, Sweeney, Khatri); Center for Biomedical Informatics, Department of Medicine, Stanford University, Stanford, California (Warsinske, Sweeney, Khatri); Stanford Immunology Graduate Program, Stanford University, Stanford, California (Rao); Federal University of Grande Dourados, Dourados, Brazil (Moreira, Santos); Stanford Biophysics Graduate Program, Stanford University, Stanford, California (Scott); South African Medical Research Council Centre for Tuberculosis Research, Division of Molecular Biology and Human Genetics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Stellenbosch University, Cape Town, South Africa (Malherbe, Ronacher, Walzl); Centre of Excellence for Biomedical Tuberculosis Research, Department of Science and Technology-National Research Foundation, Stellenbosch University, Cape Town, South Africa (Malherbe, Ronacher, Walzl, Winter); Catalysis Foundation for Healthy, Emeryville, California (Winter); Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil (Croda); Oswaldo Cruz Foundation, Mato Grosso Sul, Campo Grande, Brazil (Croda); Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Department of Medicine, Stanford University, Stanford, California (Andrews).

Corresponding Author: Purvesh Khatri, PhD, Institute for Immunity, Transplantation, and Infection, Stanford University, 279 Campus Dr, Beckman Center B235A, Stanford, CA 94305 (pkhatri@stanford.edu); Jason R. Andrews, MD, Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Department of Medicine, Stanford University, 300 Pasteur Dr, Ste 134, Stanford, CA 94305 (jandr@stanford.edu).

Abstract

IMPORTANCE The World Health Organization identified the need for a non-sputum-based triage test to identify those in need of further tuberculosis (TB) testing.

OBJECTIVE To determine whether the 3-gene TB score can be a diagnostic tool throughout the course of TB disease, from latency to diagnosis to treatment response, and posttreatment residual inflammation.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS This nested case-control study analyzed the 3-gene TB score in 3 cohorts, each focusing on a different stage of TB disease: (1) the Adolescent Cohort Study profiled whole-blood samples from adolescents with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection, some of which progressed to active TB (ATB), using RNA sequencing; (2) the Brazil Active Screen Study collected whole blood from an actively screened case-control cohort of adult inmates from 2 prisons in Mato Grosso do Sul, Brazil, for ATB from January 2016 to February 2016; and (3) the Catalysis Treatment Response Cohort (CTRC) identified culture-positive adults in primary health care clinics in Cape Town, South Africa, from 2005 to 2007 and collected whole blood for RNA sequencing from patients with ATB at diagnosis and weeks 1, 4, and 24. The CTRC patients also had positron emission tomography-computed tomography scans at diagnosis, week 4, and week 24. Analyses were performed from September 2017 to June 2018.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES A 3-gene messenger RNA expression score, measured by quantitative polymerase chain reaction or RNA sequencing, was evaluated for distinguishing the following: individuals who progressed to ATB from those who did not, individuals with ATB from those without, and individuals with slower treatment response during TB therapy.

RESULTS Patients evaluated in this study included 144 adolescents from the Adolescent Cohort Study (aged 12-18 years; 96 female and 48 male), 81 adult prison inmates from the Brazil Active Screen Study (aged 20-72 years; 81 male), and 138 adult community members from the CTRC (aged 17-64 years; 81 female and 57 male). The 3-gene TB score identified progression from latent *M tuberculosis* infection to ATB 6 months prior to sputum conversion with 86% sensitivity and 84% specificity (area under the curve [AUC], 0.86; 95% CI, 0.77-0.96) and patients with ATB in the Brazil Active Screen Study cohort (AUC, 0.87; 95% CI, 0.78-0.95) and CTRC (AUC, 0.94; 95% CI, 0.88-0.99). It also identified CTRC patients with failed treatment at the end of treatment (AUC, 0.93; 95% CI, 0.83-1.00). Collectively, across

all cohorts, the 3-gene TB score identified patients with ATB with 90% sensitivity, 70% specificity, and 99.3% negative predictive value at 4% prevalence.

CONCLUSIONS AND RELEVANCE Across 3 independent prospective cohorts, the 3-gene TB score approaches the World Health Organization target product profile benchmarks for non-sputum-based triage test with high negative predictive value. This gene expression diagnostic approach should be considered for further validation and future implementation.

Introduction

As part of its End Tuberculosis (TB) 2035 strategy to reduce the prevalence and burden of TB, the World Health Organization (WHO) consensus meeting report of 2014 has asked for a triage test to rule out disease and for systematic screening that can be used by first-contact clinicians to identify patients who need further testing with 90% sensitivity and 70% specificity.¹ A rule-out triage test should have high negative predictive value (NPV) to have high confidence that the individual with a negative test result indeed does not need to be subjected to additional tests.¹ The WHO has also published the target product profile (TPP) for a test anticipating progression from latent *Mycobacterium tuberculosis* infection (LTBI) to active TB (ATB) disease with specificity greater than 75% and sensitivity greater than 75%.² In addition, the Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) and the New Diagnostics Working Group of the Stop TB Partnership have drafted an intervention TPP for a new prognostic test for TB risk³ that proposes a new test would need to increase the positive predictive value (PPV) to at least 5.8%.

There are currently no commercially available tests, to our knowledge, that satisfy these criteria. Solid culture results take weeks to provide a diagnosis and liquid culture grown in the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) still requires 7 to 10 days for a positive diagnosis and 42 days before negativity can be declared. Sputum-smear microscopy is the most commonly used ATB diagnostic, but has only 45% to 61% sensitivity⁴⁻⁷ and cannot detect ATB before patients become infectious. The tuberculin skin test cannot differentiate between ATB and LTBI.^{8,9} Interferon gamma release assay has limited value in anticipating progression from latency to active disease.⁹⁻¹¹ GeneXpert MTB/RIF has improved on previous standards,¹² but is limited by dependence on sputum.

Several host response-based transcriptional signatures have been described for diagnosis of ATB¹³⁻²⁰ and for anticipating progression from latent to active disease.²¹ However, most of these signatures are not suitable for translation to clinical practice because of the following: (1) dependence on a large number of genes inhibiting development of a cost-effective assay,^{13,19,20} (2) lack of extensive validation in diverse and independent cohorts that represent real-world heterogeneity of patients with TB, as well as validation in independent technological platforms that are appropriate for point-of-care diagnostics, (3) confounding by age or coinfection with HIV,^{13,19,20} and (4) lack of specificity for ATB compared with other lung diseases. Further, none of these host response-based signatures have been shown to be associated with the lung pathology during ATB to date.

We previously described a 3-gene signature derived and validated in a multicohort analysis of 2572 whole-blood transcriptome profiles in 14 independent cohorts from 11 countries that addresses many of these challenges.¹⁸ A score derived from this 3-gene signature distinguished patients with ATB from those with other diseases, LTBI, and healthy controls, irrespective of age, HIV coinfection, and prior bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination.¹⁸ Importantly, the 3-gene TB score was identified and retrospectively validated using clinical samples from multiple countries, demonstrating its robustness to differences in genetic background of patients and *M tuberculosis (Mtb)* strains, and using microarrays from 4 manufacturers, showing robustness to different messenger RNA profiling technologies. Across these studies, the 3-gene TB score had 99% NPV at 10% prevalence.

In this article, we prospectively assessed the validity of the 3-gene TB score in 3 independent cohorts for association with progression from LTBI to ATB in the Adolescent Cohort Study (ACS) from South Africa, diagnosis of ATB in the Brazil Active Screen Study (BASS), and association with ATB severity and treatment response in the Catalysis Treatment Response Cohort (CTRC) from South Africa.

Methods

3-Gene TB Score

The 3-gene TB score in microarray and RNA sequencing (RNA-seq) data sets is calculated as¹⁸

$$\text{3-gene TB score} = ([\log(GBP5) + \log(DUSP3)]/2) - \log(KLF2)$$

where $\log(GBP5)$, $\log(DUSP3)$, and $\log(KLF2)$ are normalized \log_2 -transformed mean fluorescence intensity or normalized read count values of *GBP5*, *DUSP3*, and *KLF2*.

For the BASS cohort the 3-gene TB score using quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-qPCR) is defined as

$$\text{3-gene TB score} = ([(\Delta C_t(GBP5) + \Delta C_t(DUSP3)]/2) - \Delta C_t(KLF2))$$

where delta Ct values from RT-qPCR for each gene in each sample are normalized to a housekeeping gene (*POLG1*) and used in the above equation.

The 3-gene TB score was calculated for every sample described in this article and used for all statistical comparisons relevant to that sample.

Cohort Descriptions

The Adolescent Cohort Study

The ACS cohort has been previously described by other groups.^{17,21,22} Briefly, in the ACS, adolescents with LTBI were enrolled in a rural community in Western Cape, South Africa from 2005 to 2007.¹⁷ Whole-blood samples from 153 LTBI adolescents were profiled using RNA-seq. However, phenotypic information was only available for 144 individuals. Therefore, 9 adolescents were excluded from further analysis. Of the 144 individuals, 43 developed ATB during the study (called progressors); the remaining 101 individuals are referred to as nonprogressors. In this cohort, we investigated whether the 3-gene TB score could identify those progressing from LTBI to ATB significantly earlier than the sputum-based diagnosis of ATB (eAppendix in the Supplement). The study protocols were approved by the University of Cape Town Research Ethic Committee Cape Town, South Africa. Written informed consent was obtained from participants. For adolescents, consent was obtained from parents or legal guardians of adolescents and written informed assent from each adolescent.

Brazil Active Screening Study Cohort

The BASS is a nested case-control study that prospectively enrolled inmates from Estabelecimento Penal Jair Ferreira de Carvalho and Dourados State Prison in Campo Grande and Dourados, Brazil, respectively. The study was approved by the research ethics committee at the Federal University of Grande Dourados, National Commission on Ethics in Research (CAAE: 44997115.1.0000.5160), and Stanford University institutional review board. Every patient with ATB identified during the study was notified and underwent treatment. Prisoners provided written informed consent in a private room without involvement of prison staff. Participation decisions were not reported to prison staff unless an individual was diagnosed with TB, in which case the diagnosis was reported, as mandated by Brazilian law, and free treatment was provided. We followed the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) reporting guideline.

Between January 2016 and February 2016, all 3680 inmates aged 18 years or older at these 2 prisons were recruited, of whom 105 declined consent; the remaining 3575 inmates consented to participate and were enrolled. Individuals were not excluded from the study for any potential comorbidities. Participants demographic (eTable 1 in the Supplement) and clinical information was ascertained by a standard questionnaire (eAppendix in the Supplement).

All participants reporting a cough or any other WHO-defined TB symptoms were asked to provide sputum for an assessment of ATB. Two sputum samples were collected, including 1 spot sample after the interview and another the next morning, consistent with the WHO recommendations at the time. Smear microscopy (Ziehl-Neelsen) and solid culture were used to test for *Mtb*. Samples were decontaminated using the Petroff method and culturing was performed using modified Ogawa medium²³⁻²⁵ and maintained for 60 days until it was considered negative. Solid media was used because MGIT was not available at the state TB laboratory where the study was performed. Radiography was not available in the prisons, and a TB case was therefore defined as the presence of at least 1 positive culture test.

In these prisons, previous studies found that 1.5% of inmates had HIV infection^{26,27}; we did not exclude HIV-infected individuals from the study, but happened to have none among the 81 participants. Their demographic (eTable 1 in the Supplement) and clinical information was ascertained by a standard questionnaire, and 2 sputum samples and whole-blood samples in PAXgene RNA tubes were collected.

All ATB cases, defined as a positive sputum culture for *Mtb*, and consecutive controls that were sputum culture negative were included in gene expression analysis on a case to control ratio of 1 to 1.5.

The CTRC Cohort

The CTRC has been previously described by other groups.^{21,22,28} In the CTRC, whole-blood samples from 138 HIV-negative adults (aged 17-67 years), who were enrolled in primary health care clinics in Cape Town, South Africa, were profiled using RNA-seq from diagnosis and prior to treatment initiation until the end of their treatment. These 138 adults include 100 MGIT culture-positive patients with ATB, 21 healthy controls, and 17 patients with other lung diseases (pneumonia or asthma). Patients with ATB received standard care of 2 months (isoniazid, rifampin, pyrazinamide, and ethambutol)/4 months (isoniazid and rifampin)²⁹ treatment following diagnosis. Biometrics were collected for these patients at the time of diagnosis prior to treatment initiation (baseline), 1 week, 4 weeks, and 24 weeks (study-defined end of treatment [EOT] for all patients) (eAppendix in the Supplement). Biometrics collected included, but were not limited to, positron emission tomography–computed tomography (PET-CT) scores, MGIT culture tests, and whole-blood gene expression using RNA-seq. The complete list of biometrics has been previously described.²² The PET-CT images were evaluated in collaboration and consensus with a radiologist, a nuclear physician, and a pulmonologist²² at Stellenbosch University in association with the Tygerburg PET/CT facility. Patient clinical outcomes were not known at the time of reading.

Sputum cultures were performed throughout the course of the study. Patients who completed therapy and had at least the last 2 consecutive sputum cultures at the EOT as negative were considered cured. Seven patients with positive sputum test at the EOT were considered to have failed treatment. Two patients with EOT contaminated sputum cultures were considered unevaluable and were removed from the analysis. Ethical approval was obtained from the Stellenbosch University Human Research Ethics Committee. Written informed consent was obtained from participants.

Outcomes

For the ACS,¹⁷ our primary outcome was diagnosis of ATB, and the secondary outcome was association with progression from latent to active disease.³⁰ Our primary outcome in the BASS was diagnosis of ATB. For the CTRC,^{21,22,28} our primary outcome was correlation between 3-gene TB score and lung pathology measured as Total Glycolytic Activity Index (TGAI). Secondary outcomes for the CTRC included the association of persistent TGAI at the EOT with baseline 3-gene TB score and a hazard ratio of prolonged lung pathology if the baseline 3-gene TB score is above the median 3-gene TB score for patients with ATB.

Statistical Analysis

For each data set we report sensitivity closest to 90% (as specified in the WHO TPP) and the corresponding specificity. Overall sensitivity and specificity values for diagnosis of ATB across the 3 cohorts were calculated by pooling true-positives, false-positives, true-negatives, and false negatives from the 3 data sets. The pooled values were then used to calculate sensitivity and specificity to give total sensitivity and total specificity. We computed PPV and NPV according to the methods described by Altman and Bland,³¹ and estimated according to Bayes theorem,³² assuming 4% prevalence (eAppendix in the Supplement).

Results

We evaluated the performance of the 3-gene TB score in 3 prospective cohorts of patients with ATB (eTable 2 in the Supplement).

Diagnosis of ATB by 3-Gene TB Score 6 Months Prior to Positive Sputum Test in the ACS

Among 144 adolescents with LTBI in the ACS, 43 progressed to ATB (progressors) and the rest remained LTBI (nonprogressors). A linear mixed-effects regression analysis found a significant effect of the interaction between time and progressor status ($P = .006$; **Figure 1A**) but no significant effect of time alone ($P = .17$; Figure 1A).³³ The 3-gene TB score was significantly higher in progressors compared with nonprogressors within 7 days of diagnosis ($P < .001$; Figure 1A). At 89.47% sensitivity, the 3-gene TB score achieved 63.37% specificity and 99.13% NPV at 4% prevalence (area under receiver operator curve [AUROC], 0.86; 95% CI, 0.77-0.96) (**Figure 1B** and **Table**) within 7 days of diagnosis.

Further, the 3-gene TB score was higher in the progressors compared with nonprogressors when using only the samples obtained between 8 days to 180 days prior to positive sputum microscopy ($P < .001$; Figure 1A). At 86% sensitivity, in this time window, it distinguished progressors from nonprogressors with 84% specificity and 98.63% NPV at 4% prevalence (AUROC, 0.86; 95% CI, 0.70-1.00) (Figure 1B and Table). The 3-gene TB score did not distinguish progressors from nonprogressors in samples collected more than 6 months prior (Figure 1).

Active Case Detection of ATB by 3-Gene TB Score in the BASS

For active case detection in the BASS (**Figure 2**), we prospectively recruited all 3680 inmates from Estabelecimento Penal Jair Ferreira de Carvalho and Dourados State Prison in

Campo Grande and Dourados, Brazil, respectively, of whom 3575 inmates (97%) consented to screening. Of 901 (25%) who provided sputum, we found 33 cases of ATB for a point prevalence of 920 per 100 000 prisoners (95% CI, 660-1290). We measured expression of the 3-gene in the TB signature using RT-qPCR in all 33 ATB cases and 48 consecutive controls (Figure 2 and eTable 1 in the Supplement). At 90.91% sensitivity, the 3-gene TB score achieved 68.75% specificity and 99.29% NPV at 4% prevalence for actively screened cases (AUROC, 0.87; 95% CI, 0.79-0.94) (Figure 3).

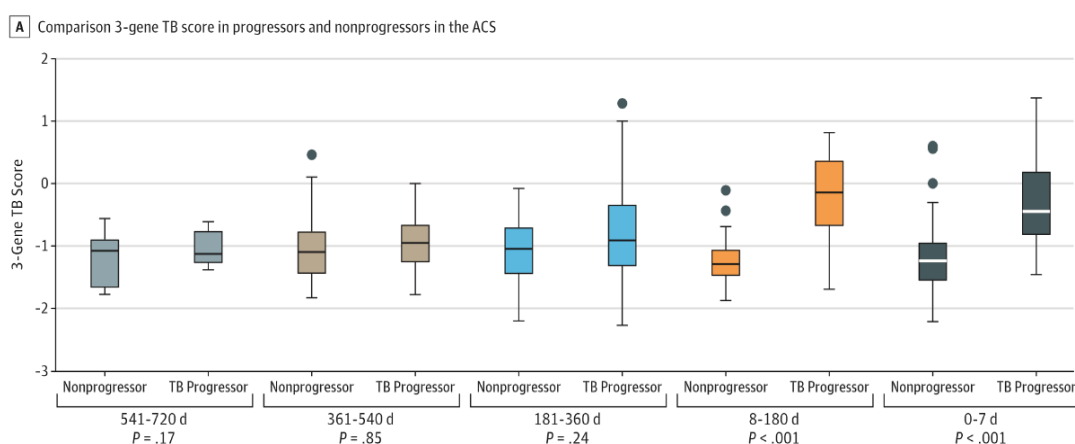
Correlation Between 3-Gene TB Score and Lung Pathology and Treatment Response in the CTRC Cohort

The CTRC profiled 138 HIV-negative individuals (100 patients with ATB, 21 healthy controls, and 17 patients with pneumonia or asthma) using RNA-seq.²²

Of 100 patients with ATB, samples from 2 patients were contaminated and removed from further analysis. Of the remaining 98 patients with ATB, 7 failed treatment.

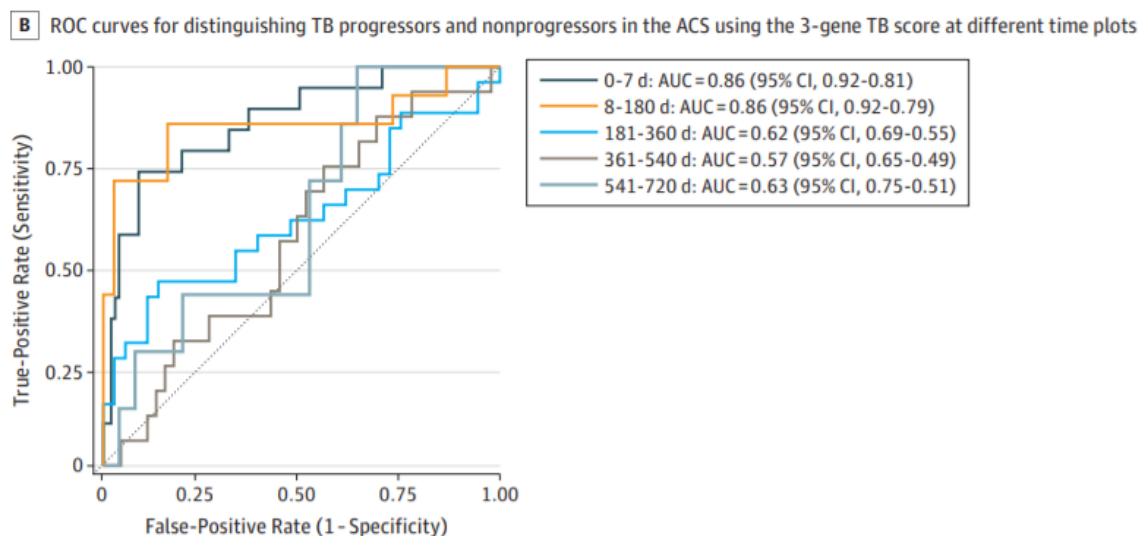
We compared the 3-gene TB score of the patients with ATB with that of healthy controls and patients with other lung diseases at the time of diagnosis. At 90.11% sensitivity, the 3-gene TB score achieved 89.19% specificity and 99.42% NPV at 4% prevalence for distinguishing patients with ATB from healthy controls and patients with other lung diseases (AUROC, 0.94; 95% CI, 0.88-0.99) (eFigure 1 in the Supplement). Further, the 3-gene TB score of the patients with ATB at the EOT (day 168) also distinguished patients who had failed treatment (AUROC, 0.93; 95% CI, 0.83-1.00) (eFigure 1 in the Supplement).

Figure 1. Association of the 3-Gene TB Score With Progression From Latent to Active Disease 6 Months Prior to Sputum Conversion in the ACS



A, Box plots comparing the distributions of 3-gene tuberculosis (TB) scores between progressors and nonprogressors collected at 720 to 541, 540 to 361, 360 to 181, 180 to 8, and 7 to 0 days prior to sputum conversion. The horizontal line in the middle of each box indicates the median, while the bottom and top borders of the box

represent the first and third quartile, respectively. The whiskers above and below represent the range of values. Circles indicate outliers.



B, Receiver operating characteristics (ROC) curves for distinguishing progressors and nonprogressors prior to sputum conversion at different intervals. ACS indicates Adolescent Cohort Study; AUC, area under the curve.

Table. Sensitivity, Specificity, and NPV of 3-Gene Tuberculosis Score as a Triage Test for Active Tuberculosis and a Test for Progression From Latent *Mycobacterium Tuberculosis* Infection to Active Tuberculosis

Cohort	%			
	Sensitivity	Specificity	NPV at 4% Prevalence	AUROC (95% CI)
WHO test name				
Triage test				
BASS	90.91	68.75	99.29	0.87 (0.79-0.94)
ACS, 0-7 d	89.47	63.37	99.13	0.86 (0.77-0.96)
CTRC	90.11	89.19	99.42	0.94 (0.88-0.99)
Overall	90	70	99.3	
Progression test				
ACS, 8-180 d	86	84	98.63	0.86 (0.70-1.00)

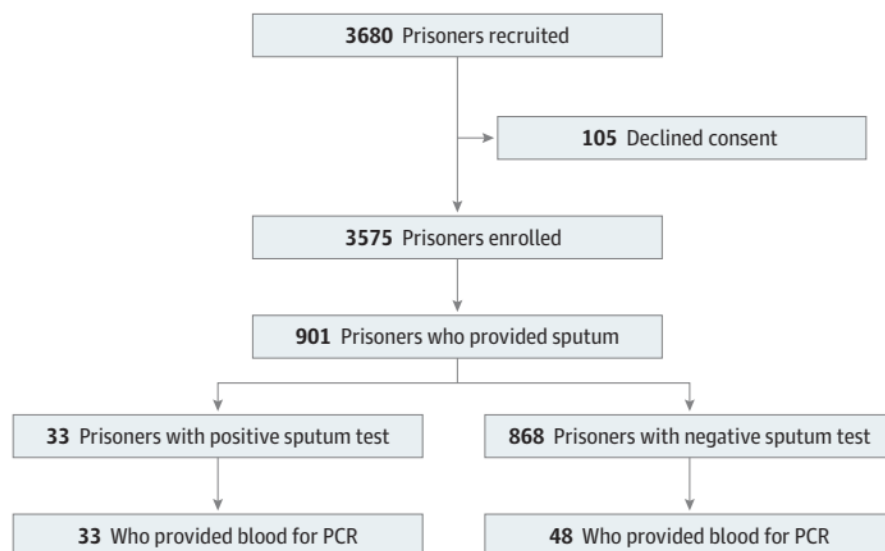
Abbreviations: ACS, Adolescent Cohort Study; AUROC, area under receiver operating characteristic curve; BASS, Brazil Active Screen Study; CTRC, Catalysis Treatment Response Cohort; NPV, negative predictive value; WHO, World Health Organization.

The 3-gene TB score at diagnosis significantly correlated with lung pathology at diagnosis in patients with ATB as measured by TGAI using PET-CT ($r = 0.54$; $P < .001$) (**Figure 4A**). The 3-gene TB score at EOT also had a significant correlation with TGAI at EOT ($r = 0.41$; $P < .001$) (**Figure 4B**).

It has been previously reported that the presence of *Mtb* messenger RNA with nonresolving and intensifying lesions on PET-CT images indicated that many apparently cured patients may have subclinical ATB. A substantial proportion of patients with ATB in the CTRC

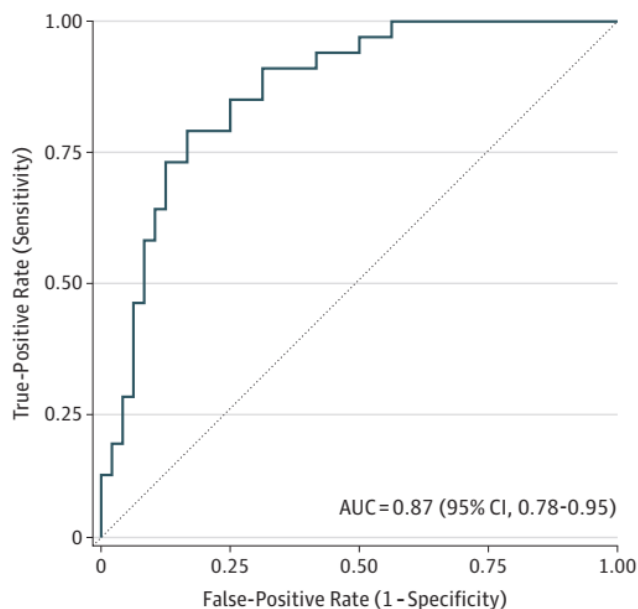
showed PET-CT imaging response that was consistent with ATB after a 6-month treatment and 1-year follow-up.^{15,21} These patients were positive for *Mtb* RNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples and included those with a durable cure and those who later developed recurrent disease. We defined the patients with ATB in the CTRC with a TGAI score of 400 or less at 6 months as radiologically clear, and those with a TGAI score higher than 400 at 6 months as having radiologically persistent lung inflammation. The 3-gene TB score at the time of diagnosis was significantly lower in the radiologically clear patients than those with persistent lung inflammation after 6 months of treatment ($P < .001$) (Figure 4C). Further, the 3-gene TB score at EOT continued to be higher in those with persistent lung inflammation compared with those who were radiologically clear at EOT (eFigure 2 in the Supplement).

Figure 2. Flowchart of the Screening Process in the Brazil Active Screen Study Cohort for the Detection of Active Tuberculosis



*PCR indicates polymerase chain reaction

Figure 3. Diagnosis of Patients With Active Tuberculosis With High Accuracy in Active Screening in the Brazil Active Screen Study Cohort

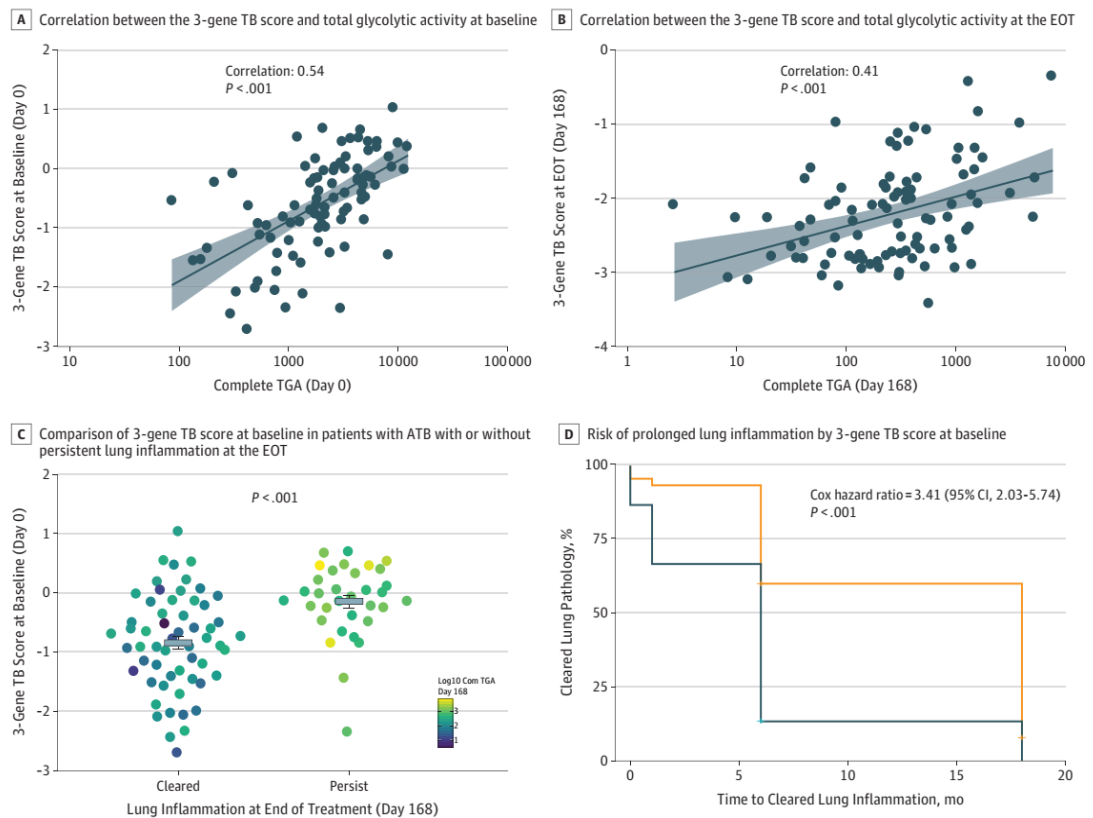


Solid line indicates receiver operating characteristic curve distinguishing patients with active tuberculosis from patients without tuberculosis in the Brazil Active Screen Study cohort. AUC indicates area under the curve.

Subsequently, we divided the patients with ATB in the CTSC cohort in 2 equal groups using the median of the 3-gene TB score at the time of diagnosis. We chose median instead of mean as it is robust to outliers. Patients with ATB with 3-gene TB score above the median had significantly higher likelihood of prolonged lung pathology as measured by PET-CT (hazard ratio, 3.41; 95% CI, 2.03-5.74; $P < .001$) (Figure 4D).

Collectively, across these 3 cohorts the 3-gene TB score had 99.3% NPV at 4% prevalence (eFigure 3 in the Supplement) and 70% specificity at 90% sensitivity for diagnosis of ATB (Table), meeting the WHO TPP for the non-sputum-based triage test. Further, the 3-gene TB score also identified individuals with LTBI that progressed to ATB 6 months prior and satisfied the WHO TPP for anticipating progression from LTBI to ATB with 18.3% PPV at 4% prevalence. Finally, the 3-gene TB score at the time of diagnosis was correlated with ongoing inflammation in lungs of patients with ATB as measured by PET-CT and was associated with patients who have persistent lung inflammation after the EOT.

Figure 4. Correlation of the 3-Gene TB Score at Baseline With Severity of Lung Pathology and Treatment Response in the Catalysis Treatment Response Cohort



A, The 3-gene tuberculosis (TB) score at baseline (prior to treatment initiation) in patients with active TB (ATB) correlated with total glycolytic ratio activity (TGA) at baseline. Each dot indicates a patient. Black line indicates linear regression. Shaded region indicates 95% CI. B, The 3-gene TB score at day 168 (end of treatment [EOT]) in patients with ATB correlated with day 168 TGA. Each dot indicates a patient. Black line indicates linear regression. Shaded region indicates 95% CI. C, The 3-gene TB score at baseline for patients with clear radiology by 6 months (mean, -0.84 ; 95% CI, -0.73 to -0.95) was significantly lower than those with persistent lung inflammation (mean, -0.16 ; 95% CI, -0.05 to -0.27). Each dot represents a patient. Color scale reflects \log_{10} day 168 Total Glycolytic Activity Index score. D, Patients with ATB with 3-gene TB scores above the median had significantly higher likelihood of prolonged lung pathology as measured by positron emission tomography-computed tomography.

Discussion

We previously identified a blood-based 3-gene TB score that distinguishes patients with ATB from healthy controls and those with LTBI and other diseases independent of age, HIV coinfection, and prior BCG vaccination.¹⁸ The 3-gene TB score accurately diagnosed patients with ATB among heterogeneous populations in both active (BASS) and passive (ACS and CTRC) case findings. The score was significantly associated with the progression of individuals from LTBI to ATB 6 months prior to positive sputum test results. Finally, the 3-gene TB score at baseline correlated with the severity of lung inflammation in patients with ATB. The patients

with a higher 3-gene TB score at the time of diagnosis had persistent lung inflammation at the EOT.

The 3-gene TB score satisfied the WHO TPP for a non-sputum-based triage test,⁷ demonstrating its potential for systemic screening to identify those who should be tested further for confirming diagnosis of ATB. In addition, the 3-gene TB score also satisfied the WHO TPP for a test anticipating progression from LTBI to ATB criteria² with 18.3% PPV at 4% prevalence in the ACS cohort for identifying those with LTBI who will progress to ATB up to 6 months prior. The PPV of the 3-gene TB score to anticipate progression to ATB is more than 3-fold higher than required according to the FIND intervention TPP.

There is an unmet need for noninvasive or minimally invasive biomarkers that can be used in clinical trials and during treatment for ATB as a proxy of lung pathology. To our knowledge, the 3-gene TB score is the first example of applying a TB signature to PET-CT data from an independent study that had not been trained on PET-CT. The studies further observed that the 3-gene TB score at the time of diagnosis was significantly associated with 6-month radiological outcome. Patients with a 3-gene TB score higher than the median at time of diagnosis were 3 times more likely to have persistent lung inflammation.

The 3-gene TB score measured at the EOT was higher in those with ongoing lung inflammation, and accurately identified those who failed treatment as defined by a positive culture at the EOT. These results indicate that the 3-gene TB score may be useful in measuring lung pathology and monitoring treatment response because patients often cannot generate sputum after 6 months of treatment and can be easily lost to follow-up when culture results take 40 to 60 days to declare negativity.

Since its publication in 2016,¹⁸ the 3-gene TB score is now shown to distinguish patients with ATB from those with LTBI, other diseases, and healthy controls in 19 independent cohorts consisting of over 3000 individuals from 14 countries across all age groups (children, adolescents, and adults) with or without HIV coinfection. To our knowledge, the 3-gene TB score is the first signature demonstrated to work in an active screen study, and to demonstrate that peripheral immune response can be a reasonable proxy for ongoing lung pathology during ATB. Collectively, these results show a substantial potential for the 3-gene TB score to monitor an individual with a latent *Mtb* infection through progression to and diagnosis of ATB and evaluate response to treatment.

Limitations

There are several limitations of our analysis.

First, the optimal threshold for diagnosis is platform dependent (eg, microarray, RNA-seq, and RT-qPCR). Two different technologies were used (RNA-seq and RT-qPCR) across 3 different cohorts. Because there is not yet a commercially available version of the test, we do not have a universal 3-gene TB score threshold for diagnosing ATB at the time. Such a threshold can only be determined once the 3-gene TB score is ported to a point-of-care device. Instead, we chose to report specificity corresponding with 90% sensitivity in each cohort with regard to the WHO TPP for a non-sputum-based triage test.

Second, in the BASS, use of solid media instead of liquid culture and lack of radiography would arguably misclassify a number of patients. However, such a misclassification would likely bias performance of the 3-gene TB score toward the null hypothesis, leading to underestimate of its specificity.

Third, only 7 of the individuals in the CTTC had failed treatment. Hence, further validation is required to better understand how closely the 3-gene TB score tracks with response to treatment.

Fourth, the 3-gene TB score reliably identified progressors only up to 6 months prior to diagnosis, but not in samples beyond 6 months prior to diagnosis. It is currently not possible to say how long it takes for an individual with LTBI to progress to ATB.

Fifth, arguably the correlation between the 3-gene TB score and TGAI measured in PET-CT was moderate. However, the 3-gene TB score at baseline also correlated with persistent PET-CT activity at the EOT, identifying patients with ATB who have subclinical TB. Therefore, although the 3-gene TB score moderately correlated with lung pathology, it provides additional clinically useful information that no other biomarker to date provides.

Sixth, the 3-gene TB score satisfied the WHO TPP for a non-sputum-based triage test when we pooled results across the 3 cohorts. However, at 90% sensitivity there was a large variation in the specificity across the 3 cohorts. Hence, an active screen study with larger sample size is required to better estimate specificity. Despite these limitations, the results of our analyses are consistent with previously published results in more than 3000 samples.

Conclusions

Across 3 independent cohorts in different clinical settings, the 3-gene TB score closely matches the WHO TPP benchmarks for a non-sputum-based triage test at high NPV. The 3-gene TB score is associated with disease progression, performs well in active case finding, and tracks with treatment response and lung pathology. These performance characteristics make it

a potential test for ruling out ATB and a strong candidate for monitoring the status of an individual over the course of infection, disease, and treatment.

Author Contributions: Drs Warsinske and Khatri had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Drs Andrews and Khatri were co–senior authors.

Concept and design: Warsinske, Sweeney, Croda, Andrews, Khatri.

Acquisition, analysis, or interpretation of data: Warsinske, Rao, Moreira, Santos, Liu, Scott, Malherbe, Ronacher, Walzl, Winter, Croda, Andrews, Khatri.

Drafting of the manuscript: Warsinske, Rao, Liu, Malherbe, Winter, Andrews, Khatri.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Warsinske, Moreira, Santos, Scott, Malherbe, Ronacher, Walzl, Winter, Sweeney, Croda, Andrews, Khatri.

Statistical analysis: Warsinske, Rao, Liu, Scott, Khatri.

Obtained funding: Andrews, Khatri.

Administrative, technical, or material support: Moreira, Santos, Malherbe, Ronacher, Walzl, Sweeney, Croda, Andrews, Khatri.

Supervision: Andrews, Khatri.

Conflict of Interest Disclosures: Drs Khatri and Sweeney are cofounders of Inflammatrix, Inc. Dr Khatri is a scientific advisor for Inflammatrix, Inc and Dr Sweeney is an employee. Drs Khatri and Sweeney are coinventors on the 3-gene TB score pending patent owned by Stanford University, which has been licensed for commercialization. Dr Malherbe reported receiving grants from the South African Medical Research Council during the conduct of the study and grants from the European and Developing Countries Clinical Trials Partnership outside the submitted work. Dr Walzl reported receiving grants from the Bill and Melinda Gates Foundation during the conduct of the study; in addition, Dr Walzl has a patent to the United Kingdom patent office pending that is not related to the 3-gene TB signature. Dr Winter reported receiving grants from the Bill and Melinda Gates Foundation during the conduct of the study and outside the submitted work. Dr Sweeney is an employee and stockholder for Inflammatrix, Inc; in addition, Dr Sweeney had a patent to methods of tuberculosis diagnosis pending and licensed. Dr Andrews reported receiving grants from the National Institutes of Health, grants from the Bill and Melinda Gates Foundation, and grants from the Stanford Center for Clinical and Translational Education during the conduct of the study. Dr Khatri reported receiving grants from the Bill and Melinda Gates Foundation, personal fees from Vir Bio and grants from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of

Health during the conduct of the study; and personal fees from Vir Bio and Inflammix, Inc outside the submitted work; in addition, Dr Khatri had a patent to methods for diagnosis of tuberculosis pending and with royalties paid. No other disclosures were reported.

Funding/Support: This work was supported in part by the Bill and Melinda Gates Foundation, Vir Bio, and grants RO1 AI125197-01, U19AI109662, and U19AI057229 from the National Institute for Allergy and Infectious Diseases to Dr Khatri; Clinical and Translational Science Award UL1 RR025744 for the Stanford Center for Clinical and Translational Education and Research (Spectrum) to Drs Khatri and Andrews; grant R01 AI130058 from the National Institutes of Health to Drs Andrews and Croda; and training grant 5 T32 AI07290-31 from the National Institutes of Health to Dr Warsinske.

Role of the Funder/Sponsor: The funders had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

Additional Contributions: Dr. Malherbe performed the positron emission tomography–computed tomography and Dr. Croda supervised sample collection and processing of the Brazil Active Screening Study Cohort.

REFERENCES

1. World Health Organization. *High-Priority Target Product Profiles for New Tuberculosis Diagnostics: Report of a Consensus Meeting*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014.
2. World Health Organization. *Consensus Meeting Report: Development of a Target Product Profile (TPP) and a Framework for Evaluation for a Test for Predicting Progression From Tuberculosis Infection to Active Disease*.
Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2017.
3. Seshadri P, Denkinger C. Draft target product profile: test for progression of tuberculosis infection. <http://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/05/TPP-LTBIprogression.pdf>. Accessed September 10, 2018.
4. Kirwan DE, Gilman RH. Same-day diagnosis and treatment of tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(2): 102-104. doi:10.1016/S1473-3099(12)70270-0
5. Davis JL, Cattamanchi A, Cuevas LE, Hopewell PC, Steingart KR. Diagnostic accuracy of same-day microscopy versus standard microscopy for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(2):147-154. doi:10.1016/S1473-3099(12)70232-3
6. Cattamanchi A, Dowdy DW, Davis JL, et al. Sensitivity of direct versus concentrated sputum smear microscopy in HIV-infected patients suspected of having pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2009;9:53. doi:10.1186/1471-2334-9-53
7. World Health Organization. *Systematic Screening for Active Tuberculosis Principles and Recommendations*.
Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2013.
8. World Health Organization. *Use of Tuberculosis Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs) in Low- and Middle Income Countries*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
9. Kik SV, Franken WP, Mensen M, et al. Predictive value for progression to tuberculosis by IGRA and TST in immigrant contacts. *Eur Respir J*. 2010;35(6):1346-1353. doi:10.1183/09031936.00098509
10. Andrews JR, Nemes E, Tameris M, et al. Serial QuantiFERON testing and tuberculosis disease risk among young children: an observational cohort study. *Lancet Respir Med*. 2017;5(4):282-290. doi:10.1016/S2213-2600(17)30060-7

11. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Predictive value of interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis. *Chest*. 2012;142(1):63-75. doi:10.1378/ chest.11-3157
12. Lawn SD, Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol*. 2011;6(9):1067-1082. doi:10.2217/fmb.11.84
13. Berry MP, Graham CM, McNab FW, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*. 2010;466(7309):973-977. doi:10.1038/nature09247
14. Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, et al. Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by mycobacterium tuberculosis. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(6):613-621. doi:10.1007/s00109-0070157-6
15. Kaforou M, Wright VJ, Oni T, et al. Detection of tuberculosis in HIV-infected and -uninfected African adults using whole blood RNA expression signatures: a case-control study. *PLoS Med*. 2013;10(10):e1001538. doi:10.1371/ journal.pmed.1001538
16. Sambarey A, Devaprasad A, Mohan A, et al. Unbiased identification of blood-based biomarkers for pulmonary tuberculosis by modeling and mining molecular interaction networks. *EBioMedicine*. 2017;15:112-126. doi:10.1016/j. ebiom.2016.12.009
17. Zak DE, Penn-Nicholson A, Scriba TJ, et al; ACS and GC6-74 cohort study groups. A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. *Lancet*. 2016;387(10035):2312-2322. doi:10.1016/S01406736(15)01316-1
18. Sweeney TE, Braviak L, Tato CM, Khatri P. Genome-wide expression for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a multicohort analysis. *Lancet Respir Med*. 2016;4(3):213-224. doi:10.1016/S2213-2600(16)00048-5
19. Anderson ST, Kaforou M, Brent AJ, et al. Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. *N Engl J Med*. 2014;370(18):1712-1723. doi:10.1056/NEJMoa1303657
20. Bloom CI, Graham CM, Berry MP, et al. Transcriptional blood signatures distinguish pulmonary tuberculosis, pulmonary sarcoidosis, pneumonias and lung cancers. *PLoS One*. 2013;8(8):e70630. doi:10.1371/journal.pone. 0070630
21. Thompson EG, Du Y, Malherbe ST, et al; Catalysis TB–Biomarker Consortium. Host blood RNA signatures predict the outcome of tuberculosis treatment. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017;107:48-58. doi:10.1016/j.tube.2017.08.004

22. Malherbe ST, Shenai S, Ronacher K, et al; Catalysis TB–Biomarker Consortium. Persisting positron emission tomography lesion activity and Mycobacterium tuberculosis mRNA after tuberculosis cure. *Nat Med*. 2016;22(10): 1094-1100. doi:10.1038/nm.4177
23. Kudoh S, Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull World Health Organ*. 1974;51(1):71-82.
24. Cadmus SI, Falodun OI, Fagade OE. Methods of sputum decontamination with emphasis on local tuberculosis laboratories. *Afr J Med Med Sci*. 2011;40(1):5-14.
25. David H, Lévy-Frébault V, Thorel M-F. *Méthodes de Laboratoire Pour Mycobactériologie Clinique*. Paris, France:Institut Pasteur; 1989.
26. Carbone AdaS, Paião DS, Sgarbi RV, et al. Active and latent tuberculosis in Brazilian correctional facilities: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2015;15:24. doi:10.1186/s12879-015-0764-8
27. Sgarbi RV, Carbone AdaS, Paião DS, et al. A cross-sectional survey of HIV testing and prevalence in twelve Brazilian correctional facilities. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139487. doi:10.1371/journal.pone.0139487
28. Shenai S, Ronacher K, Malherbe S, et al. Bacterial loads measured by the Xpert MTB/RIF assay as markers of culture conversion and bacteriological cure in pulmonary TB. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160062. doi:10.1371/journal.pone.0160062
29. World Health Organization. *Treatment of Tuberculosis: Guidelines*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.
30. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [software]. Vienna, Austria: The R Project; 2016.
31. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 2: predictive values. *BMJ*. 1994;309(6947):102. doi:10.1136/bmj.309.6947.102
32. Bayes M, Price M. An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. *Philos Trans R Soc Lond*. 1763;53:370-418. doi:10.1098/rstl.1763.0053
33. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using {lme4}. *J Stat Softw*. 2015;67. doi:10.18637/jss.v067.i01

5.2 Artigo 2 - Blood-based host biomarker diagnostics in active case finding for pulmonary tuberculosis: a diagnostic case-control study

EClinicalMedicine (ISSN 2589-5370 – Impact Factor 3.49)

Published: March 06, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100776>

Flora Martinez Figueira Moreira^a, Renu Verma^b, Paulo Cesar Pereira dos Santos^a, Alessandra Leite^a, Andrea da Silva Santos^a, Rafaele Carla Pivetta de Araujo^a, Bruna Oliveira da Silva^a, Júlio Henrique Ferreira de Sá Queiroz^a, David H. Persing^c, Erik Södersten^d, Devasena Gnanashanmugam^c, Purvesh Khatri^e, Julio Croda^{f,g,h,1}, Jason R. Andrew^{b,1,*}

Author Affiliations:

^a *Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil*

^b *Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA*

^c *Cepheid, Sunnyvale, CA, USA*

^d *Cepheid AB, Solna, Sweden*

^e *Institute for Immunity, Transplantation and Infection, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA*

^f *Oswaldo Cruz Foundation, Campo Grande, MS, Brazil*

^g *School of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil*

^h *Yale School of Public Health, New Haven, CT, USA*

Corresponding Author: Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Stanford University School of Medicine, Biomedical Innovations Building, Rm 3458, 240 Pasteur Dr., Stanford, CA 94305, USA. E-mail address: jandr@stanford.edu (J.R. Andrews). ¹ Contributed equally.

Instructions for Authors: <https://www.thelancet.com/pb-assets/Lancet/authors/ecm-info-for-authors.pdf>

Abstract

Background: There is a need to identify scalable tuberculosis screening strategies among high burden populations. The WHO has identified a non-sputum-based triage test as a development priority.

Methods: We performed a diagnostic case-control study of point-of-care C-reactive protein (CRP) and Prototype-Xpert-MTB-Host-Response (Xpert-MTB-HR) assays in the context of a mass screening program for tuberculosis in two prisons in Brazil. All incarcerated individuals irrespective of symptoms were screened by sputum Xpert MTB/RIF and sputum culture. Among consecutive, Xpert MTB/RIF or culture-confirmed cases and Xpert MTB/RIF and culture-negative controls, CRP was quantified in serum by a point-of-care assay (iChroma-II) and a 3-gene expression score was quantified from whole blood using the Xpert-MTB-HR cartridge. We evaluated receiver operating characteristic area under the curve (AUC) and assessed specificity at 90% sensitivity and sensitivity at 70% specificity, consistent with WHO target product profile (TPP) benchmarks.

Findings: Two hundred controls (no TB) and 100 culture- or Xpert MTB/RIF-positive tuberculosis cases were included. Half of tuberculosis cases and 11% of controls reported any tuberculosis symptoms. AUC for CRP was 0.79 (95% CI: 0.73-0.84) and for Xpert-MTB-HR was 0.84 (95% CI: 0.79-0.89). At 90% sensitivity, Xpert-MTB-HR had significantly higher specificity (53.0%, 95% CI: 45.0-69.0%) than CRP (28.1%, 95% CI: 20.2-41.8%) ($p=0.003$), both well below the TPP benchmark of 70%. Among individuals with medium or high sputum Xpert MTB/RIF semi-quantitative load, sensitivity (at 70% specificity) of CRP (90.3%, 95% CI: 74.2-98.0) and Xpert-MTB-HR (96.8%, 95% CI: 83.3-99.9%) was higher.

Interpretation: For active case finding in this high tuberculosis-burden setting, CRP and Xpert-MTB-HR did not meet TPP benchmarks for a triage test. However, Xpert-MTB-HR was highly sensitive in detecting individuals with medium or high sputum bacillary burden.

Funding: National Institutes of Health (R01 AI130058 and R01 AI149620) and Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-404182/2019-4).

Keywords: tuberculosis; diagnostic; host response; biomarker; triage; active case finding

Research in context

Evidence before this study

We searched PubMed through December 13, 2020, using the terms “tuberculosis” and “blood” and any of the following terms: “gene expression” or “transcriptomic” or “proteomic” or “C-reactive protein”, without restricting by language or date. Multiple studies have investigated blood-based gene expression signatures and protein biomarkers for identifying individuals with active tuberculosis. Several studies have investigated point-of-care C-reactive protein (CRP) for tuberculosis screening in HIV-infected individuals, but none have investigated its use for active case finding in HIV-negative individuals. One recent study reported on performance of a cartridge-based rapid 3-gene expression signature for tuberculosis screening among symptomatic, HIV-infected individuals. We did not identify any studies that reported rapid gene expression diagnostics for active case finding or in HIV-uninfected populations.

Added value of this study

We investigated the accuracy of blood-based screening using a point-of-care CRP assay and cartridge-based rapid 3-gene expression prototype test (Xpert-MTB-HR) for mass screening for tuberculosis in two prisons in Brazil, which have a high prevalence of tuberculosis. We screened all incarcerated individuals in each prison, irrespective of symptoms, and identified 100 consecutive microbiologically confirmed tuberculosis cases (only half of whom had any tuberculosis symptoms) and 200 tuberculosis controls, in whom we compared performance of CRP and Xpert-MTB-HR. We found that Xpert-MTB-HR outperformed CRP, but neither met the World Health Organization’s target product profile benchmarks for accuracy (70% specificity at 90% sensitivity). Among individuals with higher sputum *M. tuberculosis* load, sensitivity was very high (97%) for Xpert-MTB-HR at 70% specificity.

Implications of all the available evidence

For active case finding for tuberculosis in settings with low HIV prevalence, point-of-care C-reactive protein and Xpert-MTB-HR did not achieve previously defined accuracy benchmarks for triage diagnostics. Xpert-MTB-HR was sensitive for cases with higher sputum *M. tuberculosis* load, suggesting it might have utility in identifying individuals with greater transmission potential in this setting.

1. Introduction

Despite advances in its diagnosis and treatment, tuberculosis (TB) is still the leading cause of death among infectious diseases worldwide. It is estimated that 10 million people developed the disease and 1.4 million died from the infection in 2019.¹ Delays in diagnosis of active TB contribute to ongoing transmission of infection and hinder the reduction of disease burden. The World Health Organization's "End TB Strategy" proposed a set of actions to reduce the global incidence of TB by 2035, among which are the development of new efficient clinical tools for a fast and accurate diagnosis and systematic screening in high-risk groups to contribute to early detection of the diseases.²⁻⁴

Timely detection and treatment of cases are central elements in the control of TB transmission. This is particularly critical in high TB risk environments, such as prisons. Globally, prisons consistently harbor a very high burden of TB, with rates that are often >30 times higher than those of local non-incarcerated communities.⁵ Overcrowding, insufficient sanitation, poor ventilation and inadequate health care in prisons facilitate the spread and persistence of TB and other infectious diseases in these environments. In Central and South America, TB notifications in prisons have increased by 269% since 2000, driven primarily by growth in the size of the incarcerated population.⁶ Recent studies in Brazil have demonstrated that the prevalence of active TB among incarcerated individuals exceeds 3- 900 cases per 100,000 persons, among the highest reported in the world.⁸ There is an urgent need for more effective strategies for early case detection among high TB burden populations.

One of the major obstacles to early TB diagnosis is that most approaches depend upon testing of sputum, which individuals with less advanced disease may not consistently produce. In response to this challenge, the WHO has endorsed a target product profile (TPP) for a non-sputum based triage test that achieves high sensitivity in screening for active TB.³ There has been considerable effort undertaken to develop and validate blood-based biomarkers for TB, many focusing upon host immune response markers, including metabolomic, proteomic and transcriptomic signatures of disease.⁹ Sweeney and colleagues found that a score based on three differentially expressed genes (*GBP5* [Guanylate Binding Protein 5], *DUSP3* [Dual Specificity Protein Phosphatase 3] and *KLF2* [Kruppel-like factor 2]) had high accuracy as a screening test for active TB across multiple published cohorts.¹⁰ This signature was subsequently validated for diagnosis of TB and prediction of progression from infection to disease in independent cohorts.¹¹

Based on these findings, Cepheid (Sunnyvale, CA, EUA) developed a cartridge-based RT-PCR prototype assay (Xpert-MTB-HR) for use on the GeneXpert platform that quantifies the relative mRNA levels of these 3-gene in a whole blood sample. A recent study demonstrated its potential in triage and diagnosis of active TB among people living with HIV and presenting to healthcare facilities with TB symptoms.¹² Whether this assay would perform well for active case finding, in which individuals are proactively screened for tuberculosis irrespective of symptoms, in a low HIV prevalence setting is unknown. To address this knowledge gap, we performed a diagnostic case-control study nested within a prospective active TB case finding study in prisons, evaluating the accuracy of a blood based 3-gene signature assay as potential in triage and diagnosis of active TB.

2. Methods

This nested diagnostic case-control study was part of larger prospective mass TB screening study conducted in two male prisons (Estabelecimento Penal Jair Ferreira de Carvalho [EPJFC] and Penitenciaria Estadual de Dourados [PED] in Mato Grosso do Sul, Brazil.⁸ Between April 2018 and May 2020, we recruited all incarcerated individuals ages ≥ 18 years at both study prisons for TB screening irrespective of symptoms. After obtaining informed consent, we administered a standardized questionnaire to collect demographic and clinical information, including TB related symptoms as defined by WHO guidelines.¹³ The selection criteria for this study were the collection one spot sputum sample at enrollment and availability of a whole-blood sample. For this nested case-control study, we included consecutive participants who met case and control definitions (as described below) and had serum and PAXgene-preserved whole blood available. We did not exclude individuals with HIV or prior tuberculosis. Cases and controls were selected based on meeting outcome definitions and prior to performing the diagnostic assays under investigation in this study.

2.2 Laboratory procedures

All participants were instructed to produce a sputum sample with a target volume of at least 2 mL. Sputum samples were tested at study entry by Xpert[®] MTB/RIF G4 (prior to January 2020) or Xpert[®] MTB/RIF Ultra (after January 2020; Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) along with culture on Ogawa-Kudoh media. *M. tuberculosis* was confirmed from culture growth by an immunochromatographic assay (TB Ag MPT64 Rapid Test, Standard Diagnostics, Seoul, South Korea). Upon diagnosis of a case by positive sputum Xpert MTB/RIF or culture, we collected venous blood samples in PAXgene[®] Blood RNA tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) to preserve RNA and in BD Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) to obtain serum. We similarly collected blood from consecutive, Xpert MTB/RIF-negative participants as potential controls and performed QuantiFERON-TB Gold Plus assays (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. We stopped control recruitment upon identifying 200 Xpert MTB/RIF negative individuals with valid QuantiFERON results. PAXgene Blood RNA tubes and serum samples were all collected within 14 days of first sputum sample collection (92% on same day) and were preserved in temperature-controlled freezers at -80°C from collection until testing. C-reactive protein (CRP) concentrations were measured on serum samples with a point-of-care assay (iChroma[™] II, Boditech, South Korea), which has a dynamic range of 2.5-300 mg/L. The prototype cartridge-based RT-PCR assay (Xpert-MTB-HR) was performed using 380 μL of PAXgene-preserved

whole blood. The aliquot was centrifuged, supernatant decanted, and pellet was resuspended in a lysis buffer and vortexed before transfer to the Xpert-MTB-HR cartridge. The samples then were analyzed on a GeneXpert machine, which generates a TB-score calculated from cycle threshold values for the 3-genes according to the formula developed by Sweeney and colleagues.¹¹ When using PCR-based measurement technology, lower scores by this method have been associated with TB disease. Sample preparation time was 15 min and GeneXpert run time was 50 min. All participants were administered a rapid HIV test and evaluated through a nursing and medical examination.

2.3 Outcome Definitions

We followed national Brazilian guidelines and WHO definitions for TB diagnosis. We defined a microbiologically confirmed TB case as any individual with a positive sputum Xpert MTB/RIF or sputum culture. Non-microbiologically confirmed (clinically defined) TB cases were not available for inclusion in this study. Controls were defined as individuals with negative sputum Xpert MTB/RIF and culture, who were clinically evaluated and not believed to have active TB disease. All controls had been previously screened within the past year and had a chest x-ray score by CAD4TB < 60. Additionally, we searched the state Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) data, in which all tuberculosis cases are reported, for six months following enrollment to determine whether any of the control participants were subsequently diagnosed with TB. QFT-Plus results were interpreted as positive when IFN- γ concentration minus nil in the *M. tuberculosis* (*Mtb*) antigen tube was ≥ 0.35 IU/mL as defined by the manufacturer.

2.4 Statistical analysis

We compared Xpert-MTB-HR scores and serum CRP concentrations between microbiologically confirmed TB cases and controls, using Wilcoxon sign rank tests for paired samples. We evaluated the linear correlation between Xpert-MTB-HR and CRP concentrations among cases and controls. For CRP in linear analyses, values less than 2.5 mg/L (the lower limit of the reporting range) were set as 2.5 mg/L. We also compared Xpert-MTB-HR scores and serum CRP concentrations among cases with controls stratified by QFT-Plus positivity status. We calculated the receiver operating characteristic (ROC) area under the curve (AUC) comparing TB cases and controls for Xpert-MTB-HR and CRP. We compared AUC using DeLong's test. To evaluate performance at WHO benchmarks, we calculated specificity at 90% sensitivity, and sensitivity at 70% specificity, along with 95% confidence intervals. We further investigated the sensitivity according to Xpert MTB/RIF cycle threshold (Ct) value and semi-quantitative

load from sputum samples. This analysis was restricted to cases identified by Xpert MTB/RIF G4, as semiquantitative results and cycle thresholds are different for Xpert MTB/RIF Ultra. We examined sensitivity for Xpert MTB/RIF Ct under 28.0, a threshold identified by a recent multi-country study as being 95% sensitive and 54% specific for smear positivity.¹⁴ We selected a sample size of 100 cases and 200 controls to achieve precision in 95% confidence interval of $\pm 6.5\%$ for the expected sensitivity of 90% and specificity of 70%. All analyses were performed using R, and ROC analyses were performed using the pROC package.¹⁵

2.5 Ethical considerations

All participants in the study provided informed consent. This study was approved by Federal University of Grande Dourados, the National Committee on Research Ethics (#44997115.1.0000.5160 and #2.195.047), and the Institutional Review Board and Stanford University (#40285). This study conforms to the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies (STARD) reporting guideline.¹⁶

2.6 Role of the funding source

The funders of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding authors had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

3. Results

Between April, 2018 and May, 2020, we screened 4250 incarcerated individuals in two prisons, of whom 1751 were able to provide sputum for testing. Among these, 131 were positive by sputum Xpert MTB/RIF or culture, 1456 were negative by sputum Xpert MTB/RIF and culture, and 129 were not positive but lacked one of the two assays due to insufficient sputum volume (**Figure 1**). From these, we selected consecutive patients for whom baseline serum and PAXgene Blood RNA samples were available and included 100 individuals with microbiologically confirmed TB and 200 individuals who were negative for TB (controls) by sputum Xpert MTB/RIF, culture, and clinical evaluation and had valid QuantiFERON results.

Among the 100 TB cases, Xpert MTB/RIF results were available for 96, and 93 (97%) were positive (85 by Xpert G4 [before January 2020]; 8 by Xpert Ultra [after January, 2020]). Seven cases were identified by culture only (four lacked Xpert results and three were Xpert negative). All participants were men who were incarcerated at the time of enrollment, and the median age was slightly younger among TB cases (median age: 31 years, IQR 25, 37) compared with controls (median age: 34 years, IQR 28, 39). A lower proportion of cases self-identified as Indigenous (7% vs 17%; $p = 0.198$). TB cases were more likely to report illicit drug use in the past year (80% vs 50%, $p < 0.0001$), previous incarceration (87 vs 54%, $p < 0.0001$), and a known TB contact (82% vs 53%, $p < 0.0001$). Overall, half of TB cases reported any WHO TB symptom, compared with only 11% of controls ($p < 0.0001$). The most common symptom was cough, reported by 45% of cases and 10% of controls. Four individuals with active TB (4%) were HIV co-infected, compared with none of the controls. Among controls, 92 (46%) were QFT-Plus positive (**Table 1**). Ninety-two percent (276/300) of serum and PAXgene RNA samples were collected on the same day as the first sputum sample collection and 98% (293/300) were collected within 7 days.

Compared with controls, TB cases had higher CRP values (9.39 vs <2.5 mg/L; $p < 0.0001$) and lower Xpert-MTB-HR scores (1.69 vs 2.72; $p < 0.0001$) (**Figure 2**). CRP and Xpert-MTB-HR values were negatively correlated (spearman's $\rho = -0.44$, $p < 0.0001$), and the correlation was much stronger among TB cases ($\rho = -0.68$, $p < 0.0001$) than controls ($\rho = 0.01$, $p = 0.874$) (**Figure 3**). Area under the curve in distinguishing TB cases from controls was non-significantly higher for Xpert-MTB-HR (0.84, 95% CI: 0.79-0.89) than for CRP (AUC 0.79, 95% CI: 0.73-0.84; p -value for ROC comparison = 0.105) (**Figure 4**). At 90% sensitivity, the specificity of CRP was 28.1% (95% CI: 20.2-41.8%) and the specificity of Xpert-MTB-HR was 53.0% (33.5-67.0%) (p -value for comparison, 0.003). At 70% specificity,

the sensitivity of CRP was 73% (95% CI: 62.1%-82.3%) and sensitivity of Xpert-MTB-HR was 81% (95% CI: 72.0-89.0%) (p-value for comparison, 0.074) (**Appendix Table A1**).

Among TB cases, CRP and Xpert-MTB-HR values correlated with sputum semi-quantitative Xpert MTB/RIF G4 values, which are based on PCR cycle thresholds. Compared with TB cases with “very low” MTB quantities, those with “medium” or “high” quantities had higher CRP (median: 47.0 vs 2.6 mg/L; $p < 0.0001$) and lower Xpert-MTB-HR scores (median: 1.06 vs 2.20; $p < 0.0001$) (**Figure 5a**). At the WHO TPP specificity target of 70%, the sensitivities of CRP and Xpert-MTB-HR were strongly correlated with sputum semi-quantitative Xpert MTB/RIF values (**Table 2**). Among 29 individuals with negative or very low semi-quantitative loads, CRP sensitivity was 44.8% and Xpert-MTB-HR sensitivity was 69.0% (p-value for comparison, 0.111), whereas among the 31 individuals with medium or high semi-quantitative loads, CRP sensitivity was 90.3% and Xpert-MTB-HR sensitivity was 96.8% (p-value, 0.612) (**Table 2**). CRP (spearman’s rho, -0.57; $p < 0.0001$) and Xpert-MTB-HR (spearman’s rho, 0.54, $p < 0.0001$) values also correlated with sputum Xpert MTB/RIF Ct values (**Figure 5b**). Among 57 participants with sputum Xpert MTB/RIF Ct < 28.0 , sensitivity of CRP (at 70% specificity) was 82.5% and sensitivity of Xpert-MTB-HR was 89.5% (**Table 2**).

CRP and Xpert-MTB-HR scores did not differ among TB cases with and without symptoms ($p = 0.541$ for CRP; $p = 0.893$ for Xpert-MTB-HR). Among controls, CRP and Xpert-MTB-HR values did not differ by QFT-Plus status ($p = 0.211$ for CRP; $p = 0.802$ for Xpert-MTB-HR). We did not identify differences in AUC among any demographic and clinical subgroups.

4. Discussion

Active case finding through systematic screening can be an effective means for early detection of TB in high-risk populations, preventing onward transmission. However, performing active case finding effectively and efficiently poses challenges, as diagnostics may not perform well in individuals who have less advanced disease, fewer symptoms, and may be unable to provide adequate sputum samples. To address this need, a target product profile was developed for a non-sputum-based triage test that could achieve high sensitivity (> 90%) to identify individuals for further diagnostic evaluation.³ We tested two candidate triage diagnostics—point-of-care CRP and a new gene expression based rapid molecular test—from blood samples collected during systematic mass screening for TB conducted in two high TB-burden prisons, where we recently reported active TB prevalence of 3 900 per 100 000.⁸ We found that both tests had moderate accuracy in distinguishing microbiologically confirmed cases from controls, with Xpert-MTB-HR achieving higher overall accuracy than CRP. At 90% sensitivity, specificity of Xpert-MTB-HR was 53%, the latter falling below the target of 70%. However, both tests had greater sensitivity among individuals with higher MTB burden as measured by Xpert MTB/RIF semi-quantitative load in sputum, suggesting that they may identify individuals with greatest potential for transmission.

A number of studies have evaluated gene expression signatures for identifying individuals with active or incipient TB.^{17–20} However, there have been few studies investigating performance of these biomarkers in active case finding irrespective of symptoms, and these earlier studies used laboratory-based assays rather than rapid molecular diagnostics.¹¹ The Xpert-MTB-HR test was implemented in a closed system cartridge that quantifies the relative mRNA levels of 3-gene in a whole blood sample. Our results corroborate a previous study conducted by Södersten and colleagues in a very different population and clinical setting—screening HIV-infected individuals presenting with TB symptoms to clinics in South Africa and Peru—which demonstrated feasibility of measuring the 3-gene signature on this platform.¹² Consistent with this and earlier studies on the 3-gene signature, we found that TB cases had lower Xpert-MTB-HR scores, indicating higher expression levels (up-regulation) of *GBP5* and *DUSP3* compared with *KLF2*, compared with controls.^{10–12,21} The AUC in this study (0.84) was lower than that reported by Södersten (0.94 against sputum Xpert MTB/RIF),¹² but consistent with a previous smaller evaluation of the 3-gene signature by laboratory-based qRT-PCR in this low HIV-prevalence, actively screened population (0.87).¹¹

Earlier studies have also investigated CRP testing for distinguishing individuals with active TB from those without disease. High accuracy has been reported in some studies of HIV co-infected patients,^{22,23} though there have been fewer studies assessing screening among HIV-negative individuals, and performance has generally been poorer. A recent study among HIV-negative inpatients in Uganda found specificity of 21% at sensitivity of 91%.²⁴ We are unaware of any studies assessing C-reactive protein in the context of mass screening for active case detection. We found the AUC to be 0.79 for the point-of-care CRP test in our study, consistent with the moderate accuracy previously reported in HIV-uninfected individuals. Notably, even among TB cases, the median CRP in our study was substantially lower (9.39 mg/L) than that reported among HIV-infected TB patients in a two previous studies (32.0 mg/L and 51.3 mg/L) by Yoon et al, which used the same device on serum and whole blood samples, respectively.^{22,25} Our findings may indicate that HIV-negative individuals have less systemic inflammation in the setting of TB, perhaps consistent with the observation that HIV-infected individuals are more likely to have disseminated disease.²⁶

Neither of the two tests evaluated met the published TPP benchmarks for a non-sputum-based diagnostic (> 90% sensitivity and > 70% specificity),³ however, the Xpert-MTB-HR performed better (specificity 53% vs 28%). Both assays performed well in identifying individuals with medium or high *Mtb* semiquantitative load in sputum. At specificity of 70%, CRP identified 90% (28/31) and Xpert-MTB-HR identified 97% (30/31) patients with medium/high *Mtb* semiquantitative sputum Xpert MTB/RIF result. Sputum Xpert Ct values and semi-quantitative load have been shown to correlate with sputum smear,¹⁴ which in turn has been shown in multiple studies to predict infectiousness.^{27,28} It is thereby conceivable that both of these diagnostics can reliably identify individuals who have high bacillary burden and are more likely to transmit infection. Further studies are needed to investigate whether these markers indeed identify these high transmission risk individuals, and whether a triage test that identifies such individuals would be useful. Given that Xpert-MTB-HR had lower accuracy in this setting than sputum Xpert MTB/RIF, for it to be impactful and cost-effective, it would need to either be lower cost or identify individuals with incipient, extrapulmonary or sputum-negative TB in order to be cost-effective.

This study should be interpreted within the context of several limitations. First, all participants were adult men. Our mass screening is focused in male prisons, as only two TB cases were reported in the past year in female prisons, and our prior studies in female prisons demonstrated a very low prevalence of TB in this state.²⁹ The absence of female representation may have reduced the effects of confounding conditions like connective tissue disorders and

pregnancy, both of which can lead to CRP elevation. Second, control participants all had chest radiographs with CAD4TB scores <60 one year prior, but this may have led to selection of controls with less lung pathology, limiting generalizability. However, >80% of all individuals in the study prisons have CAD4TB scores <60,⁸ suggesting that this group was still representative of the prison population. Third, because this was done within the context of an ongoing mass screening program, we used an older version of Xpert MTB/RIF (G4) for the first part of the study and switched to the more sensitive Xpert MTB/RIF Ultra when it became available at the site in January 2020; because the Ct values are not comparable between the two cartridges, we only analyzed them for G4, which comprised 91% of the positive Xpert tests. Laboratory staff performing the biomarker diagnostics were not blinded to the reference diagnostics, introducing potential for bias, though both diagnostics have digital readouts and we retained electronic source files for the Xpert-MTB-HR performance. This was a retrospective case-control study nested within a prospective mass screening study, and it is possible that there was bias in selection of participants. Additionally, there could have been reporting biases of symptoms and characteristics by participants. Finally, we used Xpert MTB/RIF and culture as the reference standards for classifying cases and controls. It is possible that the reference assays were false positives, though they have very high specificity for tuberculosis. Some of the individuals classified as controls may have had subclinical or incipient TB that was not detected by sputum Xpert MTB/RIF or culture; we performed one sputum Xpert MTB/RIF and culture on solid media. Using liquid media for culture, performing multiple Xpert tests or cultures, or use of PET-CT could improve classification. However, we note that all treated TB cases in this setting are mandatorily reported in an electronic database, which we reviewed six months after screening; none of the controls were diagnosed with TB in the six months following screening. This reduces the risk that controls were misclassified. Further, misclassification would likely bias differences in the biomarker diagnostics towards the null, meaning their accuracy would be underestimated. Lastly, the Xpert-MTB-HR product is in development, it is not for use in diagnostic procedures and has not been submitted for evaluation to any regulatory body.

There is an urgent need for accurate, rapid tools for screening individuals at high risk of tuberculosis, in order to focus further diagnostic testing and investigations. While Xpert-MTB-HR outperformed CRP testing in the context of mass screening in a low HIV-prevalence population, it did not meet the WHO target product profile benchmarks for a triage test. These findings may be related to the spectrum of disease observed in this setting. Most TB cases in this population had low bacillary burden in their sputum, and half had no symptoms at the time

diagnosis, suggesting that mass screening identified them early in their disease course, when they had less systemic inflammation. Among TB cases with medium or high bacillary burden, Xpert-MTB-HR achieved >96% sensitivity at 70% specificity, indicating that it may identify individuals with greater burden of infection and who might be more infectious. Further studies are needed to evaluate its performance for active case finding in other populations, and to determine whether it could be useful for averting transmission in high-risk settings.

Data sharing

De-identified data will be made available by the corresponding author upon request.

Authors' contributions

FM, RV, JC and JA designed the study. FM, PCPdS, AL, AdSS, RCPdA, BOdS, JHFdSQ collected the data. FM and JA analyzed the data. ES, DG, and DHP developed the diagnostic assay and provided training for its use prior to study commencement; they played no role in assay performance for study samples and did not have access to study data. RV, DHP, ES, DG, PK and JC assisted with interpretation of the completed analyses. FM and JA wrote the first draft of the manuscript. All authors critically revised and approved the manuscript.

Declaration of Competing Interest

JRA received grants from the U.S. National Institutes of Health to support this research. PK is a co-inventor on a 3-gene TB score pending patent owned by Stanford University, which has been licensed for commercialization. PK is a consultant with Cepheid. DHP, ES, and DG are employed by Cepheid. Xpert-MTB-HR cartridges were provided by Cepheid. Cepheid had no role in selection of participants, assay performance and interpretation, or data analysis, and did not have access to the study results until all analyses were completed.

Funding

This study was approved by National Institutes of Health (R01 AI130058 and R01 AI149620) and Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-404182/2019-4).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.eclinm.2021.100776.

References

- 1 WHO. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
- 2 World Health Organization. The End TB Strategy. Geneva, 2014
https://www.who.int/tb/strategy/End_TB_Strategy.pdf?ua=1.
- 3 WHO. High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting. 2014
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/135617/WHO_HTM_TB_2014.18_eng.pdf?sequence=1.
- 4 World Health Organization. Systematic screening for active tuberculosis: an operational guide. Geneva: World Health Organization, 2015
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/181164>.
- 5 Baussano I, Williams BG, Nunn P, Beggiato M, Fedeli U, Scano F. Tuberculosis incidence in prisons: a systematic review. *PLoS Med* 2010; **7**: e1000381.
- 6 Walter KS, Martinez L, Arakaki-Sanchez D, *et al*. The escalating tuberculosis crisis in central and South American prisons. *Lancet* 2021; **0**. DOI:10.1016/S0140-6736(20)32578-2.
- 7 Walter K, Martinez L, Arakaki-Sanchez D, *et al*. The escalating tuberculosis crisis in central and South American prisons. *The Lancet Health Policy* 2021; **397**. DOI: DOI:10.1016/S0140-6736(20)32578-2
- 8 Santos A da S, Oliveira RD de, Lemos EF, *et al*. Yield, Efficiency and Costs of Mass Screening Algorithms for Tuberculosis in Brazilian Prisons. *Clin Infect Dis* 2020; : 1–29.
- 9 MacLean E, Broger T, Yerlikaya S, Fernandez-Carballo BL, Pai M, Denkinger CM. A systematic review of biomarkers to detect active tuberculosis. *Nat Microbiol* 2019; **4**: 748–58.
- 10 Sweeney TE, Braviak L, Tato CM, Khatri P. Genome-wide expression for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a multicohort analysis. *Lancet Respir Med* 2016; **4**: 213–24.
- 11 Warsinske HC, Rao AM, Moreira FMF, *et al*. Assessment of Validity of a Blood-Based 3-Gene Signature Score for Progression and Diagnosis of Tuberculosis, Disease Severity, and Treatment Response. *JAMA Netw Open* 2018; **1**: e183779.
- 12 Södersten E, Ongarello S, Mantsoki A, *et al*. Diagnostic accuracy study of a novel blood-based assay # for identification of TB in people living with HIV. *J Clin Microbiol* 2020;

- : JCM.01643-20.
- 13 Bone A, Aerts A, Grzemska M, *et al.* Tuberculosis control in prisons : a manual for programme managers. 2000. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66823>.
 - 14 Beynon F, Theron G, Respeito D, *et al.* Correlation of Xpert MTB/RIF with measures to assess Mycobacterium tuberculosis bacillary burden in high HIV burden areas of Southern Africa. *Sci Rep* 2018; **8**: 5201.
 - 15 Robin X, Turck N, Hainard A, *et al.* pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 2011; **12**: 77.
 - 16 Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, *et al.* STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* 2015; **351**: h5527.
 - 17 Zak DE, Penn-Nicholson A, Scriba TJ, *et al.* A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. *Lancet* 2016; **387**: 2312–22.
 - 18 Suliman S, Thompson EG, Sutherland J, *et al.* Four-Gene Pan-African Blood Signature Predicts Progression to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; **197**: 1198–208.
 - 19 Warsinske H, Vashisht R, Khatri P. Host-response-based gene signatures for tuberculosis diagnosis: A systematic comparison of 16 signatures. *PLOS Med* 2019; **16**: e1002786.
 - 20 Gupta RK, Turner CT, Venturini C, *et al.* Concise whole blood transcriptional signatures for incipient tuberculosis: a systematic review and patient-level pooled meta-analysis. *Lancet Respir Med* 2020; **482**: 1–28.
 - 21 Francisco NM, Fang Y-M, Ding L, *et al.* Diagnostic accuracy of a selected signature gene set that discriminates active pulmonary tuberculosis and other pulmonary diseases. *J Infect* 2017; **75**: 499–510.
 - 22 Yoon C, Semitala FC, Atuhumuza E, *et al.* Point-of-care C-reactive protein-based tuberculosis screening for people living with HIV: a diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: 1285–92.
 - 23 Yoon C, Semitala FC, Asege L, *et al.* Yield and Efficiency of Novel Intensified Tuberculosis Case-Finding Algorithms for People Living with HIV. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; **199**: 643–50.
 - 24 Meyer AJ, Ochom E, Turimumahoro P, *et al.* C-Reactive Protein for Active Tuberculosis Among Inpatients without HIV in Uganda: A Diagnostic Accuracy Study. *J Clin Microbiol* 2020; : JCM.02162-20.
 - 25 Yoon C, Davis JL, Huang L, *et al.* Point-of-Care C-Reactive Protein Testing to Facilitate Implementation of Isoniazid Preventive Therapy for People Living With HIV. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* 2014; **65**: 551–6.

- 26 Mihret A, Abebe M, Bekele Y, Aseffa A, Walzl G, Howe R. Impact of HIV co-infection on plasma level of cytokines and chemokines of pulmonary tuberculosis patients. *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 125.
- 27 Behr M, Warren S, Salamon H, *et al.* Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999; **353**: 444–9.
- 28 Hernandez-Garduno E. Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. *Thorax* 2004; **59**: 286–90.
- 29 Carbone A da SS, Paião DSG, Sgarbi RVE, *et al.* Active and latent tuberculosis in Brazilian correctional facilities: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2015; **15**: 24.

Tables

Table 1. Sociodemographic and clinical characteristics of incarcerated individuals with and without TB.

Variables	Total N = 300 (%)	TB cases N = 100 (%)	Controls (no TB) N = 200 (%)	p value
Median age [IQR]	33 [27, 38]	31 [25, 37]	34 [28, 39]	0.0005
Ethnicity				
Mixed	155 (52)	50 (50)	105 (52)	0.7141
White	63 (21)	24 (24)	39 (20)	0.3709
Black	39 (13)	17 (17)	22 (11)	0.1498
Indigenous	41 (14)	7 (7)	34 (17)	0.0198
Asian	2 (1)	2 (2)	0	0.1104
Less than 8 years of schooling	225 (75)	75 (75)	150 (75)	1
Current smoker	190 (63)	71 (71)	119 (59)	0.0571
Illicit drug use over the last year	180 (60)	80 (80)	100 (50)	<0.0001
BCG vaccination scar	255 (85)	84 (84)	171 (85)	0.7341
Previous TB	23 (7)	11 (11)	12 (6)	<0.0001
Know someone with TB	189 (63)	82 (82)	107 (53)	<0.0001
Report any WHO TB symptoms	73 (24)	50 (50)	23 (11)	<0.0001
Report cough	66 (22)	45 (45)	21 (10)	<0.0001
Previously incarcerated	196 (65)	87 (87)	109 (54)	<0.0001
HIV positive	4 (1)	4 (4)	0	0.0118
QuantiFERON positive	92/200 (46)	NA	92/200 (46)	..

IQR, Interquartile range. BCG, Bacillus Calmette-Guérin. TB, tuberculosis. WHO, World Health Organization.

Table 2. Sensitivity of C-reactive protein and Xpert-MTB-HR according to sputum Xpert MTB/RIF G4 semi-quantitative load and cycle threshold values, using a threshold for specificity of 70%.

Sputum Xpert G4 result	n	CRP		Xpert-MTB-HR	
		Positive	% Sens. (95% CI)	Positive	% Sens. (95% CI)
Semi-quantitative load					
Negative/Very Low	29	13	44.8 (26.4-64.3)	20	69.0 (49.2-84.7)
Low	28	21	75.0 (55.1-89.3)	22	78.6 (59.0-91.7)
Medium/High	31	28	90.3 (74.2-98.0)	30	96.8 (83.3-99.9)
Cycle threshold					
≥28.0	31	15	48.4 (30.2-66.9)	21	67.7 (48.6-83.3)
<28.0	57	47	82.5 (70.1-91.3)	51	89.5 (78.5-96.0)
All confirmed cases*	100	72	72.0 (62.1-80.5)	82	82.0 (73.1-89.0)

CRP, C-reactive protein. CI, confidence interval. *Includes 4 culture-confirmed TB cases in whom Xpert MTB/RIF semi-quantitative load was not available and 8 cases confirmed by Xpert MTB/RIF Ultra.

Table A1. Specificity at fixed sensitivity values, and sensitivity at fixed specificity values for CRP and Xpert-MTB-HR.

Sensitivity	Specificity		Sensitivity		
	CRP	Xpert-MTB-HR	Specificity	CRP	Xpert-MTB-HR
0.70	0.74	0.80	0.70	0.73	0.81
0.75	0.67	0.78	0.75	0.69	0.78
0.80	0.56	0.73	0.80	0.65	0.70
0.85	0.42	0.62	0.85	0.61	0.64
0.90	0.28	0.53	0.90	0.58	0.57
0.95	0.14	0.36	0.95	0.51	0.48

CRP: C-reactive protein. Values were obtained from 5,000 bootstrap replicates.

Figures

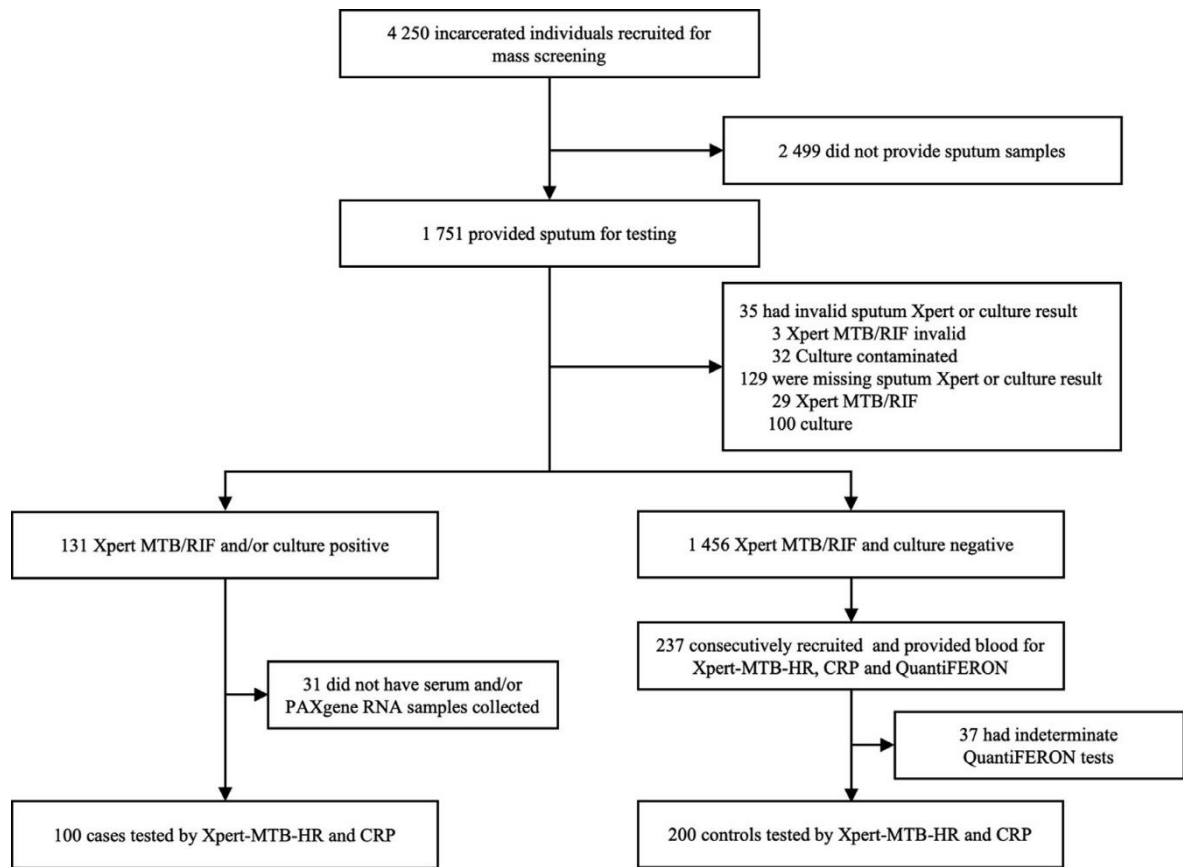


Figure 1. Flow diagram of study participants in mass screening and selection for diagnostic accuracy sub-study.

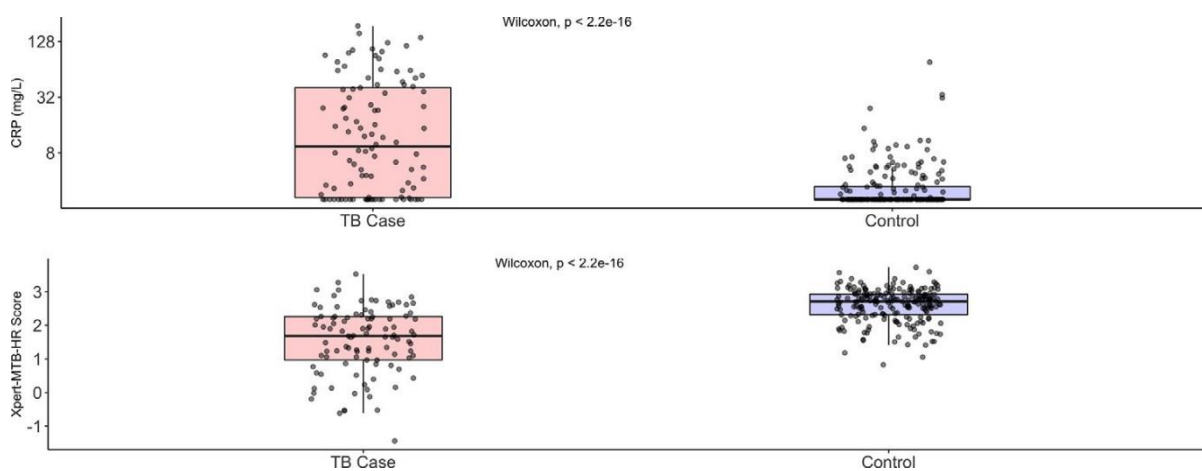


Figure 2. Distribution of C-reactive protein concentrations and Xpert-MTB-HR scores among TB cases and controls. Box-plots comparing the distributions of C-reactive protein (top) and Xpert-MTB-HR scores (bottom) between TB cases and control. CRP: C-reactive protein.

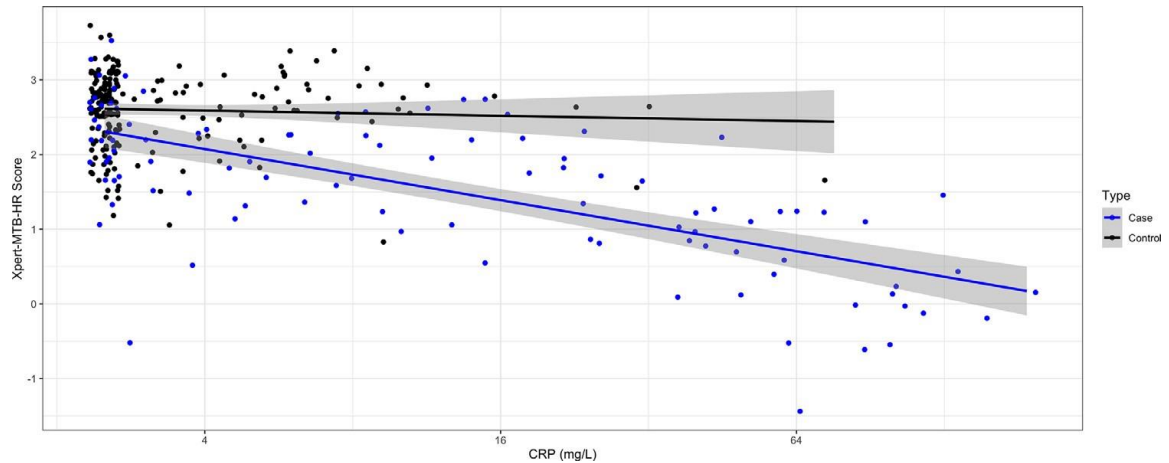


Figure 3. Correlation between C-reactive protein concentration and Xpert-MTB-HR Score among TB cases and controls, with fitted linear regression lines. Each dot indicates a patient observation. Black line indicates linear regression for controls and blue line indicates linear regression for cases, with shading indicating 95% confidence intervals. CRP: C-reactive protein.

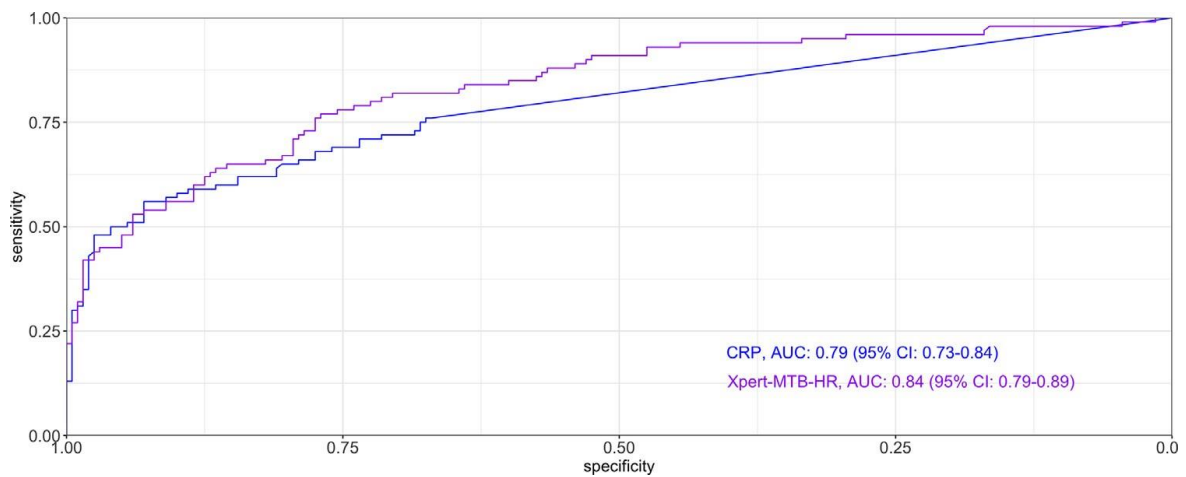


Figure 4. Receiver operating characteristic curves for point-of-care C-reactive protein and the Xpert-MTB-HR assay. AUC: Area under the curve. CRP: C-reactive protein.

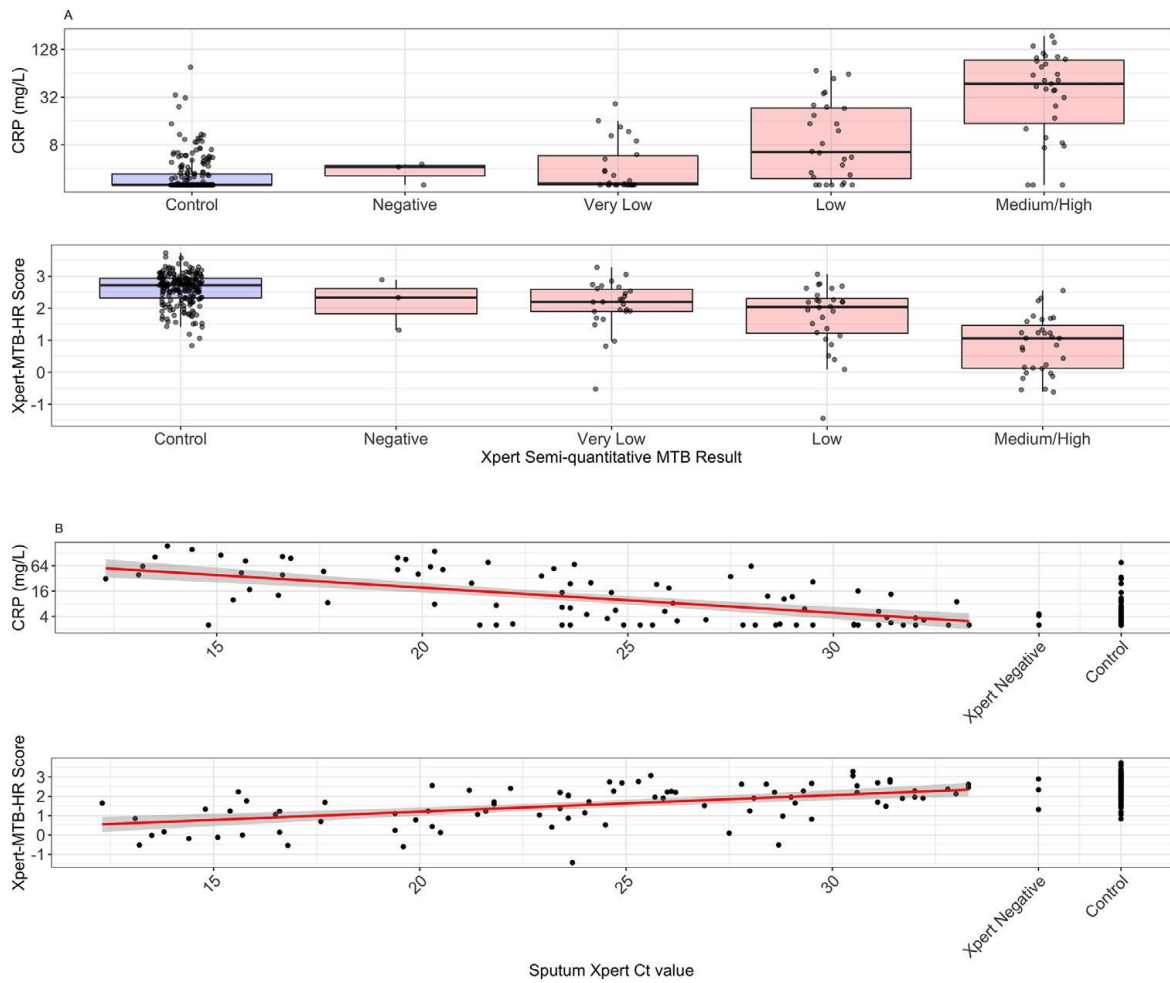


Figure 5. C-reactive protein and Xpert-MTB-HR scores stratified by sputum Xpert MTB/RIF semi-quantitative values (A) and cycle thresholds (B). Xpert MTB/RIF negative, culture positive individuals (“Negative”) and Xpert MTB/RIF- and culture-negative controls (“Control”) are depicted. CRP: C-reactive protein.

6 CONCLUSÕES

O controle da TB continua sendo desafiador para os programas de saúde pública em todo o mundo, devido às altas taxas sustentadas de morbidade e mortalidade. A OMS tem defendido metas ambiciosas que visam alcançar, testar e tratar populações de alto risco para TB com o objetivo final de redução de 80% da incidência da doença até 2030. Um pilar importante da estratégia mundial para o combate da doença é a busca de ferramentas rápidas e precisas para a triagem a fim de focar em mais testes diagnósticos e de investigações.

A constatação de que as alterações transcriptômicas do sangue podem ser anteriores ao diagnóstico da TB ativa abriu novas perspectivas para avaliação de seu potencial impacto como ferramenta de triagem para a detecção precoce da doença. A rápida detecção permitiria o início imediato do tratamento, reduzindo o tempo de terapia e a transmissão progressiva da infecção. Desse modo, atingir as metas globais até 2030 exigirá avanços tecnológicos para o desenvolvimento de novos testes rápido.

No *Estudo I* validamos a pontuação combinatória de 3 genes (TB score), o qual se aproximou dos padrões de referência do TPP como um teste de triagem não baseado em escarro. O score de 3 genes se mostrou associado à progressão da doença, indicando um bom desempenho na busca ativa de casos e monitoramento da resposta ao tratamento. Essas características de desempenho o tornam um teste com potencial para descartar TB ativa e um forte candidato para monitorar o estado de um indivíduo durante a progressão da infecção, doença e tratamento.

No *estudo II*, baseado da pontuação combinatória de 3 genes citado no estudo anterior, avaliamos a acurácia diagnóstica do protótipo Xpert-MTB-HR e do CRP como testes de triagem para TB ativa, entretanto – no contexto da triagem em massa em uma população de baixa prevalência de HIV –, nenhum dos dois testes atenderam aos parâmetros de referência de precisão previamente definidos para teste de triagem. Esses achados podem estar relacionados ao espectro da doença observada neste cenário, pois a maioria dos casos de TB nessa população apresentava baixa carga bacilar no escarro e metade não apresentava sintomas no momento do diagnóstico. Tais resultados sugerem que o rastreamento em massa os identificou no início do curso da doença, quando apresentavam menor inflamação sistêmica.

Entre os casos de TB com carga bacilar média ou alta, o Xpert-MTB-HR atingiu sensibilidade > 96% e especificidade de 70%, indicando que o teste identifica indivíduos com maior carga da infecção, os quais podem ser mais infecciosos e então contribuir para a transmissão da doença.

Em vista disso, o produto resultante do protótipo Xpert-MTB-HR poderia ser incluído para uso clínico na rede pública de saúde, uma vez que é utilizado na Plataforma GeneXpert, a qual tem sido distribuída para os grandes centros por meio do Sistema Público de Saúde. Seus benefícios para o atendimento público seriam uma maior agilidade na execução dos exames e liberação dos laudos, bem como maior segurança para a equipe técnica e redução de gasto com equipamentos de segurança biológica, graças à característica dos cartuchos baseados em sistema fechado.

Por fim, destacamos a necessidade de mais estudos com o intuito de avaliar o desempenho desse protótipo durante a busca ativa e/ou passiva de casos em outras populações. Do mesmo modo, sugerimos também a realização de estudos de avaliação de impacto na saúde e de análises de custo-efetividade para adoção do protótipo Xpert-MTB-HR.

7 ANEXOS

7.1 Aprovação da Proposta de Projeto de Pesquisa pela UFGD



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
 BOLETIM DE SERVIÇOS

Boletim Oficial de Atos Administrativos

N. 2843

Data: 14/11/2017

RESOLUÇÃO NÚMERO 211 de 29/09/2017

O Conselho Diretor da Faculdade de Ciências da Saúde, da Fundação Universidade Federal da Grande Dourados, no uso de suas atribuições legais, **RESOLVE**:

Manifestar-se favoravelmente aos Pareceres da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde, conforme abaixo relacionados:

PARECER N° 096/2017 – favorável à **Proposta de Projeto de Pesquisa** intitulado “Estudo do efeito antidepressivo, anti-hiperalgésico (analgésico) e anti-inflamatório da peçonha de *Ectatomma brunneum* SMITH (1858) (Formicidae: Ectatominae)”, coordenado pela docente Candida Aparecida Leite Kassuya;

PARECER N° 098/2017 – favorável à **Proposta de Projeto de Pesquisa** intitulado “Atividade anti-inflamatória, analgésica e antidepressiva de *Piper vicosanum*.”, do discente de mestrado Armando Jorge Junior, coordenado pela docente Candida Aparecida Leite Kassuya;

PARECER N° 101/2017 – favorável à **Proposta de Projeto de Pesquisa** intitulado “Prevalência do Fenótipo cintura hipertrigliceridêmica e fatores associados em adultos de Dourados-MS.”, da discente de mestrado Caroline Wunsch, coordenado pela docente Rosângela da Costa Lima.

PARECER N° 102/2017 – favorável à **Proposta de Projeto de Pesquisa** intitulado “Avaliação da resposta transcricional de *Mycobacterium tuberculosis* como um biomarcador de tratamento”, da discente de doutorado Flora Martinez Figueira Moreira, coordenado pelo docente Júlio Henrique Rosa Croda.

PARECER N° 104/2017 – favorável à **Proposta de Projeto de Pesquisa** intitulado “Estudo fitoquímico e avaliação antiproliferativa, anticolinesterase e anti-inflamatória de extrato e compostos isolados das folhas de *Psidium guineense*”, da discente de doutorado Kamilla Felipe do Nascimento, coordenado pela docente Anelise Samara Nazari Formagio.

PARECER N° 105/2017 – favorável à **Proposta de Projeto de Pesquisa** intitulado “Análise de extratos e compostos de *Moquimiastrum polymorphum* em parâmetros hematológicos in vitro em humanos.”, da discente de doutorado Laura Priscila Toledo Bernal, coordenado pela docente Candida Aparecida Leite Kassuya.

PARECER N° 106/2017 – favorável à **Proposta de Projeto de Pesquisa** intitulado “Estudo do potencial antimicrobiano da *Anchietea salutaris* contra enterobactérias multirresistentes.”, da discente de doutorado Márcia Soares Mattos Vaz, coordenado pela docente Simone Simionatto;

PARECER N° 107/2017 – favorável à **Proposta de Projeto de Pesquisa** intitulado “Componentes da síndrome metabólica de uma comunidade de adolescentes escolares da região Centro-Oeste, Brasil: prevalência e fatores associados.”, da discente de mestrado Mônica de Souza Dantas, coordenado pela docente Sílvia Aparecida Oesterreich;

PARECER N° 108/2017 – favorável à **Proposta de Projeto de Pesquisa** intitulado “Avaliação

UFGD - Unidade I - Rua João Rosa Góes, 1761 Vila Progresso - Caixa Postal 322 - CEP: 79.825-70 Dourados/MS -
 Telefone:(67) 3410-2002

UFGD - Unidade II - Rodovia Dourados - Itahum, Km12 Cidade Universitária - Caixa Postal 533 - CEP: 79.804-970
 Dourados/MS - Telefone: (67) 3410-2500

7.2 Aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da resposta transcricional de Mycobacterium tuberculosis e do hospedeiro como um biomarcador de tratamento

Pesquisador: JULIO HENRIQUE ROSA CRODA

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 11

CAAE: 44997115.1.0000.5160

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD-MS

Patrocinador Principal: Stanford University
Fundação Universidade Federal da Grande Dourados

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.026.791

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram copiadas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1208421_E2.pdf, de 01.11.2018).

INTRODUÇÃO

Apesar da disponibilidade de esquemas quimioterápicos eficazes para o tratamento da tuberculose 1,3 milhões de pessoas morrem anualmente em decorrência da doença em todo o mundo. Os regimes de tratamento de seis meses atualmente utilizados foram desenvolvidos há mais de 30 anos. Enquanto os modelos epidemiológicos indicam que os regimes mais curtos poderiam reduzir a incidência de tuberculose, reduzindo a carga de tratamento e liberando recursos para a detecção de casos, ainda são necessários ensaios clínicos bem-sucedidos de regimes de tratamentos mais curtos. Mais recentemente, um grande estudo multicêntrico de um regime de quatro meses de tratamento, contendo moxifloxacina, não conseguiu cumprir os critérios de não-inferioridade em comparação com o regime padrão de seis meses.

Um dos desafios na elaboração de esquemas de curta duração eficazes para a tuberculose e tuberculose multirresistente, tem sido a falta de um indicador precoce confiável de sucesso do

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.026.791

tratamento. Os modelos animais indicaram que os regimes de quatro meses iriam produzir uma cura estável, e "atividade bactericida precoce" (ABP) em seres humanos foi superior com este regime, o que resulta na precoce conversão de cultura em múltiplos ensaios. É claro que a ABP é um marcador insuficiente da eficácia do tratamento de longo prazo. Esta falta de um marcador de tratamento válido é um grande obstáculo para o desenvolvimento e teste de novas drogas e combinações de drogas para a tuberculose e a tuberculose multirresistente.

Entre as principais razões para que o tratamento da tuberculose requeira terapia de longo prazo é a presença de "micobactérias persistentes", que são micobactérias que não possuem mutações de resistência a drogas, mas que apresentam alterações fisiológicas que conferem proteção ou tolerância com a droga. Este fenômeno, observado em muitas espécies bacterianas e tipos de infecções, ajuda a explicar porque as taxas de morte bacteriana não são estáveis durante o tratamento com antibiótico, e porque as previsões de tempo para eliminação não ocorrem, tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo*. Com o *Mycobacterium tuberculosis*, tem sido dado a partir de sistemas *in vitro* que descrevem as alterações na expressão de genes na presença de concentrações letais e não letais de medicamentos contra a tuberculose. Esses dados, em alguns casos têm sido conflitantes sob diferentes modelos experimentais e, até recentemente, não houve dados sobre os humanos.

A droga mais importante na quimioterapia da tuberculose é Rifampicina, que inibe a RNA polimerase de subunidade β (rpoB), fechando de transcrição de RNAm rapidamente *in vitro* em concentrações inibitórias. Com uma meia-vida de 9,5 minutos, o RNAm deve diminuir rapidamente de modo semelhante, quando os níveis de drogas-alvo são alcançados nos tecidos locais. Por estas razões, a diminuição da abundância do RNAm poderia representar um poderoso biomarcador *in vivo* para a eficácia da terapia, através da medição direta do efeito anti-transcricional da Rifampicina. Além disso, através da monitorização direta da emergência de fenótipos persistentes, isto pode permitir uma previsão muito superior da resposta ao tratamento e o risco de necessitar de terapia prolongada para eliminar micobactérias persistentes. Estudos recentes também sugerem que a diminuição da dosagem padrão de Isoniazida em pacientes com perfil acetilador lento, poderia reduzir as reações adversas durante o tratamento. Por outro lado, alguns autores propõem que o aumento da dosagem padrão em pacientes com perfil acetilador rápido pode contribuir para a obtenção de níveis séricos ótimos da droga, resultando em um tratamento mais efetivo. Portanto, a terapia farmacogeneticamente orientada seria útil não apenas para prevenir danos hepáticos induzidos pela INH, mas também para contribuir com a aderência ao tratamento e aumentar as taxas de cura entre todos os pacientes.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conept@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.026.791

Nossos dados recentes (SIC) indicam que viável, transcricionalmente ativo, o *M. tuberculosis* persiste por pelo menos dois meses durante o tratamento. Esta discrepância entre as respostas previstas para a potente atividade esterilizante de Rifampicina e a persistência de *M. tuberculosis* transcricionalmente ativo, indica que populações persistentes são fenotipicamente tolerantes à Rifampicina. Isto ocorre apesar dos níveis de Rifampicina acima da concentração inibitória mínima *in vitro* serem geralmente obtidos com dose padrão. Se a tolerância fenotípica refere-se a nível da droga alcançada, e se as doses mais elevadas são capazes de ultrapassar a tolerância da droga, são questões importantes, como permitir regimes de dosagem, que consigam um tratamento de mais curta duração.

Neste sentido, nos propomos (SIC) avaliar a resposta transcricional de *M. tuberculosis* durante a terapia de drogas, utilizando um método sensível e específico recentemente desenvolvido para perfis de expressão. O objetivo deste estudo piloto será correlacionar os níveis de transcrição geral, e as respostas de transcrição específicas, com dose de Rifampicina e os níveis da droga. O objetivo maior é desenvolver e validar as respostas de transcrição como um biomarcador de tratamento, que pode ser usado para prever respostas a nível individual, bem como servir como um desfecho substituto significativo para ensaios clínicos de tuberculose de fase inicial.

HIPÓTESE

Nossa hipótese é a de que a dose de rifampicina e o pico de concentração irão correlacionar positivamente com a taxa de deterioração do RNAm, o que sinaliza a morte de bacilos viáveis. Além disso, temos a hipótese de que mudanças na expressão genética consistente com um fenótipo persistente, incluindo a indução de *rpoB* rifampicina-alvo, irá correlacionar com o declínio da amplitude de RNAm.

METODOLOGIA

Visão geral. Este é um estudo observacional que visa correlacionar os níveis séricos de Rifampicina e o tempo de eliminação da tuberculose; não serão avaliadas novas intervenções nesse estudo. Recrutaremos 150 pacientes com tuberculose pulmonar e 150 controles sem tuberculose. Este estudo será realizado na cidade de Dourados com pacientes identificados no Hospital Universitário e em pacientes identificados durante triagem de rotina no presídio Estadual de Dourados e Jair Ferreira de Carvalho localizado em Campo Grande (PROJETO APROVADO CAAE: 24549414.7.0000.5160). Todos os pacientes com diagnóstico de tuberculose ativa serão tratados com a terapia convencional com quatro drogas (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida, Etambutol),

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.026.791

com o padrão de doses baseado no peso, conforme os protocolos nacionais. O escarro, a urina, o fluido oral e o sangue serão coletados de todos os pacientes nos dias 0 (recrutamento) para identificar o perfil de expressão do RNAm, marcadores imunológicos e níveis séricos de Rifampicina e Isoniazida. E, a amostra de urina dos dias 0, 7, 14 e 56. O escarro será coletado no dia 0 (recrutamento) para esfregaços de rotina e cultura conforme os protocolos nacionais, mas os estudos de RNAm não serão realizados nessas amostras. Por se tratar de um estudo observacional, o grupo controle não receberá nenhuma medicação e terá uma amostra de sangue, escarro, fluido oral e urina no dia do seu recrutamento e após coleta de 3 amostras de urina. O grupo controle faz-se necessário para que possamos quantificar e comparar o RNAm de *M. tuberculosis* e alterações imunológicas expresso em sangue periférico de pacientes com tuberculose e de voluntários sem tuberculose com objetivo de identificar a especificidade dos alvos que serão analisados para distinguir os casos de doença ativa dos indivíduos sem a doença.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Idade > 18 anos;
- Diagnosticado com tuberculose pulmonar;
- Não iniciou o tratamento para tuberculose;
- Apto para fornecer consentimento informado.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Gravidez;
- Insuficiência renal crônica ou aguda;
- Níveis de AST acima do limite normal;
- Atualmente tomando medicação metabolizada pelo sistema Citocromo P450;
- Recebeu algum antibiótico com ação antituberculose dentro dos três meses anteriores;
- Indígenas. Por este ser um estudo piloto e pequeno, avaliando os níveis de droga terapêuticos, excluiremos pacientes que podem provavelmente ter o metabolismo das drogas alterado. Estes grupos são identificados acima. Além disso, pela Rifampicina induzir fortemente o metabolismo do Citocromo P450, excluiremos pacientes que estão atualmente tomando outros medicamentos que podem ser afetados pela Rifampicina.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS PRIMÁRIOS

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.026.791

- Avaliar a diminuição da abundância de RNAm de *M. tuberculosis* no escarro, na urina, no fluido oral e no sangue, mudanças na expressão gênica e imunológica nos primeiros 56 dias de tratamento, em função das concentrações terapêuticas de Rifampicina e Isoniazida.
- Determinar, estratificar por raça/cor a distribuição alélica de NAT2 em pacientes diagnosticados com tuberculose em Dourados entre 2018-2020. Nós supomos (SIC) que a concentração de Rifampicina irá se correlacionar positivamente com a taxa de diminuição na abundância de RNAm, o que indica a morte de bacilos viáveis. Além disso, nós supomos (SIC) que as mudanças na expressão gênica coerentes com um fenótipo "persistente", incluindo a indução da "Rifampicina-alvo" *rpoB*, irão se correlacionar com a diminuição da abundância de RNAm.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Não informados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

A participação poderá acarretar pequenos riscos a saúde, como pequeno desconforto ou hematomas na região da punção relacionada a colheita de sangue e risco psicológico decorrente da aplicação do questionário. A participação no estudo não acarretará custos para o participante e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Os riscos serão minimizados através do treinamento adequado da equipe de coleta de sangue através das recomendações do CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) e normas de biossegurança, após a higienização das mãos e antissepsia do local da punção. Iremos providenciar assistência psicológica através do serviço especializado do HU caso o paciente sofra algum dano decorrente da aplicação do questionário. Iremos arcar com possíveis ressarcimentos necessários decorrentes dessa pesquisa.

BENEFÍCIOS

- É possível que a participação no estudo leve a cura mais rápida da tuberculose. Estudos anteriores sugeriram que isso pode ocorrer.
- O conhecimento gerado através da participação dos pacientes no estudo pode melhorar o tratamento e diagnóstico para pessoas com tuberculose no futuro.
- A participação oferecerá benefícios uma vez que serão realizados exames laboratoriais (contagem de células sanguíneas e testes de função hepática) que serão disponibilizados ao paciente e podem contribuir para a evolução do seu tratamento. Esse procedimento acontecerá

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.026.791

semanalmente até a oitava semana, dessa forma o paciente será acompanhado durante esse período.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

EMENDA 02

Trata-se de Emenda em que o objetivo é apresentar ao Sistema CEP/CONEP a nova versão do Projeto Detalhado (Versão 03) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 03).

Justificativa para a emenda segundo o pesquisador: Os resultados recentes sugerem que a diminuição da dosagem padrão de Isoniazida em pacientes com perfil acetilador lento, poderia reduzir as reações adversas durante o tratamento. E, o aumento da dosagem padrão em pacientes com perfil acetilador rápido pode contribuir para a obtenção de níveis séricos ótimos da droga, resultando em um tratamento mais efetivo. E o aumento do volume de sangue que será coletado, tem como finalidade de avaliar mais adequadamente a resposta imunológica em relação a variações na expressão gênica associadas ao adoecimento.

Os documentos anexados são emendas do projeto e TCLE explicando em que local os respectivos documentos foram alterados e os novos documentos com as modificações que foram realizadas.

Está sendo incorporado a nova versão do Projeto Detalhado (versão 3, intitulado "PROJETOJULIOCRODA.doc", datado de 02/09/2018) as seguintes informações:

1. Adicionado que além de genética irá avaliar a imunológica nos primeiros 56 dias; (pág. 7 de 20);
2. Adicionado que irá determinar estratificar por raça/cor a distribuição alélica de NAT2 em pacientes diagnosticados com tuberculose em Dourados entre 2018-2020. (pág. 7 de 20);
3. Adicionado que iremos avaliar a expressão de RNAm, marcadores imunológicos, avaliação hematológica e hepática e mensurar o nível sérico de Rifampicina e Isoniazida. (pág. 10 de 20);
4. Adicionado que 41,5 ml de sangue coletados com heparina, EDTA para obtenção de soro ou plasma, células polimorfonucleares do sangue periférico. (pág. 11 de 20).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 3, intitulado "TCLEcasocontrole.doc", datado de 02/09/2018) foi atualizado para adicionar as informações atualizadas no Projeto Detalhado (versão 3) e algumas informações adicionais conforme segue descrito abaixo:

1. Adicionado que será coletado em torno de 43,5 ml de sangue periférico, 20 ml de urina, escarro

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-049
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.026.791

e fluído oral. (pág. 1 de 6).

Adicionalmente foram anexados os seguintes documentos:

- CARTA.docx; (Versão 01)
- EMENDATCLEcasocontrole.doc; (versão 01)
- EMENDAPROJETO.doc; (versão 01).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise de resposta ao parecer pendente nº 2.929.832, emitido pela Conep em 01.10.2018.

1. No documento "PROJETOJULIOCRODA.doc", página 10, linha 216, lê-se: "Através das amostras de sangue, iremos avaliar a expressão de RNAm, MARCADORES IMUNOLÓGICOS, avaliação hematológica e hepática e mensurar o nível sérico de Rifampicina e Isoniazida.". Solicitam-se esclarecimentos sobre quais serão os marcadores imunológicos citados.

RESPOSTA: Serão avaliados dois grupos de marcadores, de fenótipo e de função, produzidos por células imunológicas específicas, tal qual relacionados no quadro abaixo.

Célula	Marcador de Fenótipo	Marcador de Função
Natural Killer	CD38	CD107a
	CD57	TNF-
	KIRR2DL1	IFN-
	NKp46	MIP-1
	NKG2C	

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.026.791

CD16
NKp30
NKp44
CD69
NKG2A
NKG2D
CD56
KIR2DL3

Monócitos, plasmócitos e mielóides	HLA-DR CD11c CD14 CD123 CCR7	TNF- IFN- IP-10
--	--	-----------------------

Linfócitos T	CD45 CD38 CD3 CD4 CD8 CD45Ra CD28 PD1 TCR CD50 CD161 CD127 CD69 CCR7 CD25	CD107a TNF IL-17a IFN- MIP-1
--------------	---	--

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.026.791

--

Linfócitos B CD19
 CD38
 CD27

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_120842_1_É2.pdf	01/11/2018 17:19:47		Aceito
Outros	EMENDA.doc	01/11/2018 17:17:11	Roberto Dias de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.doc	01/11/2018 17:16:37	Roberto Dias de Oliveira	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	01/11/2018 17:16:11	Roberto Dias de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcasocontrole.doc	02/09/2018 11:36:04	ALESSANDRA DE CÁSSIA LEITE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_nova.pdf	14/05/2018 16:46:22	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao.pdf	03/05/2016 20:08:29	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	Resposta_CONEP.docx	03/05/2016 12:15:39	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	Biorrepositorio.docx	02/05/2016 22:36:45	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_IRB_FINAL_CONEP_07_04_16.	02/05/2016	JULIO HENRIQUE	Aceito

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.026.791

Assentimento / Justificativa de Ausência	docx	16:20:37	ROSA CRODA	Aceito
Outros	Projeto_Stanford_portugues.docx	08/03/2016 12:31:10	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	Projeto_Stanford.docx	08/03/2016 12:29:52	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	Comite_etica_Stanford_traduzida.docx	08/03/2016 12:27:05	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	ApprovalLetter_33005.docx	08/03/2016 12:26:42	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	infra_estrutura_FCS.docx	08/03/2016 10:45:13	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	Resolucao.doc	08/03/2016 10:44:20	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	Comissao_HU.doc	08/03/2016 10:16:47	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	traducao_gmail_fwd_ITI_Faculty_Seed_Grants.docx	08/03/2016 10:15:24	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	infra_estrutura_HU.docx	08/03/2016 09:54:26	JULIO HENRIQUE ROSA CRODA	Aceito
Outros	Declaração infraestrutura_FCS.PDF	09/05/2015 15:16:34		Aceito
Outros	comissao_HU.pdf	17/04/2015 18:44:30		Aceito
Outros	declaracao_de_infra.pdf	17/04/2015 18:43:35		Aceito
Outros	Resolução.pdf	02/04/2015 15:09:39		Aceito
Outros	Questionario.docx	02/04/2015 15:05:50		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 20 de Novembro de 2018

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

7.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 1 de 2

Avaliação da resposta transcricional de *Mycobacterium tuberculosis* e do hospedeiro como um biomarcador do tratamento

Você/Sr./Sra. está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “Avaliação da resposta transcricional de *Mycobacterium tuberculosis* e do hospedeiro como um biomarcador de tratamento”. Meu nome é Julio Henrique Rosa Croda e, junto com o professor Jason Andrews, somos os pesquisadores principais desse projeto. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, você terá um tempo adequado para refletir, caso necessário consultar seus familiares ou outras pessoas que julgue necessário para decidir a respeito da sua participação no estudo. Se você aceitar fazer parte do estudo, rubrique todas as páginas e assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence à pesquisadora responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado(a) de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis, via e-mail (juliocroda@gmail.com) e (aleleite17@gmail.com) ou presencialmente em seu horário de sol e, inclusive, sob forma de ligação a cobrar, através do seguinte contato telefônico: (67) 8122-9959. O **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)** da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) é um colegiado interdisciplinar e independente, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, e tem como objetivo defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade. Ao persistirem as dúvidas sobre os seus direitos como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato diretamente com CEP da UFGD, pelo telefone (67)3410-2853.

Iremos realizar um projeto de pesquisa envolvendo cento e cinquenta pacientes e cento e cinquenta controles, no qual propomos identificar novos marcadores para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos da tuberculose no catarro, no sangue na urina e no fluido oral. O nosso propósito é identificar uma molécula que possa já no início do tratamento avaliar qual é a chance de cura após os 6 meses de tratamento da tuberculose.

A sua participação nesta pesquisa se realizará em 4 etapas:

Primeira etapa: você irá responder um questionário aplicado por um dos membros da nossa equipe e será coletado em torno de 43,5 ml de sangue periférico, 20 ml de urina, escarro e fluido oral. Estimamos que a aplicação do questionário irá durar 30 minutos, a coleta do sangue 5 minutos e a coleta de urina e escarro mais uns 5 minutos. Durante o intervalo entre a aplicação do questionário e a coleta de sangue iremos esclarecer e tirar as suas dúvidas em relação a tuberculose. **Segunda etapa:** Após 7 dias (7º dia) será coletado outra amostra de urina (20 ml). O tempo estimado para essa etapa é de 5 minutos. **Terceira etapa:** Após 14 dias (14º) será coletado novamente a urina (20 ml). O tempo estimado para essa etapa é de 5 minutos. **Quarta etapa:** No 56º dia iremos coletar novamente 20 ml de urina. O tempo estimado para essa etapa é de 5 minutos.

Após a coleta das amostras e processamento, elas serão armazenadas em um freezer -80 graus nas dependências na Universidade Federal da Grande Dourados até o envio para a Universidade de Stanford, local onde serão realizados a quantificação da expressão gênica (moléculas que regulam a produção de proteínas da bactéria e é responsável pela sua replicação e sobrevivência no corpo humano). Todas as amostras de todos os pacientes e controles serão enviadas em um único momento após finalizarmos a etapa de recrutamento. Os resultados obtidos com a análise dessas moléculas presentes no catarro, na urina, no fluido oral e no sangue não trará nenhum benefício direto para você, mas se desejar, você terá acesso a todas as informações geradas a partir da sua amostra de escarro, de sangue, de fluido oral ou de urina. A qualquer momento você poderá retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no nosso laboratório (Biorrepositório) mediante a manifestação por escrito e assinada. Após a retirada do consentimento as suas amostras biológicas serão devolvidas a você. As suas amostras biológicas só serão utilizadas no que consta descrito nesse termo e no projeto submetido ao CEP. Caso a sua amostra biológica seja utilizada para outro propósito não descrito nesse termo, iremos contactá-lo para uma nova autorização e coleta de assinaturas em um novo termo que irá explicar os futuros procedimentos que serão realizados com sua amostra e seus dados não previsto nesse projeto.

Todos os seus dados clínicos e laboratoriais serão inseridos em um banco de dados seguro por um membro da equipe do estudo. Os dados gerados a partir de análises das amostras de escarro, fluido oral, urina e sangue (quantificação de RNAm e ensaio de expressão) serão associados apenas com um número de estudo e nenhuma informação de identificação adicional será fornecida no intuito de preservar o sigilo individual dos pacientes. A chave mestra associando o seu número no estudo e informações que identifique você só será acessível para o pesquisador responsável pelo projeto e o membro responsável pela entrada de dados. Os resultados deste estudo de pesquisa podem ser apresentados em reuniões científicas ou profissionais ou publicados em revistas científicas. No entanto, sua identidade não será divulgada.

O benefício da sua participação na referida pesquisa é a realização sem ônus para o SUS ou para o seu plano de saúde privado dos exames laboratórios descritos a seguir: hemograma, enzimas hepáticas e cultura que serão disponibilizados para você/Sr./Sra. e para a equipe de saúde que faz o seu acompanhamento. Outro benefício indireto para os participantes desta pesquisa é gerar novos testes que avaliem o sucesso do tratamento da tuberculose em futuro próximo.

A sua participação poderá acarretar pequenos riscos a sua saúde, como pequenos hematomas e hiperemia no local após a coleta de sangue. Além disso perguntas realizadas durante a aplicação do questionário poderão trazer algum dano psicológico pela possibilidade de suscitar lembranças negativas durante a entrevista, caso não se sinta à vontade para responder, tem a liberdade de recusar a qualquer momento e hora. A nossa equipe estará à disposição para auxiliá-lo no que for preciso e minimizar os riscos supracitados. Iremos monitorar a sua condição de saúde e iremos garantir assistência integral e gratuita a danos causados em decorrência do estudo quando for o caso pelo tempo indeterminado.

Sua participação no estudo é voluntária. Você pode escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento. Você não será proibido de participar de novos estudos. Você poderá solicitar sair do estudo se não cumprir os procedimentos previstos ou atender as exigências estipuladas. Você tem garantido pela resolução do Conselho Nacional de Saúde número 422 de 2012 a indenização e ressarcimento decorrentes da pesquisa. O pesquisador principal se responsabiliza por futuras indenizações e ressarcimentos que possam ocorrer decorrente dessa pesquisa.

Todas as despesas tidas com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável/patrocinador, ou seja, você não arcará com nenhum custo referente a procedimentos e/ou exames e não será ofertado nenhuma compensação financeira adicional associado a sua participação. Se durante a aplicação do questionário e/ou coleta do material, o (a) senhor (a) apresentar algum problema ou detectarmos que o (a) senhor (a) precisa de acompanhamento especializado encaminharemos para atendimento médico no Hospital Universitário da UFGD.

Se você não estiver satisfeito com a maneira que este estudo está sendo conduzido, ou se você tiver quaisquer preocupações, queixas ou questões gerais sobre a pesquisa ou os seus direitos como participante, entre em contato com CEP da UFGD para falar com alguém independente da equipe de pesquisa no telefone (67) 3410-2853.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

_____, _____ de _____ de _____

Assinatura do Participante Voluntário

Assinatura do Pesquisador Responsável

7.4 Aprovações do Comitê de Ética e Pesquisa de Stanford

STANFORD UNIVERSITY

Stanford, CA 94305 [Mail Code 5579]

Ronald L. Ariagno, M.D.

(650) 724-7541

CHAIR, PANEL ON MEDICAL HUMAN SUBJECTS

(650) 725-8815

Certification of Human Subjects Approvals**Date:** September 22, 2015**To:** Jason Andrews, MD, SM, Medicine - Med/Infectious Diseases
Gary K. Schoolnik MD**From:** Ronald L. Ariagno, M.D., Administrative Panel on Human Subjects in Medical Research**Protocol** Evaluating Mycobacterium tuberculosis Transcriptional Responses During Treatment**Protocol ID:** 33005**IRB Number:** 351 (Panel: 4)

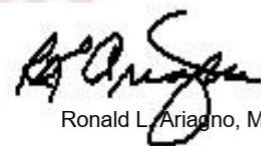
The IRB approved human subjects involvement in your research project on 09/22/2015. **'Prior to subject recruitment and enrollment, if this is: a Cancer-related study, you must obtain Cancer Center Scientific Review Committee (SRC) approval; a CTRU study, you must obtain CTRU approval; a VA study, you must obtain VA R and D Committee approval; and if a contract is involved, it must be signed.'**

The expiration date of this approval is 08/31/2016 at Midnight. If this project is to continue beyond that date, you must submit an updated protocol in advance for the IRB's re-approval. If this protocol is used in conjunction with any other human use it must be re-approved. Proposed changes to approved research must be reviewed and approved prospectively by the IRB. No changes may be initiated without prior approval by the IRB, except where necessary to eliminate apparent immediate hazards to subjects. (Any such exceptions must be reported to the IRB within 10 working days.) Unanticipated problems involving risks to participants or others and other events or information, as defined and listed in the Report Form, must be submitted promptly to the IRB. (See Events and Information that Require Prompt Reporting to the IRB at <http://humansubjects.stanford.edu>.)

All continuing projects and activities must be reviewed and re-approved on or before Midnight of the expiration date. The approval period will be less than one year if so determined by the IRB. It is your responsibility to resubmit the project to the IRB for continuing review and to report the completion of the protocol to the IRB within 30 days.

Please remember that all data, including all signed consent form documents, must be retained for a minimum of three years past the completion of this research. Additional requirements may be imposed by your funding agency, your department, or other entities. (See Policy 1.9 on Retention of and Access to Research Data at <http://doresearch.stanford.edu/policies/research-policy-handbook>)

This institution is in compliance with requirements for protection of human subjects, including 45 CFR 46, 21 CFR 50 and 56, and 38 CFR 16.



Ronald L. Ariagno, M.D., Chair

Approval Period: 09/22/2015 THROUGH 08/31/2016**Review Type:** REGULAR - NEW**Funding:** Stanford Institute for Immunity, Transplantation and Infection**Assurance Number:** FWA00000935 (SU)

Note: Approval is with the understanding that local IRB approval will be obtained at Federal University of Grande Dourados prior to commencing the human subjects research described in this protocol.

STANFORD UNIVERSITY

Stanford, CA 94305 [Mail Code 5579]

Michael D Amylon, M.D.

(650) 736-4390

CHAIR, PANEL ON MEDICAL HUMAN SUBJECTS

Certification of Human Subjects Approvals**Date:** August 31, 2020**To:** Jason Andrews, MD, SM, Medicine - Med/Infectious Diseases**From:** Michael D Amylon, M.D., Administrative Panel on Human Subjects in Medical Research**eProtocol** Evaluating Mycobacterium tuberculosis Transcriptional Responses During Treatment**eProtocol #:** 33005 **IRB 7 (Registration** 5136)

The IRB approved human subjects involvement in your research project on 08/31/2020. **'Prior to subject recruitment and enrollment, if this is: a Cancer-related study, you must obtain Cancer Center Scientific Review Committee (SRC) approval; a CTRU study, you must obtain CTRU approval; a VA study, you must obtain VA R and D Committee approval; and if a contract is involved, it must be signed.'**

The expiration date of this approval is 08/31/2021 at Midnight. If this research is to continue beyond that date, it is your responsibility to submit a Continuing Review application in eProtocol. Research activities must be reviewed and re-approved on or before midnight of the expiration date. The approval period may be less than one year if so determined by the IRB. Proposed changes to approved research must be reviewed and approved prospectively by the IRB. No changes may be initiated without prior approval by the IRB, except where necessary to eliminate apparent immediate hazards to subjects. (Any such exceptions must be reported to the IRB within 10 working days.) Unanticipated problems involving risks to participants or others and other events or information, as defined and listed in the Report Form, must be submitted promptly to the IRB. (See Events and Information that Require Prompt Reporting to the IRB at <http://humansubjects.stanford.edu>.) Upon completion, you must report to the IRB within 30 days.

Please remember that all data, including all signed consent form documents, must be retained for a minimum of three years past the completion of this research. Additional requirements may be imposed by your funding agency, your department, HIPAA, or other entities. (See Policy 1.9 on Retention of and Access to Research Data at <http://doresearch.stanford.edu/policies/research-policy-handbook>)

This institution is in compliance with requirements for protection of human subjects, including 45 CFR 46, 21 CFR 50 and 56, and 38 CFR 16.



Michael D Amylon, M.D., Chair

Approval Period: 08/31/2020 - 08/31/2021
Review Type: REGULAR - CONTINUING REVIEW
Funding: Stanford Institute for Immunity, Transplantation and Infection
Assurance #: FWA00000935 (SU)

STANFORD UNIVERSITY

Stanford, CA 94305 [Mail Code 5579]

David Spiegel, M.D.

(650) 725-4133

CHAIR, PANEL ON MEDICAL HUMAN SUBJECTS

(650) 725-8013

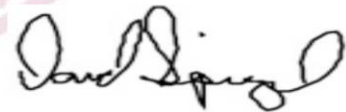
Certification of Human Subjects Approvals**Date:** February 14, 2017**To:** Jason Andrews, MD, Medicine - Med/Infectious Diseases
Sanjay Basu M.D., Ph.D.**From:** David Spiegel, M.D., Administrative Panel on Human Subjects in Medical Research**eProtocol Title:** Identifying Strategies for Active Case Finding for TB and Evaluating Transmission Among
Contacts in Brazilian Prisons**eProtocol #:** 40285**IRB 3 (Registration #: 350)**

The IRB approved human subjects involvement in your research project on 02/14/2017. **'Prior to subject recruitment and enrollment, if this is: a Cancer-related study, you must obtain Cancer Center Scientific Review Committee (SRC) approval; a CTRU study, you must obtain CTRU approval; a VA study, you must obtain VA R and D Committee approval; and if a contract is involved, it must be signed.'**

The expiration date of this approval is 02/14/2018 at Midnight. If this research is to continue beyond that date, it is your responsibility to submit a Continuing Review application in eProtocol. Research activities must be reviewed and re-approved on or before midnight of the expiration date. The approval period may be less than one year if so determined by the IRB. Proposed changes to approved research must be reviewed and approved prospectively by the IRB. No changes may be initiated without prior approval by the IRB, except where necessary to eliminate apparent immediate hazards to subjects. (Any such exceptions must be reported to the IRB within 10 working days.) Unanticipated problems involving risks to participants or others and other events or information, as defined and listed in the Report Form, must be submitted promptly to the IRB. (See Events and Information that Require Prompt Reporting to the IRB at <http://humansubjects.stanford.edu>.) Upon completion, you must report to the IRB within 30 days.

Please remember that all data, including all signed consent form documents, must be retained for a minimum of three years past the completion of this research. Additional requirements may be imposed by your funding agency, your department, HIPAA, or other entities. (See Policy 1.9 on Retention of and Access to Research Data at <http://doresearch.stanford.edu/policies/research-policy-handbook>)

This institution is in compliance with requirements for protection of human subjects, including 45 CFR 46, 21 CFR 50 and 56, and 38 CFR 16.



David Spiegel, M.D., Chair

Approval Period: 02/14/2017 THROUGH 02/14/2018
Review Type: REGULAR - NEW
Funding: National Institutes of Health , SPO: 124916
Assurance #: FWA00000935 (SU)

STANFORD UNIVERSITY

Stanford, CA 94305 [Mail Code 5579]

Darrell M Wilson, M.D.

(650) 723-2012

CHAIR, PANEL ON MEDICAL HUMAN SUBJECTS

Certification of Human Subjects Approvals**Date:** August 27, 2020**To:** Jason Andrews, MD, SM, Medicine - Med/Infectious Diseases
Leonardo Martinez Pantoja PhD**From:** Darrell M Wilson, M.D., Administrative Panel on Human Subjects in Medical Research**eProtocol** Characterizing infectiousness of subclinical TB and identifying novel early diagnostic strategies for preventing transmission**eProtocol #:** 54061 **IRB 5 (Registration** 4593)

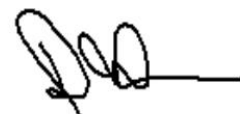
The IRB approved human subjects involvement in your research project on 08/27/2020. **'Prior to subject recruitment and enrollment, if this is: a Cancer-related study, you must obtain Cancer Center Scientific Review Committee (SRC) approval; a CTRU study, you must obtain CTRU approval; a VA study, you must obtain VA R and D Committee approval; and if a contract is involved, it must be signed.'**

The expiration date of this approval is 01/21/2021 at Midnight. If this research is to continue beyond that date, it is your responsibility to submit a Continuing Review application in eProtocol. Research activities must be reviewed and re-approved on or before midnight of the expiration date. The approval period may be less than one year if so determined by the IRB. Proposed changes to approved research must be reviewed and approved prospectively by the IRB. No changes may be initiated without prior approval by the IRB, except where necessary to eliminate apparent immediate hazards to subjects. (Any such exceptions must be reported to the IRB within 10 working days.) Unanticipated problems involving risks to participants or others and other events or information, as defined and listed in the Report Form, must be submitted promptly to the IRB. (See Events and Information that Require Prompt Reporting to the IRB at <http://humansubjects.stanford.edu>.) Upon completion, you must report to the IRB within 30 days.

Please remember that all data, including all signed consent form documents, must be retained for a minimum of three years past the completion of this research. Additional requirements may be imposed by your funding agency, your department, HIPAA, or other entities. (See Policy 1.9 on Retention of and Access to Research Data at <http://doresearch.stanford.edu/policies/research-policy-handbook>)

This institution is in compliance with requirements for protection of human subjects, including 45 CFR 46, 21 CFR 50 and 56, and 38 CFR 16.

Waiver of Individual Authorization under 45 CFR 164.512(i)(2)(ii)(A),(B),(C), pursuant to information provided in the HIPAA section of the protocol application.



Darrell M Wilson, M.D., Chair

Approval Period: 08/27/2020 - 01/21/2021**Review Type:** REGULAR - MODIFICATION**Funding:** National Institutes of Health - Grant: 1R01 AI149620, SPO: 145538**Assurance #:** FWA00000935 (SU)