



Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas



Projeto: Colaboração entre Brasil e EUA para pesquisa sobre imunidade e biomarcadores da tuberculose

Este projeto é constituído por 3 (três) Subprojetos, assim intitulados:

- I. Imunofenótipos associados à exposição a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de alta e baixa transmissão
- II. Avaliação de assinaturas genéticas para prognóstico de tuberculose em contatos domiciliares
- III. Avaliação de indivíduos resistentes à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

Pesquisadores Principais:

No Brasil:

Moisés Palaci, PhD – Professor - Núcleo de Doenças Infecciosas – (UFES)
Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, Vitória – ES, Brasil
CEP 29040-091 Tel/Fax: (55) 27 - 3335-7204 mpalaci@ndi.ufes.br

Reynaldo Dietze, MD, PhD – Professor Núcleo de Doenças Infecciosas – (UFES)
Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, Vitória – ES, Brasil
CEP 29040-091 Tel/Fax: (55) 27 - 3335-7204 E-mail: rdietze@ndi.ufes.br

Nos Estados Unidos da América

Jerrold Ellner, MD – Professor de Medicina

New Jersey Medical School, Rutgers, the State University of New Jersey 185
South Orange Avenue, Newark, NJ 07103, EUA Tel: (973) 972 8647 Fax: (973)
972 0713 E-mail: ellnerjj@njms.rutgers.edu

Equipe - Pesquisadores:

Nos Estados Unidos da América

Sudha Srinivasan, PhD, MPH

Chefe do programa da DMID:

Seção de TB, Hanseníase e Outras Doenças Micobacterianas DMID/NIAID

BG 5601FL RM 9E38 5601 Fishers Lane Rockville, MD 20852 Telephone: 240-
627-3062 sudha.srinivasan@nih.gov www.niaid.nih.gov

David Alland, MD – Professor e Chefe, Divisão de Doenças Infecciosas New
Jersey Medical School, Rutgers, The State University of New Jersey 185 South
Orange Avenue, MSB A-920C Newark, NJ 07103, EUA

Tel: (973) 972 2179 Fax: (973) 972 0713 E-mail: allandda@njms.rutgers.edu

Padmini Salgame, PhD – Professor de Medicina

New Jersey Medical School, Rutgers, the State University of New Jersey, 225
Warren Street, Newark, NJ 07103, EUA

Tel: (973) 972 8647 Fax: (973) 972 0713

E-mail: salgampa@njms.rutgers.edu

Carlos Acuna-Villaorduna, MD, MS – Pesquisador e Coordenador do Estudo
Professor Adjunto de Medicina Seção de Doenças Infecciosas

Boston University School of Medicine e

Boston Medical Center

850 Harrison Avenue, Dowling 3Boston, MA 02118, EUA

Tel: (617) 9713447

No Brasil

Rodrigo Ribeiro-Rodrigues, PhD – Pesquisador
Chefe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular
Núcleo de Doenças Infecciosas – (UFES)
Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, Vitória – ES, Brasil
CEP 29040-091 Tel: (55) 27 - 3335-7204 rodrigrr@ndi.ufes.br

Patrícia Marques - Pesquisadora do NDI-UFES
Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, Vitória – ES, Brasil
CEP 29040-091 Tel: (55) 27 - 3335-7204. pmarques@ndi.ufes.br

Solange Alves Vinhas – Pesquisadora do NDI-UFES
Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, Vitória – ES, Brasil
CEP 29040-091 Tel: (55) 27 - 3335-7204 svinhas@ndi.ufes.br

Brunelli da Rós Peruch, Técnica de Laboratório do NDI-UFES
Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, Vitória – ES, Brasil
CEP 29040-091 Tel: (55) 27 - 3335-7204 bperuch@ndi.ufes.br

Alunos de Pós-Graduação

Estudante de doutorado - Mariana Abou Mourad Ferreira - PPGDI
Estudante de mestrado - a ser definido - PPGDI

Locais de Estudo:

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Av. Marechal Campos, 1468
Maruípe, Vitória – ES, Brasil CEP 29040-091

New Jersey Medical School – Rutgers, The State University of New Jersey
185 South Orange Avenue, MSB I-506 - PO Box 1709
Newark, NJ 07103-1709, EUA

Frontier Science Foundation - Department of Biostatistics
1371 Beacon Street, Suite #203, Brookline, MA 02446 Phone: (617) 632-2000
Fax: (617) 860-6390

Agência Financiadora:

Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (National Institute of Allergy and
Infectious Diseases, NIAID) dos Estados Unidos da América. Número de protocolo
da DMID: Mecanismo de financiamento da DMID: U19-AI111276

Comitês de Ética em Pesquisa

New Jersey Medical Center, Rutgers, The State University of New Jersey
Institutional Review Board

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Cassiano Antônio de
Moraes ou CEP - HUCAM - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa ou CONEP

Observações Importantes a Respeito do Projeto:

I) Os três subprojetos assim intitulados:

1. Imunofenótipos associados à exposição a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de alta e baixa transmissão;
2. Avaliação de assinaturas genéticas para prognóstico de tuberculose em contatos domiciliares;
3. Avaliação de indivíduos resistentes à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*,

Foram aprovados pelos Comitês de ética em Pesquisa acima mencionados e serão realizados em conformidade com o protocolo de pesquisa, a Conferência Internacional de Harmonização para Boas Práticas Clínicas E6 (ICH-GCP) e os requisitos regulamentares aplicáveis:

a) Código de Regulamentos Federais dos EUA aplicável a estudos clínicos (45 CFR 46 -

Proteção de Sujeitos Humanos e 21 CFR, incluindo as partes 50 e 56 relacionadas ao consentimento livre e esclarecido, e regulamentos dos Comitês de Revisão Institucionais).

b) Conclusão e certificação do Treinamento em Proteção de Sujeitos Humanos em Pesquisas em todas as instituições participantes ou treinamento equivalente que atenda aos requisitos da Política do NIH "Treinamento Obrigatório em Proteção de Participantes Humanos em Pesquisas" (Comunicado OD-00-039), Data da Revisão: 25 de agosto de 2000.

II) As informações sobre os itens listados abaixo encontram-se disponíveis nos protocolos técnicos de pesquisa submetidos e aprovados pelo Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Brasil) e pelo The State University of New Jersey Institutional Review Board - New Jersey Medical Center, Rutgers:

1. Avaliação dos indicadores de resultado;
2. Especificação dos indicadores de resultado adequados;
3. Avaliação e relatórios de segurança;
4. Definição de Evento Adverso (EA);
5. Definição de Evento Adverso Sério (EAS);
6. Procedimentos de comunicação;

7. Detecção e comunicação de Eventos Adversos Sérios;
8. Regras de suspensão;
9. Estrutura de monitoramento clínico;
10. Plano de monitoramento local;
11. Considerações estatísticas;
12. Acesso aos dados/documentos originais;
13. Controle e garantia da qualidade;
14. Processo de consentimento livre e esclarecido;
15. Processo de autorização/consentimento livre e esclarecido (no caso de menores ou de outras pessoas com incapacidade de consentimento por si mesmas);
16. Confidencialidade dos participantes;
17. Uso futuro de amostras armazenadas;
18. Manipulação e registros dos dados;
19. Complementos/apêndices;
20. Lista de abreviaturas

ÍNDICE	Página
Equipe executora	02
Agência Financiadora	03
Comitês de Ética em Pesquisa	04
1. Subprojeto I: Imunofenótipos Associados à Exposição a Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de Alta e Baixa Transmissão	07
1.1 Resumo do protocolo	07
1.2 Histórico	07
1.3 Justificativa	08
1.4 Objetivos	09
1.5. Desenho do estudo	09
1.6. População do Estudo	10
1.7. Critérios de Inclusão	12
1.8 Avaliações/exames laboratoriais	13
1.8.1 Coleta de amostras	13
1.8.2 Ensaio para detecção de gama interferon (IGRA)	14
1.8.3 Teste de anticorpos SARS Cov-2	14
1.8.4 Ensaio ou procedimentos especiais	15
1.8.5 Análise transcriptômica	15
1.8.6 Reprogramação metabólica de macrófagos	15
1.8.7 Citometria de fluxo multiparamétrica	15
1.8.8 Funções das células T de memória efetora	16
1.8.9 Coleta, preparação, manuseio e envio de amostras	16
1.9 Cronograma do Estudo	17
1.9.1 Informações gerais sobre a participação	17

1.10 Considerações Estatísticas	17
1.10.1 Considerações sobre o tamanho da amostra	17
1.10.2 Plano de análise	17
1.10.3 Hipótese	18
1.11 Referências	18
2. Subprojeto II: Avaliação de assinaturas genéticas para prognóstico de tuberculose em contatos domiciliares	19
2.1 Resumo do protocolo	19
2.2 Histórico	19
2.3 Justificativa	20
2.4 Objetivos	21
2.5. Desenho do estudo	21
2.6. População do Estudo	22
2.6.1 Critério de inclusão	25
2.7 Avaliações/Análises Laboratoriais	27
2.7.1 Ensaios ou Procedimentos Especiais	27
2.7.2. Análise Transcriptômica	27
2.7.3 Análise Proteômica	28
2.7.4 Citometria de Fluxo Multiparamétrica	28
2.7.5 Teste de Anticorpos SARS Cov-2	28
2.8 Coleta, preparo, manuseio e Envio de Amostras	28
2.9 Considerações Estatísticas	29
2.9.1 Considerações sobre o tamanho da amostra	29
2.9.2 Plano de análise	29
2.10 Referências	29
3. Subprojeto III: Avaliação de indivíduos resistentes à infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
3.1 Resumo do protocolo	32
3.2 Histórico	32
3.3 Justificativa	33
3.4 Objetivos	33
3.5. Desenho do estudo	34
3.6. População do Estudo	34
3.6.1 Critério de inclusão	36
3.6.2 Critério para a Exclusão de Participantes	36
3.7 Ensaios ou Procedimentos Especiais	37
3.8 Coleta, preparação, manuseio e envio de amostras	37
3.9 Considerações Estatísticas	38
3.9.1 Considerações Sobre o Tamanho da Amostra	38
3.9.2 Plano de análise	38
3.10 Referências	39

4. Benefícios e Riscos em Potencial	39
5. Divergências em Relação ao Protocolo	40
6. Política de Publicação	40

1.1 RESUMO DO PROTOCOLO

- Título:** Colaboração entre Brasil e EUA sobre bactérias e hospedeiros na transmissão da TB
- População:** Contatos domiciliares expostos a casos de TB pulmonar comprovados por cultura de alta e baixa transmissão.
- Número de locais:** Dois - Núcleo de Doenças Infecciosas, Vitória, Brasil, e New Jersey Medical School, Rutgers, The State University of New Jersey, Newark, Nova Jersey
- Duração do estudo:** Dois anos.
- Duração da participação dos voluntários:** A maioria dos participantes fará apenas uma visita para o estudo. Os participantes de domicílios caracterizados como “baixa transmissão” e que tiverem resultado de IGRA positivo, terão uma segunda visita.
- Tamanho da amostragem:** Aproximadamente 100 contatos domiciliares expostos a isolados de *M. tuberculosis* de alta transmissão e aproximadamente 100 contatos domiciliares expostos a isolados de *M. tuberculosis* de baixa transmissão, arrolados previamente em outros estudos

1.2. Histórico

A Tuberculose (TB), em locais de alta carga, desenvolve-se logo após a infecção primária e raramente ocorre após os primeiros 2 anos, a menos que surjam comorbidades (1). A terapia preventiva da infecção primária nos contatos é uma estratégia insuficiente nos países com grande carga de TB, porque a transmissão contínua leva a uma recidiva nos casos de TB após a interrupção do tratamento (2, 3). Portanto, as medidas de saúde pública devem focar-se na aplicação de novas intervenções para interromper a transmissão onde estiver ocorrendo e no devido tempo. É fundamental compreender melhor as interações

bactéria-hospedeiro para permitir o desenvolvimento de vacinas e medicamentos que tratem da transmissão da TB. A transmissão representa uma sucessão de eventos em que: (1) um caso original de TB gera partículas infecciosas que (2) sobrevivem no ar e são inaladas por uma pessoa vulnerável que (3) é infectada quando a imunidade inata deixa de destruir o *M. tuberculosis* (Mtb) inalado e, em seguida, (4) desenvolve a doença TB quando a imunidade adquirida é incapaz de controlar a infecção. Embora a transmissão seja considerada um processo homogêneo, nosso grupo mostrou que algumas cepas de *M. tuberculosis* são mais eficientes para gerar a infecção e levam a diferentes descobertas patológicas no modelo animal. A partir do nosso trabalho anterior, identificamos domicílios com transmissão alta (AT) e baixa (BT) de *M. tuberculosis*, contatos próximos expostos a cepas de alta transmissão tiveram diferentes respostas imunológicas e leituras IGRA mais fortes em comparação com aqueles expostos a cepas de baixa transmissão. Dados preliminares mostraram aumento da expressão de IL-1b e PGE2 em macrófagos de indivíduos AT em comparação com BT; além disso, isolados de Mtb-AT e Mtb-BT regulam negativamente a expressão de certos lipídios quando expostos a condições de hipóxia. Nossa hipótese é que isolados de Mtb-AT induzem rápida reprogramação metabólica da imunidade inata, resultando em aumento da glicólise e aumentos associados na produção de IL-1b e PGE2; enquanto os isolados de Mtb-BT induzem um ambiente intracelular mais permissivo ao inibir a glicólise e a subsequente produção de IL-1b e PGE2, em vez de reprogramar o macrófago para a produção de IFN tipo I que é permissiva à infecção. Outras respostas diferenciais incluem autofagia, apoptose, indução de MMP e formação de corpos lipídicos. No presente trabalho, planejamos avaliar as respostas imunológicas em domicílios com AT e BT anos após a exposição inicial.

1. 3 Justificativa

Para atingir as metas da estratégia de TB FIM estabelecidas pela OMS para 2025, é necessária uma redução constante na incidência de TB em 4-5% ao ano. As estratégias atuais de controle da TB, incluindo o diagnóstico precoce e o tratamento de casos infecciosos, provavelmente não atingirão os pontos finais necessários para a eliminação da TB, pois o número contínuo de indivíduos infectados sustenta a epidemia de TB. Nesse contexto, a identificação de determinantes bacterianos e do hospedeiro para a transmissão bem-sucedida do *M. tuberculosis* provavelmente terá um grande impacto no controle da TB. Compreender as vias imunológicas associadas à transmissão bem-sucedida permitiria o desenvolvimento de intervenções destinadas a interromper a transmissão da TB. Este estudo de caso-controle alinhado baseia-se na identificação de indivíduos expostos a casos de TB com fenótipo de "alta" e "baixa" transmissão, e seus biomarcadores e concomitantes imunológicos associados. Aplicaremos uma série de novas tecnologias de vanguarda para descobrir marcadores imunológicos associados ao fenótipo de alta transmissão. A abordagem de contato domiciliar tem várias vantagens: a intensidade e o

momento da exposição e infecção podem ser determinados em circunstâncias definidas, e os mecanismos imunes inatos que protegem contra a infecção de *M. tuberculosis* podem ser avaliados de maneira controlada.

1.4. Objetivos

O objetivo do estudo é descobrir e validar marcadores imunológicos associados ao fenótipo de alta transmissão e caracterizar a resposta inata do macrófago a cepas de alta e baixa transmissão e examinar a resposta de células T em pessoas com exposição familiar conhecida a cepas de alta e baixa transmissão. Além disso, iremos identificar o componente dos genes Mtb que auxiliam na sobrevivência bacteriana em aerossóis. Aspectos exclusivos da colaboração EUA-Brasil facilitarão o progresso em direção a essas metas ambiciosas. Em Vitória, Brasil, no NDI, há populações expostas a fenótipos de *M. tuberculosis* de alta e baixa transmissão e acesso a uma extensa coleção de cepas de Mtb com banco de dados clínico acessível, excelente infraestrutura para estudos e capacidade laboratorial para pesquisas clínicas avançadas em imunologia e microbiologia. Em Newark, NJ, na Rutgers, há experiência em pesquisa básica sobre a resposta imune inata e adaptativa à TB e mecanismos de evasão do sistema imunológico ao *M. tuberculosis*, bem como instalações de laboratório para plataformas de RNAseq de célula única e em massa, proteômica, 12 parâmetros avançados capacidade de citometria de fluxo alojada em uma instalação BSL3 e experiência em tecnologia CyTOF para perfis de alta dimensão de células do sistema imunológico. Em Newark, NJ, na Rutgers University, há especialização em imunologia da TB, condução de estudos clínicos internacionais, epidemiologia e gerenciamento de dados.

1.5. Desenho do estudo

Neste estudo, iremos reconstituir os contatos domiciliares de 50 famílias de três estudos anteriores (ICIDR-1, ICIDR 2, TBRU) conduzidos em Vitória de 2008-2018. Com base na caracterização prévia da cepa de *M. tuberculosis*, identificaremos 25 domicílios com cepa de alta transmissão (AT) e 25 domicílios com cepa de baixa transmissão (BT). Vamos reconstituir todos os contatos domiciliares ≥ 6 anos e realizar um teste IGRA e o teste SARS-CoV-2 IgG. Para crianças menores de 18 anos, obteremos o consentimento da criança e o consentimento dos pais. Obteremos uma amostra de sangue de participantes que vivem em domicílios com AT e / ou são IGRA positivos para PBMC, plasma e PaxGene. Um contato domiciliar (HHC) é definido como um indivíduo de qualquer idade que teve um tempo significativo de contato com o caso índice por pelo menos três meses antes da inclusão no estudo e os contatos sabidamente infectados pelo HIV serão excluídos. (Definição do contato domiciliar nos estudos prévios mencionados) *. A equipe do estudo pedirá consentimento aos participantes para (1) obter uma amostra de sangue e (2) realizar uma entrevista clínica / exame físico.

1.6 População do Estudo

O NDI foi criado em 1990 como sendo parte do Departamento de Medicina Social da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e está localizado no Campus de Ciências da Saúde, da UFES, em Vitória. Em colaboração estreita com os Programas de TB da região metropolitana de Vitória, o Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) organizou uma rede local de laboratórios de micobacteriologia para integrar os laboratórios locais de TB e facilitar o diagnóstico e arrolamento de pacientes elegíveis nos estudos de TB. A rede contém atualmente cinco laboratórios locais - Vitória, Cariacica, Serra, Villa Velha, e o Laboratório de Referência Estadual-LACEN-ES. Uma vez que cada laboratório de TB é capaz de realizar tanto o esfregaço para pesquisa de micobactéria como a cultura (método de Ogawa-Kudod), a rede do NDI detecta e armazena cepas de *M. tuberculosis* de mais de 90% de todos os casos de TB que ocorrem dentro da área metropolitana da grande Vitória. Com base em estudos anteriores realizados no mesmo local, esperamos que a maioria dos participantes do estudo recrutados sejam urbanos, economicamente desfavorecidos, soronegativos para HIV e aderentes ao tratamento (2). Alguns estarão desnutridos devido a pobreza ou alcoolismo. Espera-se que menos de 10% dos participantes potenciais, apresentem fatores de risco conhecidos por infecção por HIV ou AIDS. A taxa estimada de analfabetismo nessa área é de cerca de 20%. No entanto, com base em estudos anteriores, quase todos os participantes arrolados nesse mesmo local (99%), forneceram consentimento por escrito. A grande maioria, sem a necessidade da ajuda de uma testemunha. A epidemiologia básica de tuberculose na região metropolitana de Vitória é bastante conhecida. Estudos anteriores obtiveram dados sobre a prevalência da vacina BCG e a prevalência de infecção por TB na comunidade (Dietze, 2004, não publicado) e em domicílios com casos de TB (1). Além disso, a partir de nossas coortes anteriores na região metropolitana de Vitória, sob a égide do ICIDR e TBRU, analisamos os dados de 400 casos de TB confirmados por cultura e 1.250 contatos domiciliares identificados por meio da rede do NDI, nos Programas de Controle de TB de Vitória, Cariarica, Vila Velha e Serra, entre 2008 e 2019(or 2018?). As informações relevantes desses estudos estão resumidas na tabela abaixo.

Tabela 1: Epidemiologia dos casos de TB em Vitória - Brasil (os dados foram coletados de três estudos diferentes).

Característica	Estimativa
Casos-Índice de TB	
Idade (média)	35 [23-44] anos
Homens	67%
Vacina BCG	51%
Escarro BAR $\geq 2+$	85%
Cavitações (raio X)	73%
Contatos domiciliares	
Número de contatos	3-5
Idade (média)	21 [10-39] anos
Vacina BCG	
≤ 15 anos	95%
> 15 anos	65%
Endurecimento pelo TST	
Média	7 mm
≥ 10 mm	41%

De 2008 a 2012, 160 casos positivos de TB e 898 contatos domiciliares foram arrolados sob a égide do ICIDR-1. Dentre eles, 538 (60%) viviam em domicílios classificados como sendo de alta transmissão. De 2012 a 2015, 268 contatos domiciliares com TSTs negativos foram arrolados sob a égide do ICIDR-2. Após a análise dos registros da pesquisa, um total de 600 contatos domiciliares tinham TST implementado e, dentre eles, 240 (40%) viviam em domicílios considerados de alta transmissão. De 2015 a 2018, 400 contatos domiciliares com testes TST positivos foram arrolados sob a égide do TBRU. Após a análise dos registros da pesquisa, um total de 600 contatos domiciliares tinham TST implementado e, dentre eles, 240 (40%) viviam em contatos domiciliares de alta transmissão.

Esperamos que 510 familiares, incluindo 1.418 contatos domiciliares arrolados em coortes anteriores, estejam disponíveis para obtenção de um novo consentimento. Visitaremos 50 domicílios com AT e 50 domicílios com BT. Como cada família possui, em média, 4 contatos domiciliares, pretendemos analisar novamente 200 contatos domiciliares que vivem em famílias com AT e 200 contatos domiciliares que vivem em famílias com BT. As seguintes definições do estudo serão aplicadas a este estudo: Casos-Índice de TB: Todos os adultos (≥ 18 anos) não infectados por HIV com diagnóstico de TB pulmonar com pelo menos um resultado positivo de baciloscopia de escarro - BAAR ($\geq 1+$), ou GeneXpert, realizados pelos laboratórios municipais de Vitória, Vila Velha, Serra e Cariacica. Todas as culturas de MTB foram armazenadas no laboratório de Micobacteriologia do NDI. Os casos-índices aceitáveis com base na baciloscopia de escarro ou GeneXpert, mas que permaneceram negativos para a cultura (ou contaminados) após 8 semanas de incubação, foram excluídos de nossas coortes anteriores. Contatos Domiciliares (CD): Para os objetivos

deste estudo, e de acordo com a definição usada em nossos estudos anteriores, um contato domiciliar foi definido como um indivíduo de qualquer idade, que apresentava pelo menos um dos quatro critérios abaixo de contato próximo com o caso-índice de TB, por pelo menos três meses antes do arrolamento no estudo anterior:

- 1) Dormir no mesmo local que o caso-índice por, pelo menos, 5 dias por semana;
- 2) Compartilhar pelo menos uma refeição por dia com o caso-índice por, pelo menos, 5 dias por semana;
- 3) Assistir à televisão (ou equivalente) junto com o caso-índice por, pelo menos, 5 dias por semana ou nos fins de semana;
- 4) Qualquer outra forma de contato próximo com o caso-índice considerada significativa pela equipe do estudo (a natureza do contato deve ser especificada).

Contatos domiciliares com alta transmissão (AT): Para os fins deste estudo, os contatos com AT foram definidos como moradores de residências onde 70% ou mais dos contatos domiciliares apresentaram indícios de infecção por *M. tuberculosis* conforme definido por um TST ≥ 10 mm.

Contatos domiciliares com baixa transmissão (BT): Os contatos com BT foram definidos como moradores de residências onde 30% ou mais dos contatos domiciliares apresentaram indícios de infecção por *M. tuberculosis* conforme definido por um TST ≥ 10 mm. A presença ou ausência de infecção por MTB no contato domiciliar participante terá como base os resultados do TST já realizado nos estudos anteriores. A seguinte definição será usada:

- Teste tuberculínico (TST) positivo. Os participantes desta categoria possuem resultado do TST ≥ 10 mm. Esses indivíduos serão considerados portadores de infecção latente por TB.

1.7 Critérios de Inclusão

Para uniformizar a exposição entre as famílias e reduzir os fatores relacionados ao caso-índice por conta da transmissão do MTB e infecção do contato domiciliar, nossas coortes anteriores registraram casos-índice de TB não infectados por HIV que possuíam resultado de baciloscopia ($\geq 1+$) ou resultado positivo para GeneXpert e, cultura positiva (Ogawa-Kudoh). As características do caso-índice (histórico de TB, resultados de radiografia de tórax etc.) foram registradas em documentos fonte e CRFs do estudo, e todas as cepas de MTB dos casos de TB registrados como casos-índice foram armazenadas no laboratório de Micobacteriologia do NDI. Para o estudo, avaliaremos contatos domiciliares com indícios de infecção por *M. tuberculosis* que vivem em domicílios de transmissão (casos) com AT e seus respectivos controles.

Definição de caso (contatos domiciliares que vivem em domicílios com AT): Todos os casos devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

- Cumprir um dos quatro critérios de contato próximo com o caso-índice (definidos no estudo anterior).
- Viver em domicílio com AT de acordo com nossa definição.
- Estar disposto e poder fornecer consentimento/autorização por escrito e seguir os procedimentos do estudo.

Definição de controle:

Os controles devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

- Cumprir um dos quatro critérios de contato próximo com o caso-índice (definidos no estudo anterior).
- Viver em domicílio com BT de acordo com nossa definição.
- Estar disposto e poder fornecer consentimento/autorização por escrito e seguir os procedimentos do estudo.

Crítérios para a exclusão de participantes

- Não ser capaz de fornecer/realizar exames ou procedimentos do estudo na triagem e na linha de base.
- Fazer uso de imunossuppressores, como bloqueadores do fator de necrose tumoral (TNF) ou esteroides sistêmicos por pelo menos 2 meses.
- Crianças menores de 5 anos.
- A critério do pesquisador.
- Contraindicação a qualquer procedimento do estudo, conforme determinado por um clínico ou pesquisador responsável.

1.8 Avaliações/exames laboratoriais

1.8.1 Coleta de amostras - Amostras de sangue periférico (Tabela 2):

Conforme mostrado na Tabela 2, o volume máximo de sangue coletado na linha de base será de 39 mL em adultos (≥ 18 anos), 29 mL em adolescentes (13-17 anos) e 19 mL em crianças (6-12 anos).

HHCs em famílias com AT: obteremos sangue periférico na linha de base de acordo com a idade, conforme indicado na Tabela 2 abaixo. A amostra de sangue será usada para (a) teste IGRA, (b) teste SARS-CoV-2 IgG, (c) experimentos imunológicos / tubos PaxGene (somente HHCs IGRA positivos).

Tabela 2: Volume de sangue dos participantes do estudo por idade

Finalidade do sangue	Contatos domiciliares com idade entre 6 e 12 anos	Contatos domiciliares com idade entre 13 e 17 anos	Contatos domiciliares com idade superior a 18 anos
IGRA*	3 ml	3 ml	3 ml
Pax Gene (somente para HHCs com resultado de IGRA positivo)	3 ml	3 ml	3 ml
Imunologia (somente para HHCs com resultado de IGRA positivo)	10 ml	20 ml	30 ml
SARS-CoV-2 IgG	3 ml	3 ml	3 ml
Total	19 ml	29 ml	39 ml

* O teste IGRA requer 3 ml de sangue. O IGRA usado será o Quantiferon-TB Gold Plus (Cellestis, Austrália)

1.8.2 Ensaios para detecção de gama interferon (IGRA): Este estudo usará o QuantiFERON-TB Gold Plus® (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Austrália) aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 2015 como um auxílio para a detecção de infecção por *M. tuberculosis* latente. Trata-se de um diagnóstico in vitro que mede um componente da reatividade imune mediada por células para *M. tuberculosis* e baseia-se na quantificação de interferon-gama (IFN-g) liberado por linfócitos sensibilizados no sangue total incubado por 24 horas com derivado proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis* e antígenos de controle. Em estudos de campo, demonstrou sensibilidade semelhante com especificidade aprimorada quando comparada aos resultados do TST.

1.8.3 Teste de anticorpos SARS Cov-2: Avaliaremos a presença de testes de anticorpos IgG para SARS Cov-2 usando a plataforma Abbot. A plataforma permite a detecção qualitativa (positiva ou negativa) de anticorpos para SARS Cov-2. Vamos testar apenas os anticorpos IgG que normalmente aparecem após 14 dias de infecção; portanto, não se trata de doença aguda, mas sim de exposição prévia. O teste de anticorpos será realizado no laboratório de imunologia do NDI.

1.8.4 Ensaios ou procedimentos especiais

Será investigado a resposta imune inata dos macrófagos após exposição às cepas de AT e BT de *M. tuberculosis* e avaliaremos as respostas das células T após exposição a *M. tuberculosis* de diferentes transmissibilidades. As análises abaixo serão usadas:

1.8.5 Análise transcriptômica: Adotaremos uma abordagem ampla e imparcial para apurar a resposta distinta dos macrófagos induzida pelos isolados de AT e BT de *M. tuberculosis*. O perfil transcricional por RNA-seq será realizado por meio de uma análise de vias e redes. Analisaremos especificamente se há diferenças nos genes associados à bioenergética celular, ao estado oxidante celular e à síntese de ácidos graxos. Além disso, apuraremos os dados de RNA-seq em busca de alterações nas vias citocinas e imunológicas para obter uma melhor compreensão dos mecanismos que controlam as vias antimicobacterianas e destrutivas de tecidos em macrófagos.

1.8.6 Reprogramação metabólica de macrófagos: O analisador de fluxo extracelular XF24 (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA) será utilizado para determinar o perfil bioenergético dos macrófagos após infecção por cepas de AT e BT. A taxa de consumo de oxigênio (TCO) e a taxa de acidificação extracelular (ECAR) serão registradas nas células infectadas por até 72 horas para avaliar a atividade respiratória mitocondrial e a atividade glicolítica. Para estabelecer uma ligação funcional entre o metabolismo de macrófagos hospedeiros e o crescimento de *M. tuberculosis*, serão testados os efeitos dos inibidores metabólicos 2-DG (glicólise) e etomoxir (ETO; oxidação de ácidos graxos) no crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos derivados de monócitos. O perfil bioenergético também será monitorado por meio da medição da secreção de lactato usando kits de ensaio de quantificação fluorométrica (Biovision). A expressão de IL-1 β , IFN tipo I e PGE2 será avaliada em sobrenadantes de macrófagos infectados. Também serão analisadas a autofagia e apoptose, que são vias fortemente ligadas ao imunometabolismo de macrófagos e que restringem o crescimento intracelular de *M. tuberculosis*.

1.8.7 Citometria de fluxo multiparamétrica: No contexto único em que o *M. tuberculosis* pode estar contido em um estado latente após a infecção primária, propomos que a resposta imune adquirida precoce e o desenvolvimento das células de memória possam proteger contra a evolução da doença. Não se sabe se a resposta da célula T de memória varia dependendo do host infectado com cepas de AT ou BT. A fenotipagem das células T de memória será realizada utilizando-se citometria de fluxo multiparamétrica. As células serão estimuladas com peptídeos ESAT6 e CFP10, e será realizada a coloração intracitoplasmática por IFN α , IL-17, IL-2 e TNF. Para identificar subconjuntos de memória, avaliaremos a expressão da superfície de isótipos CD45RA e CD45RO, CCR7, CD27 e CD95, que são expressos de forma diferenciada nas populações de

memória-alvo de T-SCM: células T de memória; T-EMRA: células T de memória RA com reexpressão de CD45RA; T-CM: células T de memória central; T-EM: células T de memória efetora; T-TM: células T de memória de transição. Os dados adquiridos serão analisados por meio do software FlowJo (Tree Star Inc., OR, EUA) para caracterizar proporções de subconjuntos de memória específicos para antígenos de *M. tuberculosis*. As diferenças estatísticas em uma proporção de um subconjunto de memória específico podem ser comparadas entre os grupos clínicos por análise de variância. Também avaliaremos o valor preditivo de proporções de subconjuntos de memória, como T-CM em comparação com T-EM pela análise ROC. Os dados de fluxo também serão analisados por meio de uma estrutura computacional para análise de multifuncionalidade combinatória imparcial de subconjuntos de células T específicas ao antígeno (COMPASS), disponível como software de código aberto. CyTOF: Além disso, executaremos o CyTOF, uma abordagem agnóstica de alta dimensão para analisar simultaneamente as redes de sinalização intracelular e obter a caracterização fenotípica das células T de memória. O CyTOF tem o potencial de revelar novos subconjuntos de células T específicas para o antígeno Mtb que podem ter sido modulados diferencialmente pelas cepas de Mtb com AT e BT. Os dados serão analisados com o software Cytobank.

1.8.8 Funções das células T de memória efetora: As descobertas do FLOW e do CyTOF identificarão os subconjuntos principais de células T que são expressos diferencialmente em vários grupos. Em um pequeno número (5) de cada grupo, faremos estudos funcionais adicionais. O subgrupo específico de células T de memória será classificado e testado em experimento autólogo de cocultura de macrófagos para determinar seu potencial e controlar o crescimento de Mtb. As células classificadas serão posteriormente analisadas por RNA-Seq. Dependendo da análise da via, bloquearemos as novas vias descobertas para testar se controlam o crescimento do *M. tuberculosis* usando as ferramentas disponíveis (anticorpos e silenciamento de genes).

1.8.9 Coleta, preparação, manuseio e envio de amostras:

Enviaremos vários tipos de amostra de sangue ao laboratório Salgame, incluindo amostras em série de PBMC purificadas, sobrenadantes Quantiferon e RNA total de PBMCs estimuladas. As amostras de sangue serão acondicionadas e enviadas em conformidade com as regras da IATA. Ao receber as amostras de sangue, cada amostra será rotulada e processada de acordo com os POPs aprovados pelo IBC. Os usos das amostras podem incluir, entre outros, estudos imunológicos funcionais, medições de citocinas e quimiocinas, ensaios metabólicos, expressão gênica e estudos proteômicos. Métodos apropriados de nível de biocontenção de BSL3 e eliminação de resíduos serão empregados no manuseio e processamento das amostras de sangue. Aprovações apropriadas do IBC e CRI serão obtidas antes da análise com as amostras de sangue. Todas

as pessoas que manusearem as amostras de sangue terão concluído o treinamento em agentes patogênicos transmitidos pelo sangue.

1.9 Cronograma do Estudo

1.9.1 Informações gerais sobre a participação

O Apêndice A do protocolo aprovado pela CONEP contém a lista dos procedimentos que serão realizados neste estudo. Todos os participantes deverão concluir todas as avaliações. Os resultados de todos os procedimentos relevantes de estudos médicos aprovados serão registrados no prontuário do participante. Os resultados de todos os procedimentos relevantes de estudos médicos serão registrados nos formulários de relatório de caso do participante. Todas as avaliações de estudos não laboratoriais (avaliações clínicas, teste IGRA) serão realizadas nos postos de estudo identificados. Todos os testes laboratoriais padrão serão realizados na rede de laboratórios de TB do NDI. A primeira etapa do presente estudo envolverá a identificação de indivíduos que poderiam atender à definição de contato domiciliar com indícios de infecção por *M. Tuberculosis* em contatos domiciliares com AT e BT a partir de coortes previamente arroladas. Isso será feito por meio da análise manual de arquivos de pesquisa dos estudos da ICIDR e TBRU realizados entre 2008 e 2018. Após identificar as 25 famílias AT e 25 BT, nossa equipe entrará em contato com o chefe de cada família selecionada para apresentar o estudo. Se os membros da família mostrarem interesse em participar, os mesmos serão solicitados a visitar a clínica para arrolamento / consulta inicial.

1.10. Considerações Estatísticas

1.10.1 Considerações sobre o tamanho da amostra

Identificaremos 25 famílias de AT e 25 de BT, de três estudos anteriores, para participação neste estudo. Como cada família inclui 4 HHCs em média, prevemos arrolar 100 HHCs de famílias AT e 100 HHCs de famílias BT.

1.10.2 Plano de análise

A análise detalhada da avaliação dos objetivos do estudo será delineada no plano de análise estatística (SAP). Quando apropriado, testes estatísticos não paramétricos, como o teste Wilcoxon Rank Sum, serão usados para comparar a quantidade de expressão diferencial para cada um dos parâmetros entre os grupos. Usaremos modelos de regressão separados com cada uma das combinações possíveis dos diferentes parâmetros para determinar a combinação que tem a maior capacidade de diferenciar as respostas de macrófagos e células T em HHCs que vivem em famílias AT vs BT.

1.10.3 Hipótese

Esperamos ver níveis aumentados de IL-1 β , IFN tipo I e PGE2 em indivíduos que vivem em domicílios com AT em comparação com indivíduos de domicílios com LT. Da mesma forma, as expressões de MMP-9 serão aprimoradas em domicílios com AT. Essas variáveis serão comparadas em domicílios AT vs BT usando testes estatísticos paramétricos e não paramétricos.

1.11. Referências

1. Djoba Siawaya JF, Bapela NB, Ronacher K, Veenstra H, Kidd M, Gie R, et al. Immune parameters as markers of tuberculosis extent of disease and early prediction of anti-tuberculosis chemotherapy response. *J Infect.* 2008;56(5):340-7. Epub 2008/03/25. doi: S0163-4453(08)00084-4 [pii]
2. Teixeira L, Perkins MD, Johnson JL, Keller R, Palaci M, do Valle Dettoni V, et al. Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5(4):321-8. PubMed PMID: 11334250.
3. Bierrenbach AL, Cunha SS, Barreto ML, Pereira SM, Dourado I, Ichihara MY, et al. Tuberculin reactivity in a population of schoolchildren with high BCG vaccination coverage. *Rev Panam Salud Publica.* 2003;13(5):285-93. PubMed PMID: 12831432.
4. Jones-López EC, Kim S, Fregona G, Marques-Rodrigues P, et al. Importance of cough and *M. tuberculosis* strain type as risks for increased transmission within households. *PLoS One.* 2014 Jul 2;9(7): e100984. PubMed PMID: 24988000.
5. "Manual de Recomendações. Para o Controle da Tuberculose No Brasil. Ministerio Da Saúde. Brasília, 2011.

2. SUBPROJETO II: Avaliação de assinaturas genéticas para prognóstico de tuberculose em contatos domiciliares

2.1 RESUMO DO PROTOCOLO

Título:	Colaboração entre Brasil e EUA em imunidade e biomarcadores em tuberculose – Avaliação de assinaturas genéticas para prognóstico de tuberculose em contatos domiciliares.
Amostragem:	Contatos domiciliares com teste TST/IGRA positivo em Vitória, Brasil
Número de locais:	Dois - Núcleo de Doenças Infecciosas, Vitória, Brasil, e New Jersey Medical School, Rutgers, The State University of New Jersey, Newark, Nova Jersey
Duração do estudo:	Um ano.
Duração da Participação:	Contatos domiciliares de coortes previamente inscritos com TST/IGRA positivo.
Tamanho da amostra:	<u>Inscritos anteriormente:</u> 400 contatos domiciliares com TST/IGRA positivo e 70 contatos domiciliares com TB secundária.

2.2 Histórico

A tuberculose (TB) é a principal causa de mortalidade por doenças infecciosas. Em 2018, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou uma incidência de 9,6 milhões de novos casos e 1,5 milhões de mortes atribuídas à TB (1). Após a exposição a um caso-índice de TB pulmonar, há três possibilidades: um grupo de indivíduos controla a infecção e elimina o organismo ("autocura"); um segundo grupo controla o organismo, mas permite que ele persista em um estado não replicante gerando foco para futura reativação da doença ("tuberculose infecção latente" ou TBIL); e um terceiro grupo não controla completamente a infecção, progredindo para doença clínica nos primeiros anos após a infecção ("infecção progressiva"). A maioria dos indivíduos desenvolverá infecção latente (ILTB) e aproximadamente 5% dos casos evoluirão para doença ativa no período de dois anos (2). Até o momento, não há como discriminar entre os que evoluirão e os que não evoluirão para a doença ativa após a exposição. Os testes atualmente disponíveis para ILTB incluem o teste tuberculínico (TST) e os ensaios para detecção de interferon gama (IGRA), que não preveem bem

doença ativa. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com ILTB, o que torna inviável o tratamento em massa. A barreira fundamental para o amplo tratamento da ILTB como uma intervenção em saúde pública é a incapacidade de prever o curso subsequente de qualquer indivíduo quando infectado. Recentemente, o desenvolvimento de assinaturas genéticas no sangue mostrou-se promissora para prever resultados após a infecção latente por TB. Em estudos iniciais com adolescentes sul-africanos, uma nova assinatura (ASC- COR) revelou sensibilidade e especificidade de 60% a 70% para prever a evolução para TB ativa após 2 anos de acompanhamento (3). Estudos posteriores validaram, com precisão diagnóstica semelhante, a assinatura RISK-4 em quatro países africanos diferentes (4). No Brasil, nosso grupo desenvolveu o Predict29, uma nova assinatura que pode prever a evolução para TB ativa entre contatos próximos com sensibilidade de 74% e especificidade de 84% (5). Atualmente, a prevalência de diferentes assinaturas genéticas e sua validade, em locais diferentes dos já mencionados, ainda continua desconhecida. Da mesma forma, a persistência das assinaturas genéticas após a conclusão do tratamento para TB também é desconhecida. Além disso, os indivíduos que expressam assinaturas genéticas podem ainda desenvolver inflamação pulmonar, mesmo sem nenhuma doença clínica expressa (TB subclínica).

Tomografia PET-CT é uma técnica de imagem altamente sensível que pode detectar lesões ativamente metabólicas (6). Dados preliminares da África do Sul mostraram que 20% dos contatos próximos de casos de TB comprovados com cultura, têm resultados de PET-CT anormais de na ausência de doença clínica (Ellner et al, dados não publicados). Pressupomos que indivíduos com assinaturas genéticas positivas podem desenvolver lesões pulmonares assintomáticas que podem ser identificadas por meio de PET-CT altamente sensível. O objetivo da presente proposta visa avaliar a persistência de assinaturas genéticas após a conclusão do tratamento de TB e também avaliar a presença de lesões pulmonares assintomáticas por PET-CT em indivíduos com assinatura genética positiva usando análise transcriptômica.

2.3 Justificativa

Os biomarcadores que podem identificar indivíduos com risco de progredir para doença ativa após a exposição transformariam o controle da TB, permitindo direcionar a terapia preventiva aos participantes que mais se beneficiariam, o que seria uma abordagem econômica para eliminar aTB. Essa estratégia seria particularmente econômica em ambientes com recursos limitados. O estudo proposto tem como foco a validação de biomarcadores desenvolvidos anteriormente para prever resultados após a infecção por MTB. Empregaremos diversas novas tecnologias de ponta para validar biomarcadores preditivos de alto risco de evolução para doença a partir de amostras de sangue de contatos próximos previamente inscritos. A abordagem de contato domiciliar tem várias vantagens: a intensidade e o momento da exposição e infecção podem ser

determinados em circunstâncias definidas, e os mecanismos imunes inatos que protegem contra a infecção removem a possibilidade de ambos TB pós-primária e de reativação. Os biomarcadores preditivos são mais necessários para os contatos domiciliares de pacientes com TB pulmonar infecciosa (PTB), pois apresentam maior risco de desenvolver doença ativa e, portanto, são foco importante dos programas de controle da TB.

2.4 Objetivos

O objetivo do estudo é validar biomarcadores previamente desenvolvidos, preditivos de alto risco de TB após exposição em um estudo de coorte de contatos domiciliares de pacientes de TB no Brasil, determinar se os biomarcadores são modificados após o tratamento da TB e avaliar se esses biomarcadores preveem casos de TB subclínica. Os aspectos próprios da colaboração entre Brasil e EUA auxiliam no progresso para atingir esse objetivo ambicioso. Em Vitória, Brasil, no NDI, há acesso a populações previamente inscritas em estudos de contato domiciliar com exposição a MTB conhecida, um extenso grupo de cepas de MTB com um banco de dados clínico acessível, uma excelente infraestrutura para estudos clínicos e capacidade laboratorial para pesquisas clínicas avançadas em imunologia e microbiologia. Em Newark, NJ, na Rutgers, o grupo de pesquisa tem experiência com pesquisa básica sobre o desenvolvimento de biomarcadores para prever resultados após a infecção por M. tuberculosis, bem como instalações laboratoriais para microarranjos de RNA, proteômica e capacidade de citometria de fluxo avançado com 12 parâmetros, hospedados em uma instalação BSL3. A Rutgers, em NJ, possui experiência com imunologia contra TB, condução de estudos clínicos internacionais, epidemiologia e gerenciamento de dados.

2.5 Desenho do Estudo

O presente estudo incluirá dois componentes. O primeiro se concentrará em visitar novamente 70 contatos domiciliares que desenvolveram TB e obter novo termo de consentimento. Esses indivíduos foram anteriormente identificados como “progressores”, definidos como indivíduos que desenvolveram TB após contato próximo com um caso infeccioso. Neste estudo de caso-controle aninhado, cada “progressor” será comparado por idade e sexo com outro controle domiciliar, sem evolução para TB. O segundo componente se concentrará na validação da presença de assinaturas genéticas publicadas anteriormente. Amostras biorepositórias de um estudo de coorte anterior de 400 domicílios com contato próximo com o caso-índice, com TST/IGRA positivo, foram rastreadas para a presença de assinaturas genéticas positivas usando nossa análise transcriptômica. Será obtido novo termo de consentimento dos indivíduos com análise transcriptômica de assinatura genética positiva e estes serão arrolados no presente estudo. Da mesma forma, cada contato com uma assinatura genética positiva será comparado (idade, sexo e intensidade da exposição) a um controle negativo com análise de assinatura genética negativa.

Consentimento livre e esclarecido será solicitado aos participantes para: (1) coletar amostras adicionais de escarro, se necessário, para cultura, (2) fazer um raio -X de tórax, se necessário, (3) obter uma amostra de sangue e (4) realizar uma avaliação clínica, que inclui triagem de sintomas e avaliação ambiental. Para sujeitos com menos de 18 anos, será obtida autorização/consentimento dos pais e dos indivíduos, se for o caso. Um contato será definido como um indivíduo de qualquer idade que tenha tempo de contato significativo com o caso-índice por pelo menos três meses antes do arrolamento no estudo, e serão excluídos os contatos que sabidamente estão infectados pelo HIV. Um contato com exposição intensa (HE-CD) será definido como um indivíduo que dormiu no mesmo local que um caso de TB pulmonar com esfregaço positivo, por, pelo menos, 5 vezes por semana durante 3 meses, antes do diagnóstico do caso índice. Os progressores foram identificados a partir de estudos anteriores com contatos domiciliares realizados em Vitória entre 2008 e 2018, sob a égide do ICIDR e do TBRU; 70 progressores foram identificados e tratados de acordo com as diretrizes brasileiras para tuberculose. A equipe do estudo fará uma visita ao domicílio e obterá o consentimento para a triagem do indivíduo. Para crianças menores de 18 anos, o consentimento será dado pelos pais. A equipe do estudo solicitará o consentimento dos participantes para: (1) coletar amostras adicionais de escarro, se necessário, para cultura, (2) fazer um raio -X de tórax, se necessário, (3) obter uma amostra de sangue e (4) realizar uma avaliação clínica, que inclui triagem de sintomas e avaliação ambiental.

2.6 População do estudo

O NDI foi criado em 1990 como parte do Departamento de Medicina Social da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e tem sede no Campus do Centro Biomédico da UFES, em Vitória. A epidemiologia básica da tuberculose em Vitória é bem conhecida de estudos anteriores realizados sob a égide do ICIDR e do TBRU, de 2008 a 2019 (Tabela 1). Analisamos dados de 400 casos de TB confirmados por cultura e 1.250 contatos domiciliares identificados por meio da rede de laboratórios de diagnóstico de TB do NDI, nas unidades básicas de saúde (UBS) de Vitória, Cariacica, Vila Velha e Serra, de 2008 a 2019. A tabela abaixo mostra um resumo das informações relevantes desses estudos.

Tabela 1: Epidemiologia dos casos de TB em Vitória - Brasil (os dados foram coletados de três estudos diferentes).

Característica	Estimativa
Casos-Índice de TB	
Idade (média)	35 [23-44] anos
Homens	67%
Vacina BCG	51%
Escarro BAR $\geq 2+$	85%
Cavitações (raio X)	73%
Contatos domiciliares	
Número de contatos	3-5
Idade (média)	21 [10-39] anos
Vacina BCG	
≤ 15 anos	95%
> 15 anos	65%
Endurecimento pelo TST	
Média	7 mm
≥ 10 mm	41%

De 2018 a 2019, 340 casos de TB pulmonar e 1.566 contatos domiciliares foram arrolados sob a égide do ICIDR e do TBRU. Após uma média de 5 anos de acompanhamento, foram identificados 70 casos de TB secundária, 49 (70%) foram casos comprovados por cultura e 21 (30%) casos de TB com a cultura negativa. Presumimos que seremos capazes de localizar 60% desses casos e também esperamos uma taxa de cura dos pacientes com TB em Vitória de 95% a 99%. Portanto, esperamos conseguir obter novo consentimento de 42 progressores de nossas coortes anteriores na região metropolitana de Vitória. Da mesma forma, a partir da nossa coorte anterior do TBRU realizada entre 2015 e 2019, 400 contatos domiciliares com TST+ foram arrolados. Amostras de sangue estavam disponíveis em todos os 400 casos de TST+. Os dados preliminares da Índia (Ellner et al., não publicados) mostraram que 7% dos contatos domiciliares com TST+ mostram assinaturas genéticas em amostras de sangue. Acreditamos que esses participantes com assinatura genética positiva tenham um risco maior de evolução da TB, tanto clínica quanto subclínica. Presumimos que 28 contatos domiciliares de nossa coorte previamente inscrita apresentarão a assinatura genética em amostras de sangue. Dentre eles, seremos capazes de reconsiderar 20 contatos domiciliares que expressam uma assinatura genética positiva.

As seguintes definições do estudo, que foram utilizadas em nossos estudos de coorte anteriores, também serão aplicadas a este estudo:

Casos-Índice de TB: Todos os suspeitos de TB pulmonar, adultos (≥ 18 anos), não infectados pelo HIV, com pelo menos um resultado de baciloscopia de escarro (pesquisa BAAR) positivo ou GeneXpert MTB/RIF realizados em

qualquer laboratório da rede, afiliada ao NDI, nos municípios de Vitória, Vila Velha, Serra e Cariacica. Todas as culturas de MTB foram registradas no laboratório do NDI. Os casos-índice que foram aceitáveis com base na pesquisa de BAAR ou GeneXpert MTB/RIF, mas que permaneceram negativos para a cultura (ou contaminados) após 8 semanas de incubação, foram excluídos de nossas coortes anteriores.

Contatos Domiciliares (CD): Para os objetivos deste estudo, e de acordo com a definição usada em nossos estudos anteriores, um contato domiciliar é definido como um indivíduo de qualquer idade que satisfaça, pelo menos, um dos quatro critérios abaixo de contato próximo com o caso-índice de TB, pelo menos três meses antes do arrolamento no estudo:

- 1) Dormir no mesmo local que o caso-índice por, pelo menos, 5 dias por semana
- 2) Compartilhar pelo menos uma refeição por dia com o caso-índice por, pelo menos, 5 dias por semana
- 3) Assistir à televisão (ou semelhante) junto com o caso-índice por, pelo menos, 5 dias por semana ou nos finais de semana
- 4) Qualquer outra forma de contato próximo com o caso-índice considerada significativa pela equipe do estudo (a natureza do contato deve ser especificada)

Contatos domiciliares fortemente expostos (HE-CD): Para os propósitos deste estudo, os HE-CD serão definidos como aqueles que dormem no mesmo local que os casos-índice de TB por pelo menos três meses antes do arrolamento no estudo. A presença ou ausência de infecção por MTB no contato domiciliar participante terá como base os resultados do IGRAs. A seguinte definição será usada:

- IGRAs positivos. Os participantes desta categoria terão quantiferon gold plus $\geq 0,35$ UI/ml. Esses indivíduos serão considerados portadores TB infecção latente e, portanto, não considerados resistentes à infecção por *M. tuberculosis*.

A presença ou ausência de TB no contato domiciliar participante terá como base a definição de diretrizes brasileiras para tuberculose. 1. Presença de cultura positiva para *M. tuberculosis* em qualquer amostra clínica, 2. Presença de sintomas compatíveis com TB (tosse >3 semanas com sintomas sistêmicos), radiografia de tórax anormal (lobo superior, cavidades ou padrão miliar) e resposta ao tratamento empírico da TB, apesar das culturas negativas de *M. tuberculosis* (TB por cultura negativa).

A presença ou ausência de assinaturas genéticas em amostras de sangue será baseada no perfilador Nanostring pan de TB. O perfil de Nanostring utiliza 107 genes de 10 assinaturas genéticas diferentes publicadas anteriormente. As seguintes assinaturas serão medidas: assinatura genética Kaforou 27 (7),

assinatura genética Sambarey 10 (8), Jacobsen (9), assinatura genética Sweeney 3 (10) e assinatura genética Maertzdorf 4 (11). O Nanostring também inclui uma assinatura de falha do tratamento (resposta Thompson) (12) e as assinaturas de risco de evolução para doença: ACSCOR (3), RISK4 (4); e PREDICT29 (5). Em estudos preliminares, no sul da Índia, foram realizados os perfis de RNA derivados do sangue total de 100 adultos com TB pulmonar e 80 adultos com ILTB sem comorbidades. O painel completo de genes de TB e ILTB discriminados com AUC de 0,899 (0,852, 0,934). (Salgame, não publicado). Por fim, avaliaremos um novo teste de triagem desenvolvido pelo nosso grupo. Foi derivado um biomarcador de plasma, analito 6 que segrega TB de ILTB, por meio da realização de ELISA multiplex em amostras de plasma de uma coorte da Índia (Salgame, et al, não publicado).

Critério de inclusão

Para uniformizar a exposição entre domicílios e reduzir os fatores relacionados ao caso-índice por conta da transmissão de MTB e infecção do contato domiciliar, nossas cortes anteriores registraram casos-índice de TB, não infectados por HIV, com BAAR no escarro $\geq 1+$ ou GeneXpert MTB/RIF positivo e cultura positiva (meio Ogawa-Kudoh). As características do caso-índice (histórico de TB, resultados de radiografia de tórax etc.) foram registradas, e todas as cepas de MTB dos casos de TB registrados como casos-índice foram armazenadas no laboratório do NDI. Para o objetivo 1, avaliaremos contatos domiciliares que desenvolveram TB após exposição a um caso infeccioso (casos) e contatos domiciliares que não desenvolveram TB após uma exposição de intensidade semelhante a um caso infeccioso (controles).

Definição de caso (fenótipo progressor):

Todos os casos devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

- Fazer um diagnóstico de TB (diagnóstico clínico ou comprovado por cultura positiva).
- Estar disposto e poder fornecer termo de consentimento/autorização por escrito e seguir os procedimentos do estudo.

Definição de controle:

Todos os controles devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

2.6.1 Critério de inclusão

Para uniformizar a exposição entre domicílios e reduzir os fatores relacionados ao caso-índice por conta da transmissão de MTB e infecção do contato domiciliar, nossas coortes anteriores registraram casos-índice de TB, não infectados por HIV, com BAAR no escarro $\geq 1+$ ou GeneXpert MTB/RIF positivo e cultura positiva (meio Ogawa-Kudoh). As características do caso-índice (histórico de TB, resultados de radiografia de tórax etc.) foram registradas, e

todas as cepas de MTB dos casos de TB registrados como casos-índice foram armazenadas no laboratório do NDI.

Para o objetivo 1, avaliaremos contatos domiciliares que desenvolveram TB após exposição a um caso infeccioso (casos) e contatos domiciliares que não desenvolveram TB após uma exposição de intensidade semelhante a um caso infeccioso (controles).

Definição de caso (fenótipo progressor):

Todos os casos devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

- Fazer um diagnóstico de TB (diagnóstico clínico ou comprovado por cultura positiva).
- Estar disposto e poder fornecer termo de consentimento/autorização por escrito e seguir os procedimentos do estudo.

Definição de controle:

Todos os controles devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

- Atender à definição de infecção MTB por TST ou IGRAs
- Não ter indícios de TB.
- Estar disposto e poder fornecer consentimento/autorização por escrito e seguir os procedimentos do estudo.

Para os objetivos 2 e 3, avaliaremos contatos domiciliares que apresentaram uma assinatura genética positiva no perfilador de Nanostring pan de TB (casos) e contatos domiciliares que não apresentam uma assinatura genética (controles)

Definição de caso (fenótipo de assinatura genética):

Todos os casos devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

- Ter pelo menos uma assinatura genética positiva identificada pelo perfil Nanostring pan de TB.
- Estar disposto e poder fornecer termo de consentimento/autorização por escrito e seguir os procedimentos do estudo.

Definição de controle:

Todos os controles devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

- Atender à definição de infecção MTB por TST ou IGRAs
- Não ter indícios de expressão de assinatura genética no perfilador Nanostring pan de TB.
- Estar disposto e poder fornecer termo de consentimento/autorização por escrito e seguir os procedimentos do estudo.

Critério para a exclusão de participantes

- Não ser capaz de fornecer/realizar exames ou procedimentos do estudo na triagem e na

linha de base.

- Crianças menores de 5 anos
- A critério do pesquisador
- Contraindicação a qualquer procedimento do estudo, conforme determinado por um clínico ou pesquisador responsável

2.7 Avaliações/Análises Laboratoriais

Além das avaliações clínicas listadas acima, coletaremos sangue periférico do contato domiciliar arrolado para realizar a análise de assinatura genética proposta. A quantidade de sangue coletada de cada contato domiciliar varia de acordo com a idade, conforme indicado na Tabela 2 abaixo.

1. Amostras de sangue periférico (Tabela 2): Para participantes prospectivamente incluídos neste estudo de contato domiciliar, obteremos sangue periférico na linha de base (base line). Conforme mostrado na Tabela 2, o volume máximo de sangue na coleta de sangue da linha de base nos ensaios de imunologia e teste IGRA será de 36 mL em adultos (≥ 18 anos), 26 mL em adolescentes (13 a 17 anos) e 16 mL em crianças (5-12 anos).

Tabela 2: Volume de sangue a ser coletado dos participantes do estudo por idade

Finalidade do sangue	Contatos domiciliares com idade entre 5 e 12 anos	Contatos domiciliares com idade entre 13 e 17 anos	Contatos domiciliares com idade superior a 18 anos
IGRA	3 ml	3 ml	3 ml
Testes de HIV	3 ml	3 ml	3 ml
Pax Gene	3 ml	3 ml	3 ml
Assinatura genética	10 ml	20 ml	30 ml
Total	19 ml	29 ml	39 ml

2.7.1 Ensaios ou Procedimentos Especiais

No presente estudo, investigaremos a persistência de um biomarcador previamente desenvolvido (Predict29) após tratamento bem-sucedido da TB. Também avaliaremos a prevalência de assinaturas genéticas desenvolvidas anteriormente e sua correlação com resultados específicos da infecção por TB. Determinaremos a sensibilidade/especificidade desses biomarcadores no prognóstico da doença ativa da TB.

2.7.2. Análise Transcriptômica:

Usaremos o Sequenciamento Next-Generation da Illumina para detectar um padrão único de expressão de RNA nos leucócitos dos sujeitos em resposta à TB. Diversos estudos demonstraram que assinaturas transcricionais específicas

podem distinguir entre TB e outras doenças, entre TB ativa e ILTB e entre ILTB e não infecção em adultos. [31–36]

2.7.3 Análise Proteômica:

Usaremos tecnologia SOMAScan para detectar uma assinatura de expressão proteica que se correlacione com o resultado de infecção por TB.

2.7.4 Citometria de Fluxo Multiparamétrica: Usaremos a citometria de fluxo para separar e medir diferentes populações de células T com base na expressão das moléculas de superfície celular. A proporção de células T de memória central (TCM) e células T da memória efetora (TEM) pode ser usada como marcador de carga bacteriana e persistência no hospedeiro [37,38] e cogitamos a hipótese de que seja preditivo do estágio da doença após a infecção. Além disso, as células T específicas para antígeno da TB podem ter uma assinatura genética específica que pode servir como um biomarcador quantificável da carga bacteriana. Usaremos tetrâmeros de MHC para isolar essas células T antígeno específicas para caracterização ex vivo. A detecção precoce de alterações no padrão de distribuição de subconjuntos de células T ou em fenótipos celulares específicos pode ser preditiva de quem, entre aqueles com histórico de exposição recente, apresenta maior risco de progredir para doença ativa.

2.7.5 Teste de Anticorpos SARS Cov-2: Avaliaremos a presença de anticorpos da classe IgG para SARS Cov-2 usando a plataforma Abbot. A plataforma permite a detecção qualitativa (positiva ou negativa) de anticorpos para SARS Cov-2. Testaremos apenas para anticorpos da classe IgG que normalmente surgem após 14 dias de infecção; portanto, isto não representa uma doença grave, mas sim exposição prévia. Os testes de anticorpos serão realizados no laboratório de imunologia do NDI.

2.8 Coleta, preparo, manuseio e Envio de Amostras

Enviaremos vários tipos de amostra de sangue ao laboratório Salgame, incluindo amostras seriadas de PBMC purificadas e RNA total de PBMCs estimuladas. As amostras de sangue serão acondicionadas em conformidade com as instruções da embalagem da IATA antes do envio. Ao receber as amostras de sangue, cada amostra será rotulada e processada de acordo com os POPs aprovados pelo comitê de ética. Os usos das amostras podem incluir, entre outros, estudos imunológicos funcionais, medições de citocinas e quimiocinas, expressão gênica e estudos proteômicos. Métodos apropriados de nível de biossegurança 3 (NBL3) e gerenciamento de resíduos serão empregados no manuseio e processamento das amostras de sangue. Aprovações apropriadas dos IBC e CRI serão obtidas antes do processamento das amostras de sangue. Todas as pessoas que manusearem as amostras de sangue deverão ter concluído o treinamento em agentes patogênicos transmitidos por sangue.

2.9 Considerações Estatísticas

2.9.1 Considerações sobre o tamanho da amostra

Para o objetivo 1, esperamos que 70 contatos domiciliares atendam à nossa definição de fenótipo "progressor". Presumimos que seremos capazes de localizar 70% deles, e que 95% dos progressores terão sucesso no tratamento de TB. Portanto, esperamos poder reconsiderar 45 progressores de nossas coortes anteriores na região de Vitória. A persistência da assinatura genética (Predict29) será relatada como uma proporção com intervalo de confiança (IC) de 95%. Estimamos que, com 45 progressores e 45 controles, poderemos avaliar a prevalência da assinatura genética com uma precisão de 8%.

Para os objetivos 2 e 3, esperamos identificar 28 contatos domiciliares com expressão de assinatura genética positiva com base em resultados anteriores da Índia. Presumimos que seremos capazes de localizar 70% deles e, portanto, esperamos registrar 20 contatos domiciliares com expressão de assinatura genética positiva e 20 controles. Com esses números, poderemos avaliar a prevalência da assinatura genética com uma precisão de 10%.

2.9.2 Plano de análise

Para o objetivo 1, esperamos que a assinatura genética (Predict29) seja responsiva ao tratamento da TB. Portanto, a maioria dos progressores não mostrará a assinatura genética. Será avaliada a prevalência da persistência da assinatura genética com IC de 95%. Para os objetivos 2 e 3, esperamos que os participantes com expressão de assinatura genética positiva estarão em risco de TB sintomática clínica e subclínica. A proporção de PET-CT, culturas de escarro e sintomas anormais será comparada entre casos e controles usando o teste do qui-quadrado. Além disso, variáveis de exposição, como idade, sexo e intensidade da exposição (medida como local do sono), serão comparadas entre casos e controles usando-se o qui-quadrado para variáveis categóricas e a soma de classificação para variáveis numéricas.

2.10 Referências

1. Organização Mundial da Saúde. Global Tuberculosis Report 2017. WHO/HTM/TB/2017.23. Genebra, Organização Mundial da Saúde, 2017. Disponível em: www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Salgame P, Geadas C, Collins L, Jones-López E, Ellner JJ. Latent tuberculosis infection-- Revisiting and revising concepts. Tuberculosis (Edinb). 2015 Jul;95(4):373-84

3. Zak DE, Penn-Nicholson A, Scriba TJ, Thompson E, Suliman S, Amon LM, Mahomed H, Erasmus M, Whatney W, Hussey GD, Abrahams D, Kafaar F, Hawkridge T, Verver S, Hughes EJ, Ota M, Sutherland J, Howe R, Dockrell HM, Boom WH, Thiel B, Ottenhoff THM, Mayanja-Kizza H, Crampin AC, Downing K, Hatherill M, Valvo J, Shankar S, Parida SK, Kaufmann SHE, Walzl G, Aderem A, Hanekom WA; ACS and GC6-74 cohort study groups. A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. *Lancet*. 2016 Jun 4;387(10035):2312-2322
4. Suliman S, Thompson E, Sutherland J, Weiner Rd J, Ota MOC, Shankar S, Penn-Nicholson A, Thiel B, Erasmus M, Maertzdorf J, Duffy FJ, Hill PC, Hughes EJ, Stanley K, Downing K, Fisher ML, Valvo J, Parida SK, van der Spuy G, Tromp G, Adetifa IMO, Donkor S, Howe R, Mayanja-Kizza H, Boom WH, Dockrell H, Ottenhoff THM, Hatherill M, Aderem A, Hanekom WA, Scriba TJ, Kaufmann SH, Zak DE, Walzl G; GC6-74 and ACS cohort study groups. Four-gene Pan-African Blood Signature Predicts Progression to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 6 de abril de 2018
5. Leong S, Zhao Y, Ribeiro-Rodrigues R, Jones-López EC, Acuña-Villaorduña C, Rodrigues PM, Palaci M, Alland D, Dietze R, Ellner JJ, Johnson WE, Salgame P. Cross-validation of existing signatures and derivation of a novel 29-gene transcriptomic signature predictive of progression to TB in a Brazilian cohort of household contacts of pulmonary TB. *Tuberculosis (Edinb)*. 2020 Jan; 120:101898.
6. Malherbe ST, Chen RY, Dupont P, Kant I, Kriel M, Loxton AG, Smith B, Beltran CGG, van Zyl S, McAnda S, Abrahams C, Maasdorp E, Doruiter A, Via LE, Barry CE 3rd, Alland D, Richards SG, Ellman A, Peppard T, Belisle J, Tromp G, Ronacher K, Warwick JM, Winter J, Walzl G. Quantitative 18F-FDG PET-CT scan characteristics correlate with tuberculosis treatment response. *EJNMMI Res*. 2020 Feb 10;10(1):8.
7. Kaforou M, Wright VJ, Oni T, French N, Anderson ST, Bangani N, Banwell CM, Brent AJ, Crampin AC, Dockrell HM, Eley B, Heyderman RS, Hibberd ML, Kern F, Langford PR, Ling L, Mendelson M, Ottenhoff TH, Zgambo F, Wilkinson RJ, Coin LJ, Levin M. 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
8. Sambarey A, Devaprasad A, Mohan A, Ahmed A, Nayak S, Swaminathan S, D'Souza G, Jesuraj A, Dhar C, Babu S, Vyakarnam A, Chandra N. Unbiased identification of blood-based biomarkers TBRU EUA-Brasil V1.0 – 7 de julho de 2020 for pulmonary tuberculosis by modeling and mining molecular interaction networks. *EBioMedicine* 2017;15:112–26

9. Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, Neher A, Feldmann K, Mollenkopf HJ, Ziegler A, Kaufmann SH. Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Med* 2007;85(6):613–21
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(3): 213–24
11. Maertzdorf J, McEwen G, Weiner 3rd J, Tian S, Lader E, Schriek U, Mayanja-Kizza H, Ota M, Kennen J, Kaufmann SH. Concise gene signature for point-of-care classification of tuberculosis. *EMBO Mol Med* 2016;8(2):86–95
12. Thompson EG, Du Y, Malherbe ST, Shankar S, Braun J, Valvo J, Ronacher K, Tromp G, Tabb DL, Alland D, Shenai S, Via LE, Warwick J, Aderem A, Scriba TJ, Winter J, Walzl G, Zak DE; Catalysis TB–Biomarker Consortium. Host blood RNA signatures predict the outcome of tuberculosis treatment. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017 Dec;107:48-58
13. "Manual de Recomendações Para o Controle da Tuberculose No Brasil. Ministério da Saúde. Brasília, 20

3. SUBPROJETO III: Avaliação de indivíduos resistentes à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

3.1 RESUMO DO PROTOCOLO

- Título:** Colaboração entre Brasil e EUA em imunidade e biomarcadores em tuberculose – Avaliação de indivíduos resistentes à infecção por *M. tuberculosis*.
- Amostragem:** Contatos domiciliares com teste TST/IGRA negativo, apesar da exposição intensa e contínua a um caso infeccioso de TB em Vitória, Brasil
- Número de Centros:** Núcleo de Doenças Infecciosas, Vitória, Brasil, e New Jersey Medical School, Rutgers, The State University of New Jersey, Newark, Nova Jersey
- Duração do arrolamento:** 5 meses
- População do estudo:** Contatos domiciliares de coortes previamente arrolados com TST/IGRA negativo.
- Tamanho da amostra:** 60 voluntários, contatos domiciliares com TST/IGRA negativo após exposição intensa aos respectivos casos índices.

3.2 Histórico

A tuberculose (TB) é a principal causa de mortalidade por doenças infecciosas. Em 2018, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou uma incidência de 9,6 milhões de novos casos e 1,5 milhões de mortes atribuídas à TB. Após a exposição a um caso-índice de TB pulmonar, há três desfechos possíveis: o indivíduo controla a infecção e elimina o organismo ("autocura"); o indivíduo controla a infecção, mas permite a persistência do bacilo em estado não replicante que pode ser reativado, com evolução para doença ("infecção latente por tuberculose" ou ILTB); o indivíduo não controla a infecção, que progride para doença clínica nos primeiros anos após a infecção ("infecção progressiva"). Uma pequena proporção de contatos de casos índices permanece TST/IGRA negativo, apesar da forte exposição à fonte de infecção. Dados preliminares mostram que esses indivíduos ("fenótipo resistente") apresentam percentuais muito baixos de evolução para TB clínica, mostrando que são capazes de controlar a infecção e/ou evolução para doença de forma mais eficiente que os indivíduos com TST/IGRA positivo após a exposição. Um melhor conhecimento dos mecanismos imunológicos associados ao fenótipo resistente pode ser fundamental para o desenvolvimento de vacinas contra a doença.

3.3 Justificativa

Para atingir as metas da estratégia STOP TB estabelecidas pela OMS até 2025, é necessária uma redução anual média da incidência da TB de 4% a 5%. É pouco provável que as atuais estratégias de controle da TB, que incluem diagnóstico precoce e tratamento de casos infecciosos, atinjam as metas necessárias para a erradicação da TB, visto que o grupo de indivíduos infectados continuará a alimentar as epidemias de TB. Nesse contexto, é necessário o desenvolvimento de uma vacina eficiente capaz de prevenir a infecção e/ou a evolução para TB doença. A identificação de indivíduos com resistência inata à infecção e doença por *M. tuberculosis* permite caracterizar vias genéticas e imunológicas necessárias para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a tuberculose. O estudo caso-controle aninhado proposto, baseia-se na identificação de indivíduos resistentes à infecção por *M. tuberculosis* e os biomarcadores concomitantes imunológicos associados. Utilizaremos uma série de tecnologias de vanguarda para a identificação dos marcadores imunológicos associados ao fenótipo resistente. A estratégia de utilização de contatos domiciliares de casos índices possui várias vantagens: a intensidade e o momento da exposição e infecção podem ser determinados em circunstâncias definidas e os mecanismos imunes inatos que protegem contra a infecção podem ser avaliados de maneira controlada.

3.4 Objetivos

O estudo proposto tem por objetivo descobrir e validar marcadores imunológicos associados ao fenótipo resistente descrito acima. Os estudos de coortes de contatos domiciliares de casos índices de TB, realizados ao longo da colaboração entre Brasil e EUA serão de grande valia para que o objetivo do estudo seja alcançado. Os pesquisadores do NDI, localizado em Vitória, ES, Brasil, tem acesso a populações com alto risco de exposição a um alto e previsível risco de infecção por *Mtb*, além de uma extensa coleção de isolados de *Mtb* ambos associados à um banco de dados com informações clínicas, possuem também uma excelente infraestrutura para estudos clínicos e capacidade laboratorial para pesquisas clínicas avançadas em imunologia e microbiologia. A Rutgers University em Newark, NJ, possui experiência com pesquisa básica relacionada a resposta imune inata e adquirida à TB e mecanismos de aquisição de resistência a medicamentos, além de instalações laboratoriais para realização de microarranjos de RNA, proteômica e citometria de fluxo avançada com 12 parâmetros, em uma área com nível de biossegurança 3 (BSL3). A Rutgers University, em Newark, NJ possui ainda experiência em imunologia relacionada a TB, condução de estudos clínicos internacionais, epidemiologia e gerenciamento de dados.

3.5 Desenho do Estudo

O presente estudo prevê o recontato de 60 sujeitos de pesquisa com fenótipo de “resistência à infecção por *M. tuberculosis*”, que haviam sido voluntários de pesquisa em estudos de coorte anteriores entre 2008-2018 (Projetos ICIDR e TBRU). O estudo envolverá uma visita domiciliar, uma avaliação clínica e uma coleta de sangue para avaliação imunológica dos sujeitos. O estudo será do tipo Caso-Controlado aninhado. Cada caso identificado como “resistente”, será pareado por sexo e idade com um controle. O caso resistente será definido como um contato domiciliar, de qualquer idade, com TST/IGRA negativo após “exposição intensa” com um caso índice com baciloscopia positiva. Exposição intensa será definida por: dormir no mesmo quarto do caso índice por pelo menos 5 vezes por semana durante pelo menos 3 meses antes do diagnóstico do caso índice. Para os contatos com idade inferior a 18 anos, além do termo de consentimento que deverá ser assinado pelos pais/representantes legais, obter-se-á o termo de assentimento. Contatos sabidamente HIV positivos serão excluídos do estudo.

Um contato será definido como um indivíduo de qualquer idade que tenha tempo de contato significativo com o caso-índice por pelo menos três meses antes do arrolamento no estudo, e serão excluídos os contatos que sabidamente estão infectados pelo HIV.

Um contato com exposição intensa (HE-CD) será definido como um indivíduo que dormiu no mesmo local que um caso de TB pulmonar com baciloscopia positiva, por, pelo menos, 5 vezes por semana durante 3 meses antes do diagnóstico do caso-índice.

Os resistentes serão identificados a partir de estudos anteriores com contatos domiciliares realizados em Vitória entre 2008 e 2018, sob a égide da ICIDR e da UPTB. Depois de identificados, a equipe do estudo fará uma visita ao domicílio e obterá o consentimento para a triagem do indivíduo. Para crianças menores de 18 anos, o consentimento será dado pelos pais.

A equipe do estudo solicitará aos sujeitos consentimento para coletar uma amostra de sangue para análise imunológica.

3.6 População do Estudo

O NDI criado em 1990, está vinculado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Atualmente, a rede dos laboratórios dos Programas de Tuberculose associada ao NDI identifica $\geq 90\%$ dos casos de TB que ocorrem na região metropolitana de Vitória. A epidemiologia básica da tuberculose em Vitória é bem conhecida de estudos anteriores (ICIDR e TBRU) realizados entre 2008 a 2019 (Tabela 1). Analisamos dados de 400 casos de TB confirmados por cultura e 1.250 contatos domiciliares identificados por meio da rede do NDI, nos postos de Vitória, Cariacica, Vila Velha e Serra, de 2008 a 2019. A tabela abaixo mostra um resumo das informações relevantes desses estudos.

Tabela 1: Epidemiologia dos casos de TB em Vitória - Brasil (os dados foram coletados de três estudos diferentes).

Característica	Estimativa
<i>Casos-Índice de TB</i>	
Idade (média)	35 [23-44] anos
Homens	67%
Vacina BCG	51%
Escarro BAAR $\geq 2+$	85%
Cavitações (raio X)	73%
<i>Contatos domiciliares</i>	
Número de contatos	3-5
Idade (média)	21 [10-39] anos
Vacina BCG	
≤ 15 anos	95%
> 15 anos	67%
Endurecimento pelo TST	
Média	7 mm
≥ 10 mm	41%

De 2008 a 2012, 160 casos positivos de TB e 898 contatos domiciliares foram arrolados como voluntários no projeto ICIDR-1. Deste total, 210 contatos domiciliares dos respectivos casos índices foram classificados como de alta exposição (AE). Destes, 31 (15%) apresentaram resultados negativos do IGRA e, portanto, classificados como resistentes.

No estudo ICIDR-2 (2012 a 2015), 268 contatos domiciliares de casos índices apresentaram Teste Tuberculínico (TST) negativo. Destes, 27 (10%) foram classificados como de alta exposição e também foram classificados como resistentes.

De 2015 a 2019, 400 contatos domiciliares com testes TSTs positivos foram inscritos sob a égide da UPTB. Como parte do processo de triagem, 510 contatos domiciliares foram triados como negativos no TST no domicílio. De estimativas anteriores, esperamos que 51 atendam à definição de HE-CD e, portanto, sejam considerados resistentes.

Esperamos que 109 contatos domiciliares atendam à nossa definição de fenótipo "resistente". Presumimos que seremos capazes de localizar 60% deles e também esperamos uma taxa de conversão de TST de 10%; portanto, esperamos poder reconsiderar 60 resistentes na área de Vitória de nossas coortes anteriores.

3.6.1 Critério de Inclusão

Para uniformizar a exposição entre domicílios e reduzir os fatores relacionados ao caso-índice por conta da transmissão do MTB e infecção do contato domiciliar, nossas coortes anteriores registraram casos-índice de TB não infectados por HIV com BAAR no escarro ($\geq 1+$) ou positivos para GeneXpert MTB/RIF e cultura positiva (meio Ogawa-Kudoh). As características do caso-índice (histórico de TB, resultados de radiografia de tórax etc.).

foram registradas, e todas as cepas de MTB dos casos de TB registrados como casos-índice foram armazenadas no laboratório do NDI.

Para este estudo, avaliaremos contatos domiciliares com resistência à infecção (casos) por *M. tuberculosis* e seus respectivos controles.

Definição de caso (fenótipo resistente):

Todos os casos devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

- Atender à definição de HE-CD
- IGRA negativo tanto no comparativo quanto no acompanhamento durante o novo consentimento.
- Estar disposto e poder fornecer o consentimento/autorização por escrito e seguir os procedimentos do estudo.

Definição de controle:

Todos os controles devem atender a TODOS estes critérios de inclusão:

- Atender à definição de HE-CD
- IGRA positivo no comparativo e no acompanhamento durante o novo consentimento.
- Estar disposto e poder fornecer o consentimento/autorização por escrito e seguir os procedimentos do estudo.

3.6.2 Critério para a Exclusão de Participantes

- Não ser capaz de fornecer/realizar exames ou procedimentos do estudo na triagem e na linha de base.
- Contatos domiciliares com condições conhecidas por produzir resultados falso-negativos no IGRA, como uso de bloqueadores do fator de necrose tumoral (TNF), infecção por HIV ou esteroides sistêmicos (>15 mg de prednisona diariamente ou equivalente), por pelo menos 2 semanas no último mês
- Crianças menores de 5 anos
- A critério do pesquisador
- Contraindicação a qualquer procedimento do estudo, conforme determinado por um clínico ou pesquisador responsável

3.7 Ensaios ou Procedimentos Especiais

Para o Objetivo 1 deste estudo, investigaremos como os seguintes biomarcadores se correlacionam com resultados específicos da infecção por TB. Determinaremos a sensibilidade/especificidade desses biomarcadores no prognóstico da doença ativa da TB.

Análise transcriptômica: Usaremos o Sequenciamento Next-Generation da Illumina para detectar um padrão único de expressão de RNA nos leucócitos hospedeiros em resposta à TB. Diversos estudos demonstraram que assinaturas transcricionais específicas podem distinguir entre TB e outras doenças, entre TB ativa e ILTB e entre ILTB e estados não infectados em adultos. [31–36]

Análise proteômica: Usaremos tecnologia SOMAScan para detectar uma assinatura de expressão proteica que se correlacione com o resultado de infecção por TB.

Citometria de fluxo multiparamétrica: Usaremos a citometria de fluxo para separar e medir diferentes populações de células T com base na expressão das moléculas da superfície celular. A proporção de células T de memória central (TCM) e células T da memória efetora (TEM) pode ser usada como marcador de carga bacteriana e persistência no hospedeiro [37,38] e cogitamos a hipótese de que seja preditivo do estágio da doença após a infecção. Além disso, as células T específicas para antígeno da TB podem ter uma assinatura genética específica que pode servir como um biomarcador quantificável da carga bacteriana. Usaremos tetrâmeros MHC para isolar essas células T antígeno específicas para caracterização *ex vivo*. A detecção precoce de alterações no padrão de distribuição de subconjuntos de células T ou em fenótipos celulares específicos pode ser preditiva de quem, entre aqueles com histórico de exposição recente, apresenta maior risco de progredir para doença ativa.

Teste de anticorpos SARS Cov-2: Avaliaremos a presença de anticorpos da classe IgG para SARS Cov-2 usando a plataforma Abbot. A plataforma permite a detecção qualitativa (positiva ou negativa) de anticorpos para SARS Cov-2. Testaremos apenas para anticorpos da classe IgG que normalmente surgem após 14 dias de infecção; portanto, isto não representa uma doença grave, mas sim exposição prévia. Os testes de anticorpos serão realizados no laboratório de imunologia do NDI.

3.8 Coleta, preparação, manuseio e envio de amostras

Enviaremos vários tipos de amostra de sangue ao laboratório Salgame, incluindo amostras seriadas de PBMC purificadas, sobrenadantes de Quantiferon e RNA total de PBMCs estimuladas. As amostras de sangue serão acondicionadas em conformidade com as instruções da embalagem do IATA antes do envio. Ao

receber as amostras de sangue, cada amostra será rotulada e processada de acordo com os POPs aprovados pelo comitê de ética. Os usos das amostras podem incluir, entre outros, estudos imunológicos funcionais, medições de citocinas e quimiocinas, expressão gênica e estudos proteômicos. Métodos apropriados de nível de biossegurança 3 (NBL3) e gerenciamento de resíduos serão empregados no manuseio e processamento das amostras de sangue. Aprovações apropriadas dos comitês de ética em pesquisa serão obtidas antes da análise com as amostras de sangue. Todas as pessoas que manusearem as amostras de sangue deverão ter concluído o treinamento em agentes patogênicos transmitidos pelo sangue.

3.9 Considerações Estatísticas

3.9.1 Considerações Sobre o Tamanho da Amostra

Esperamos que 109 contatos domiciliares atendam à nossa definição de fenótipo "resistente". Presumimos que seremos capazes de localizar 60% deles, e também esperamos uma taxa de conversão de TST de 10%, portanto esperamos poder reconsiderar 60 resistentes de nossas coortes anteriores na área de Vitória. Com 60 "resistente". e 60 controles, indivíduos suscetíveis à infecção, teremos 80% de poder para detectar tamanhos do efeito menores que 0,6 (média na nomenclatura de Cohen). Usaremos dois testes T de amostra ou testes de Mann Whitney para determinar a quantidade de expressão diferencial para cada um dos parâmetros testados. Usaremos modelos de regressão separados com cada uma das combinações possíveis dos diferentes parâmetros para determinar a combinação que tem maior capacidade de diferenciar o fenótipo resistente do suscetível ao fenótipo de infecção.

3.9.2 Plano de análise

Esperamos encontrar um aumento dos níveis proteicos de IL-36g em indivíduos resistentes à infecção, em comparação com indivíduos susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis*. Da mesma forma, o eixo PGE2/IL1b estará aumentado no fenótipo resistente, enquanto IFNa e IL-10 estarão aumentados em indivíduos suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis*. Os estudos de bloqueio e siRNA revelarão a interação entre cada uma das citocinas e o impacto subsequente na apoptose de macrófagos infectados e no controle de *M. tuberculosis*. Esperamos não observar crescimento ou, mais provavelmente, um crescimento significativamente reduzido de *M. tuberculosis* em culturas de PBMC do grupo resistente em comparação às do grupo suscetível. Esperamos que os experimentos bloqueio de anticorpos e de silenciamento de genes siRNA confirmem as vias inatas que contribuem para o aumento da morte por *M. tuberculosis* e restrição de crescimento no grupo resistente. Nestes estudos, também descobriremos por análise de regressão se múltiplas vias antimicobacterianas inatas cooperam para impedir o crescimento de *M. tuberculosis* em hospedeiros resistentes.

3.10 Referências

1. Djoba Siawaya JF, Bapela NB, Ronacher K, Veenstra H, Kidd M, Gie R, et al. Immune parameters as markers of tuberculosis extent of disease and early prediction of anti-tuberculosis chemotherapy response. *J Infect.* 2008;56(5):340-7. Epub 2008/03/25. doi: S01634453(08)00084-4 [pii]
2. Teixeira L, Perkins MD, Johnson JL, Keller R, Palaci M, do Valle Dettoni V, et al. Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5(4):321-8. PubMed PMID: 11334250.
3. Bierrenbach AL, Cunha SS, Barreto ML, Pereira SM, Dourado I, Ichihara MY, et al. Tuberculin reactivity in a population of schoolchildren with high BCG vaccination coverage. *Rev Panam Salud Publica.* 2003;13(5):285-93. PubMed PMID: 12831432.
4. Jones-López EC, Kim S, Fregona G, Marques-Rodrigues P, et al. Importance of cough and *M. tuberculosis* strain type as risks for increased transmission within households. *PLoS One.* 2014 Jul 2;9(7): e100984. PubMed PMID: 24988000.
5. "Manual de Recomendações. Para o Controle da Tuberculose No Brasil. Ministério da Saúde. Brasília, 2011.

4. Benefícios e Riscos em Potencial

Os riscos específicos para a participação no estudo incluem a potencial violação da confidencialidade das informações de saúde do paciente e os riscos associados à punção venosa entre os contatos domiciliares. Riscos em potencial para o participante: Os procedimentos do estudo que podem causar danos físicos e / ou psicológicos são a coleta de sangue e a possível violação da confidencialidade. Os riscos relacionados à coleta de sangue são dor, hematomas, sangramentos e infecções no local da punção, e às vezes, pode ocorrer desmaio. Esses riscos, porém, são muito raros. Em relação à quebra de confidencialidade a equipe do estudo tomará todas as medidas para evitar que isso ocorra. Benefícios diretos para o participante: Este estudo resultará em benefícios diretos para os participantes do estudo e para o programa de TB de Vitória. Os benefícios para os participantes incluem:

- 1) Maior conscientização sobre questões relacionadas à TB por meio de atividades educacionais relacionadas ao estudo (como parte do processo de consentimento, cada domicílio participante será informado sobre a natureza infecciosa da TB e a importância de reduzir a transmissão de MTB);
- 2) Melhor conscientização sobre questões relacionadas à TB por meio de atividades educacionais (como parte do processo de consentimento, cada

domicílio participante será informado sobre a natureza infecciosa da TB e a importância de se reduzir a transmissão de MTB);

O efeito combinado desses fatores terá um impacto positivo no programa local de TB por meio da restrição da transmissão de MTB à comunidade e aos domicílios, e, por consequência, a diminuição da incidência de TB na região metropolitana de Vitória. Esperamos, também, que o aprendizado obtido desse estudo ajude a prevenir a disseminação da TB no Brasil e no mundo no futuro por meio da identificação de biomarcadores específicos de risco de evolução da doença.

5. Divergências em Relação ao Protocolo

Uma divergência em relação ao protocolo é qualquer não conformidade com o protocolo de ensaio clínico, BPC ou requisitos do manual de procedimentos. O descumprimento pode ser por parte do participante, do pesquisador ou da equipe do local do estudo. Como resultado de divergências, as ações corretivas serão desenvolvidas no local e implementadas imediatamente. As divergências em relação ao protocolo devem ser relatadas ao CEP local, de acordo com as diretrizes locais do CEP. Qualquer divergência em relação ao protocolo que atenda aos requisitos do relatório do CEP local também será informada com a mesma pontualidade ao Chefe Médico do DMID e ao Gerente de Projeto Clínico do DMID, bem como ao CEP da Rutgers University. Todas as divergências em relação ao protocolo devem ser abordadas nos documentos originais do participante do estudo. A documentação deve incluir o(s) motivo(s) da divergência e todas as tentativas de impedir ou corrigir a divergência. O local deve preencher um formulário de divergência em relação ao protocolo que informa cada divergência em relação ao protocolo. Uma cópia completa do formulário de divergência em relação ao protocolo deve ser guardada no arquivo regulatório e nos documentos originais do participante.

6. Política de Publicação

Os pesquisadores compartilharão a autoria com a equipe do patrocinador e seus representantes em qualquer publicação ou apresentação resultante deste estudo. Os planos, protocolos e dados de pesquisa relacionados a este estudo serão tratados como informações confidenciais. Os pesquisadores do estudo têm o compromisso de mostrar publicamente os resultados do estudo, independentemente do que for obtido. Cada instituição terá tempo para analisar a publicação antes do envio. Após a conclusão do estudo, os pesquisadores (co-investigadores do protocolo) publicarão os resultados desta pesquisa em uma revista científica. A Política de Acesso Público do NIH garante que o público terá acesso aos resultados publicados da pesquisa financiada pelo NIH. Isso exige que todos os pesquisadores enviem ou tenham enviado uma versão eletrônica de seus artigos finais para publicação revisados por colegas dos fundos do NIH para o arquivo digital do PubMed Central da Biblioteca Nacional de Medicina, após a aceitação para publicação. Além disso, a política estipula que esses

documentos devem ficar acessíveis ao público no PubMed Central em até 12 meses após a data oficial da publicação.