



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

MARAISA CRISTINA DOS REIS SILVA

**PADRORIZAÇÃO INICIAL DE TESTE DE ELISA INDIRETO PARA
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE PULMONAR**

Uberlândia

2025

MARAISA CRISTINA DOS REIS SILVA

**PADRONIZAÇÃO INICIAL DE TESTE ELISA INDIRETO PARA FINS
DIAGNÓSTICOS DE TUBERCULOSE PULMONAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Almeida
Araújo Santos

Coorientadora: Dra. Teresiama Velikkakam

Uberlândia

2025

MARAISA CRISTINA DOS REIS SILVA

**PADRONIZAÇÃO INICIAL DE TESTE ELISA INDIRETO PARA FINS
DIAGNÓSTICOS DE TUBERCULOSE PULMONAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Biotecnologia

Uberlândia, abril de 2025

Banca examinadora:

Dra. Teresiama Velikkakam

Dra. Emília Rezende Vaz (UFU)

Phelipe Augusto Borba Martins Peres (USP)

Dedico este trabalho, primeiramente, à minha mãe, que foi minha maior base, e, em segundo lugar, a todos que enfrentam suas batalhas internas diariamente, a todos que sabem que a vida é sobre ~~viver~~ sobreviver, afinal, como disse Cartola: 'A vida é um moinho'.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, que sempre me incentivou a continuar, me apoiou em todas as minhas escolhas e esteve presente em tudo o que fiz durante toda a minha vida. O seu amor, os conselhos que sempre me impulsionaram a ser o melhor que eu poderia, e o seu incondicional apoio. Ao restante da minha família, toda a gratidão por terem me apoiado a continuar sempre lutando contra todas as dificuldades.

Aos meus amigos de curso que contribuíram com minha formação pessoal e acadêmica, estiveram presentes em momentos difíceis, lidaram com todas as minhas versões, além de permanecerem próximos, apesar da distância. Especialmente ao meu melhor amigo Mauro, que está presente em minha vida há tanto tempo que já se tornou uma parte de mim, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e ajudando, nos piores e melhores momentos dos últimos 8 anos.

A minha orientadora Profa. Dra. Fabiana de Almeida Araújo Santos e a minha coorientadora Dra. Teresiama Velikkakam, por terem me oferecido esta oportunidade, além de todo o apoio e orientação que tornaram possível este trabalho. A todos os pesquisadores do Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho pelo acolhimento.

À Universidade Federal de Uberlândia, por abrir as portas para o futuro e apoiar, tanto estruturalmente quanto financeiramente, este trabalho.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que continua representando um grande desafio para a saúde pública, especialmente devido à complexidade no diagnóstico precoce e eficaz. A infecção pode se manifestar principalmente na forma pulmonar, mas são descritas outras importantes formas clínicas de manifestação extrapulmonar. A detecção da doença é crucial para a implementação de tratamentos mais eficazes e a prevenção da transmissão. Embora métodos tradicionais como bacilosscopia e cultura de micobactérias ainda sejam amplamente utilizados, eles apresentam limitações significativas em termos de sensibilidade, tempo de resposta e mão de obra especializada. O diagnóstico precoce é essencial, uma vez que aumenta significativamente as chances de cura, com taxas que podem chegar a 85% quando o tratamento é iniciado de forma tempestiva. O uso de tecnologias mais rápidas e sensíveis para o diagnóstico, como os testes moleculares, representa um avanço importante na direção do controle da doença especialmente em países de baixa renda, que ainda enfrentam desafios financeiros e de acessibilidade. Nesse contexto, o desenvolvimento de alternativas diagnósticas mais acessíveis, como a adaptação do teste ELISA para detecção de anticorpos contra antígenos recombinantes do *M. tuberculosis*, surge como uma estratégia promissora. Este estudo teve como objetivo padronizar um protocolo de ELISA indireto utilizando as proteínas recombinantes PMT64 e MTG3F3, miméticas a antígenos de *M. tuberculosis*, para melhorar a sensibilidade e especificidade na detecção de TB. Foram avaliadas diferentes condições de preparo com o objetivo de desenvolver um teste diagnóstico, de fácil aplicação e com alta capacidade de discriminação entre indivíduos infectados e saudáveis. Este estudo avaliou três parâmetros críticos: solução de bloqueio, diluição do soro e concentração do antígeno. A albumina bovina (BSA) a 3% demonstrou melhor desempenho na redução de ligações inespecíficas. Em relação às amostras, a diluição 1:100 apresentou melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, embora a resposta varie conforme a carga de anticorpos dos indivíduos. Quanto à concentração antigênica, 100 ng para MTG3F3 e 250 ng para PMT64 foram mais eficazes na diferenciação entre casos positivos e controles saudáveis. Os resultados destacam a importância de uma otimização cuidadosa de cada etapa para garantir a confiabilidade do ensaio.

Palavras chaves: Tuberculose, proteínas recombinantes, diagnóstico, ELISA indireto.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, which remains a major public health challenge, especially due to the complexity of early and effective diagnosis. Although the infection primarily manifests in the pulmonary form, several important extrapulmonary clinical manifestations are also described. Accurate detection is crucial for implementing effective treatment and preventing transmission. Traditional methods such as smear microscopy and mycobacterial culture are still widely used, but they present significant limitations in terms of sensitivity, response time, and the need for specialized labor. Early diagnosis is essential, as it significantly increases the chances of cure, with success rates reaching up to 85% when treatment is initiated promptly. The use of faster and more sensitive technologies, such as molecular testing, represents a major advance toward disease control, especially in low-income countries still facing financial and accessibility challenges. In this context, the development of more accessible diagnostic alternatives, such as the adaptation of the ELISA test for detecting antibodies against recombinant *M. tuberculosis* antigens, emerges as a promising strategy. This study aimed to standardize an indirect ELISA protocol using the recombinant proteins PMT64 and MTG3F3, mimetic to *M. tuberculosis* antigens, to improve the sensitivity and specificity of TB detection. Various preparation conditions were evaluated to develop a diagnostic test that is easy to apply and has high discriminatory power between infected and healthy individuals. Three critical parameters were assessed: blocking solution, serum dilution, and antigen concentration. Bovine serum albumin (BSA) at 3% showed better performance in reducing nonspecific binding. Regarding serum samples, a 1:100 dilution provided the best balance between sensitivity and specificity, although the response may vary depending on individual antibody loads. As for antigen concentration, 100 ng for MTG3F3 and 250 ng for PMT64 were more effective in differentiating positive cases from healthy controls. The results highlight the importance of carefully optimizing each step to ensure assay reliability.

Keywords: Tuberculosis, recombinant proteins, diagnosis, indirect ELISA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 A tuberculose e o <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
1.2 Epidemiologia	8
1.3 Transmissão e fisiopatologia	9
1.4 Sintomatologia	10
1.5 Tratamento.....	11
1.6 Diagnóstico.....	11
1.7 ELISA indireto	12
1.8 Proteínas MTG3F3 e PMT64.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4. METODOLOGIA	15
4.1 Obtenção das amostras	15
4.2 Obtenção das proteínas.....	16
4.3 Padronização do Elisa	16
4.3.1 ELISA 1	16
4.3.2 ELISA 2	17
4.3.3 ELISA 3	17
4.3.4 ELISA 4	18
4.4 Análise estatística.....	18
5. RESULTADOS	18
5.1 ELISA 1	18
5.2 ELISA 2.....	19
5.3 ELISA 3.....	20
5.4 ELISA 4.....	22
6. DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÃO	24
8. REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1 A tuberculose e o *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), também conhecida como bacilo de Koch, em homenagem a Robert Koch, quem a descreveu pela primeira vez (Sakula, 1982). Apesar de ser uma doença antiga, a TB continua sendo um problema até os dias atuais, pois ainda representa a segunda principal causa de morte por um único agente infeccioso (OMS, 2023). A forma de TB mais conhecida e comum é a forma pulmonar (PTB), com cerca de 80% de ocorrência. Mas a TB também pode acometer outras regiões do corpo como rins, meninges e ossos, nesses casos ela é nomeada como TB extrapulmonar (Acharya *et al.*, 2020; Bagcchi, 2023; Conceição *et al.*, 2021; OMS, 2023).

O MTB é o agente causador da TB, sendo um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). A parede celular do MTB é única tendo três camadas principais, membrana plasmática, o núcleo da parede celular e a camada mais externa. Sendo essa membrana plasmática espessa e rica em lipídios, o que a leva a ser uma bactéria com alta resistência (Jacobo-Delgado *et al.*, 2023). As micobactérias, pertencentes à família Mycobacteriaceae, possuem uma parede celular com componentes fundamentais como o peptidoglicano (PG), o ácido micólico (MA) e a arabinogalactana (AG). A parede celular combina aspectos de bactérias Gram-positivas, devido à espessura da camada de PG, e Gram-negativas, com uma camada externa cerosa. O bacilo tem uma membrana com propriedades fundamentais, rodeada por uma camada de PG altamente reticulada, que forma complexos covalentes com a AG. Aproximadamente 60% da massa da micobactéria é composta por lipídios complexos, o que a torna hidrofóbica. A combinação de PG, AG e MA forma uma barreira protetora contra antibióticos hidrofilicos e danos ambientais, com o ácido micólico atuando como uma camada externa hidrofóbica que reforça a proteção contra danos oxidativos e respostas imunológicas (Jacobo-Delgado *et al.*, 2023; Maitra *et al.*, 2019).

1.2 Epidemiologia

Epidemiologicamente, a TB permanece como um desafio global significativo de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. A taxa de incidência da TB em países em transição é de aproximadamente 1-2%, enquanto nos países desenvolvidos esse percentual varia entre 0,1% e 1% (Lei *et al.*, 2023). A cada ano, aproximadamente 10,6 milhões de indivíduos adoecem devido à TB, e estima-se que 1,3 milhões de mortes em todo o mundo

sejam atribuídas a essa doença. O Brasil está entre os 30 países com maior índice de TB do mundo, com aproximadamente 75 mil casos apresentados em 2022, tendo o maior número de pessoas infectadas do continente americano. Apesar de ter ocorrido uma redução na taxa de incidência líquida (8,7%) de 2015 a 2022, esse valor está longe da taxa desejada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para esse período (OMS, 2023). Em 2015, os estados membros da OMS e da Organização das Nações Unidas (ONU) comprometeram-se a acabar com a epidemia de TB através da Estratégia *End Tuberculosis Act* da OMS e dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). A estratégia define marcos para 2020 e 2025, e metas para 2030 e 2035, envolvendo grandes reduções na incidência de TB, e no número de mortes causadas pela doença. Para alcançar essas metas, seria necessário reduzir a taxa de incidência em 4-5% ao ano até 2020, acelerando para 10% ao ano até 2025 e, posteriormente, para 17% ao ano até 2035. Com os números epidemiológicos atuais, o Brasil ainda está abaixo dos critérios estabelecidos pela OMS para os últimos anos (OMS, 2023).

1.3 Transmissão e fisiopatologia

A via de transmissão por MTB se dá quando um indivíduo com TB ativa realiza alguma manobra respiratória, como tossir, espirrar ou até mesmo falar, expelindo partículas respiratórias contendo *M. tuberculosis*, podendo assim infectar outra pessoa (Conceição *et al.*, 2021). Ao entrar em contato com um indivíduo saudável, ele se torna suscetível à infecção e ao possível desenvolvimento da doença (Smith *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2019). Quando o MTB é inalado, ele é capturado pelos macrófagos alveolares nos pulmões, que fagocitam os bacilos. Os macrófagos que fagocitam o MTB migra para os gânglios linfáticos, onde apresentam os抗ígenos do patógeno às células T, ativando principalmente os linfócitos TCD4. Esses linfócitos, ao serem ativados, liberam citocinas que auxiliam na maturação dos macrófagos, melhorando sua capacidade de destruição do MTB (Pandey *et al.*, 2022). No entanto, o bacilo possui um mecanismo que impede a fusão dos fagossomos com os lisossomos, evitando a sua destruição: mesmo com fagossomos maduros, o MTB é capaz de produzir moléculas que inibem a ação dos radicais livres de oxigênio e nitrogênio, essenciais para sua destruição. Dessa forma, os bacilos conseguem permanecer viáveis, mesmo dentro de macrófagos ativados (Natarajan *et al.*, 2020).

A TB se desenvolve em até três estágios para que ocorra uma contaminação completa. A TB primária refere-se à infecção inicial por *M. tuberculosis*, que ocorre quando o sistema imunológico falha em controlar a infecção, especialmente em indivíduos imunocomprometidos.

Nesses casos, o sistema imunológico da pessoa infectada não consegue controlar os bacilos, que se proliferam rapidamente, levando à doença, a qual pode afetar diferentes partes do corpo, principalmente os pulmões. Neste estágio, os indivíduos são capazes de disseminar a doença. Se a infecção for contida, mas não eliminada, a pessoa entra em um estado de infecção latente (Churchyard *et al.*, 2017). A imunossupressão posterior pode reativar a bactéria, resultando no desenvolvimento de TB secundária. Diversos fatores influenciam a gravidade e a duração da infecção. O principal fator é a suscetibilidade do hospedeiro, uma vez que as condições imunológicas e metabólicas do indivíduo podem impactar o desenvolvimento da TB. Além disso, a carga bacteriana recebida está diretamente relacionada ao grau de infecciosidade do doente, quanto maior a carga bacteriana do hospedeiro inicial, maior sua capacidade infecciosa (Churchyard *et al.*, 2017; Maison, 2022).

1.4 Sintomatologia

A TB tem como órgão principal lesado o pulmão, que pode ser afetado de diversas maneiras e com variáveis níveis de gravidade. Esses sintomas podem ser uma simples tosse ou podem chegar a níveis mais graves como danos pulmonares irreversíveis e até mesmo na morte. Os sinais da TB geralmente levam um tempo para aparecer e na maioria dos casos são inespecíficos. Os sintomas mais comuns estão a tosse, anemia, anorexia, caquexia, dispneia, fadiga, hemoptise, leucocitose, mal-estar, aspergiloma, derrame pleural, pleurisia, chiado, necrose e fibrose pulmonar (Luies; du Preez, 2020). Pode-se associar a manifestação desses sintomas a muitas causas, porém uma causa que merece destaque é a formação de granulomas. Os granulomas são uma resposta inflamatória organizada que se aglomeram para tentar isolar e conter agentes patogênicos. Primariamente o granuloma é altamente vascularizado e envolto por linfócitos. (Ravimohan *et al.*, 2018). Com o tempo, os fibroblastos se diferenciam em várias formas, formando uma estrutura estratificada, onde os bacilos são contidos, prevenindo a progressão para a TB ativa em indivíduos imunocompetentes. No entanto, o MTB sobrevive nas lesões ao modular o sistema imunológico e bloquear a fusão fagolisossomal, permanecendo em um estado de replicação lenta ou não replicante. Nesse estágio, o hospedeiro está assintomático e não infeccioso, caracterizando a TB latente. Em contrapartida, em uma infecção ativa, inicialmente os granulomas não necrosantes, são predominantemente compostos por macrófagos e linfócitos. À medida que a doença ativa avança, observa-se a formação de lesões inflamatórias necróticas dentro do granuloma e nas lesões adjacentes, o que resulta na erosão

das paredes vasculares e brônquicas, culminando em necrose. (Leung, 1999; Luijs; du Preez, 2020; Ravimohan *et al.*, 2018).

1.5 Tratamento

Sem tratamento, a TB possui uma taxa de mortalidade alta, estimada em cerca de 50%. O tratamento consiste basicamente na utilização de medicamentos anti-TB que duram de 4 a 6 meses, com uma taxa de sucesso de 85% das pessoas afetadas serem curadas (OMS, 2023). O tratamento básico para TB pulmonar em adultos e adolescentes (≥ 10 anos) é um processo estruturado que segue um esquema padrão dividido em duas fases. A fase intensiva, que dura 2 meses, que envolve a administração de quatro medicamentos: Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol, conhecidos pela sigla RHZE. Após essa fase, inicia-se uma fase de manutenção, que se prolonga por 4 meses e utiliza apenas Rifampicina e Isoniazida (RH). Este esquema totaliza um mínimo de seis meses de tratamento, sendo crucial para a erradicação da infecção e para prevenir o desenvolvimento da resistência medicamentosa (Bi *et al.*, 2022).

1.6 Diagnóstico

A OMS está introduzindo estratégias para acabar com a TB desde 1995 até os dias de hoje. Para que essas estratégias funcionem é necessário um diagnóstico altamente eficiente, afinal o primeiro passo para combater a doença é diagnosticá-la (OMS, 2015). A TB pode apresentar diversas manifestações clínicas dependendo do órgão afetado, o que amplia o espectro de sinais e sintomas além de algum específico, tornando o diagnóstico mais complexo (Engel *et al.*, 2022; Ryu, 2015). O diagnóstico precoce é essencial tanto para o tratamento individual quanto para o controle da propagação na comunidade, no entanto, essa detecção precoce permanece um desafio. No Brasil, por exemplo, a recuperação do índice de detecção em 2023, com 83% dos casos sendo diagnosticados e tratados, sugere que esforços para melhorar o diagnóstico estão sendo eficazes. No entanto, as taxas de cura ainda enfrentam desafios, como a sua queda em crianças e adolescentes. A melhoria contínua dos métodos diagnósticos e do acesso ao tratamento é essencial para alcançar taxas de cura mais altas e controlar a propagação da tuberculose (Guerreiro, 2024; Ministério da saúde, 2022).

Atualmente o diagnóstico da TB se dá por diversas técnicas, na qual cada uma consiste em uma metodologia diferente. O diagnóstico bacteriológico é um exemplo usado amplamente e pode ser feito através do exame microscópico direto ou da cultura de micobactérias (Engel *et al.*, 2022; Jafari *et al.*, 2018; Rossoni *et al.*, 2022; Ryo, 2015; Villa *et al.*, 2013). O exame

microscópico direto, ou baciloscopy, é um método simples e amplamente utilizado. A baciloscopy da amostra biológica, como o escarro, através da coloração de Ziehl-Nielsen, detecta entre 60% a 80% dos casos de TB pulmonar, sendo essencial para controlar a transmissão da doença. Apesar de ser rápida e acessível, a baciloscopy tem sensibilidade baixa e variável. Já a cultura de micobactérias é um método mais sensível e específico para confirmar a TB, podendo aumentar em até 30% a detecção de casos em pacientes com baciloscopy negativa. No entanto, o resultado pode ser mais demorado, visto que depende do crescimento do bacilo em cultura, que pode variar em média entre 14 e 30 dias ou até mesmo oito semanas (Ministério da saúde, 2011). Outra abordagem é o exame de radiografia de tórax que auxilia na identificação de doença ativa ou latente e na extensão do comprometimento pulmonar. Deve ser solicitada para todos os pacientes com suspeita de TB pulmonar, embora até 15% dos casos, especialmente em imunodeprimidos, possam não apresentar alterações radiológicas. (Acharya *et al.*, 2020; Engel *et al.*, 2022; Rossoni *et al.*, 2022).

O Xpert MTB/RIF é um teste molecular rápido e automatizado de amostras, como o escarro, que detecta a TB e a resistência à rifampicina em até 2 horas. O exame é realizado em cartuchos que já contêm a totalidade dos reagentes para processar as amostras, extraír o DNA, amplificar e detectar a TB (Engel *et al.*, 2022). Essa estratégia requer apenas um pouco de tempo técnico e proporciona alta sensibilidade e especificidade, portanto, se mostra um instrumento promissor para o diagnóstico precoce da TB. Ele apresenta maior sensibilidade em pacientes com baciloscopy positiva, já em pacientes com baciloscopy negativa ele pode ser usado como exame complementar. Apesar de sua eficácia, sua implementação enfrenta desafios, como alto custo, sistemas de saúde deficientes, falta de treinamento adequado para profissionais, aumento de custos de manutenção. Esses fatores limitam sua implementação global, especialmente em países em desenvolvimento (Engel *et al.*, 2022). Isso destaca a necessidade de criação de um método mais sensível e barato, como testes rápidos (Grill *et al.*, 2023).

1.7 ELISA indireto

O teste de ELISA indireto (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é uma técnica imunológica amplamente utilizada para detectar e quantificar anticorpos em amostras biológicas, como soro, sendo especialmente útil no diagnóstico de doenças infecciosas e autoimunes (Crownther, 2000). O procedimento envolve a sensibilização de uma placa com um antígeno específico, seguida da adição da amostra do paciente, onde os anticorpos presentes

podem se ligar ao antígeno imobilizado. Após lavagens para remover ligações não específicas, um anticorpo secundário conjugado a uma enzima é adicionado, permitindo a amplificação do sinal. A ligação entre a enzima e um substrato gera um sinal detectável, geralmente uma mudança de cor, que pode ser quantificada por absorbância. Este método oferece maior sensibilidade em comparação ao ELISA direto (Borges *et al.*, 2022; Hayrapetyan *et al.*, 2023). Em última instância, transformar um teste de ELISA em um teste rápido, *end point*, envolve simplificar o procedimento e reduzir o tempo necessário para obter resultados, mantendo a eficácia na detecção de anticorpos ou抗ígenos. Isso é um sucesso pela redução de etapas, eliminando múltiplas lavagens e incubação prolongada, e utilizando reagentes que não requerem lavagem extensiva (Dias, 2020; jMagno, 2020).

Uma vez padronizado os testes de ELISA, a implementação de dispositivos portáteis ou cartuchos que integram todos os reagentes facilita a realização do teste em campo, tornando-o mais acessível. Em vez de leituras espectrofotométricas, muitos testes rápidos envolvem mudanças visuais, como alterações de cor, que podem ser interpretadas rapidamente. Embora esses testes sejam menos sensíveis que o ELISA tradicional, sua rapidez os torna uma alternativa viável para triagens iniciais em contextos críticos, como surtos epidêmicos, onde a identificação imediata pode impactar diretamente o manejo clínico e as decisões de saúde pública (Al-Matary *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2020).

1.8 Proteínas MTG3F3 e PMT64

Nesse contexto, a identificação de peptídeos miméticos a antígenos do MTB representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos biomarcadores diagnósticos (Liu *et al.*, 2017). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa desenvolveu, por meio da tecnologia de *Phage Display*, os peptídeos PMT64 e MTG3F3, que demonstraram afinidade por IgGs purificadas de soros de pacientes com tuberculose, conforme verificado em testes de *biopanning*. Modelagens bioinformáticas indicaram que esses peptídeos apresentam similaridade com componentes da membrana do bacilo, reforçando seu potencial como alvos diagnósticos para discriminação entre indivíduos infectados e não infectados.

As duas proteínas recombinantes foram projetadas com base em regiões antigênicas da MPT64 que é uma proteína secretada especificamente pelo complexo do MTG, cuja expressão está ausente em cepas do bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG). Essas regiões antigênicas foram previamente mapeadas utilizando *Phage Display*. A MPT64 é reconhecida como um importante marcador para a detecção do MTB em amostras clínicas, especialmente em culturas líquidas,

sendo superior a métodos como o Gene Xpert em alguns casos, como na tuberculose extrapulmonar (Chen *et al.*, 2022; Pan *et al.*, 2025).

2. JUSTIFICATIVA

A TB é um problema de saúde pública presente há séculos, sendo particularmente grave mais em países em desenvolvimento, onde a infraestrutura de saúde é frequentemente precária. Nesses locais, o acesso a métodos de diagnóstico adequados é limitado, resultando em subnotificações e atrasos no tratamento. Melhorar o diagnóstico é essencial para reduzir o impacto da TB, que registrou cerca de 7,5 milhões de novos casos em 2022, número agravado pela negligência durante a pandemia.

Apesar de sua gravidade, a TB é frequentemente superada em comparação com outras doenças infecciosas, recebendo menos investimento em diagnósticos eficazes. Um parâmetro pode ser colocado quando, durante a pandemia de COVID-19, o financiamento dedicado ao combate à doença ultrapassou US\$ 21,7 trilhões, enquanto o investimento em pesquisa e desenvolvimento para a TB foi significativamente menor, com apenas US\$ 915 milhões em 2020. A OMS a classifica como uma doença reemergente, enfatizando a urgência de métodos diagnósticos mais acessíveis e robustos. Diagnósticos rápidos e simples poderiam facilitar a detecção precoce e o tratamento, reduzir a transmissão e o impacto econômico da doença, que afeta principalmente adultos em idade produtiva e aumenta custos de saúde devido às complicações.

A taxa de mortalidade da TB está muito ligada ao tempo de diagnóstico: diagnósticos tardios aumentam tanto a mortalidade quanto a propagação da doença. Estudos indicam que o diagnóstico precoce pode elevar a taxa de cura para até 85%. A resistência medicamentosa também é uma preocupação crescente, resultante de diagnósticos inadequados e tratamentos incompletos. Melhorar o diagnóstico permite identificar a TB rapidamente, promovendo tratamentos adequados.

Um sistema de diagnóstico aprimorado melhora o monitoramento epidemiológico e orienta políticas públicas. Com dados confiáveis, os programas de controle podem identificar surtos e implementar medidas preventivas com mais precisão. Além disso, campanhas educativas que enfatizem o diagnóstico precoce podem ajudar a reduzir o estigma e incentivar a busca por ajuda médica.

Investir em métodos diagnósticos mais acessíveis e eficientes não só salvará vidas, como também ajudará a controlar a propagação da TB em comunidades vulneráveis. O

desenvolvimento de novas tecnologias, como testes moleculares rápidos foi uma estratégia usada, mas ainda enfrenta desafios de custo, dificultando sua ampla implementação em países de baixa renda. Por isso, é necessário desenvolver testes mais acessíveis e eficazes.

Atualmente, o padrão-ouro é a cultura de micobactérias, um método sensível e específico para confirmar a TB, no entanto com um tempo de execução muito demorado, em média entre 14 e 30. Um teste de fluxo lateral rápido poderia ser uma solução mais prática, econômica e acessível em lugares mais remotos fornecendo resultados instantâneos e de maior sensibilidade. O desenvolvimento desse tipo de teste pode ser atrelado as descobertas realizadas no ELISA. Nesse sentido, o ELISA, com um alta sensibilidade e especificidade, pode ser adaptado para se tornar um teste rápido no futuro ao simplificar suas etapas, integrar tecnologias de detecção mais ágeis e utilizar formatos portáteis, permitindo resultados imediatos e confiáveis em ambientes clínicos e de triagem.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Otimizar o uso de antígenos recombinantes para detecção e quantificação de anticorpos reativos em soros de pacientes infectados com TB através do desenvolvimento de um protocolo padronizado de teste de ELISA indireto.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar a concentração de antígeno a ser usada, na detecção do ELISA indireto visando maior sensibilidade e especificidade;
- Padronizar a diluição do soro a serem utilizados no ELISA, buscando garantir a reproduzibilidade e a precisão dos resultados.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção das amostras

Como o objetivo da pesquisa foi padronizar o teste ELISA com proteínas recombinantes capazes de discriminar pacientes com TB de indivíduos saudáveis, foram necessários dois grupos. O grupo CTRL foi composto por indivíduos saudáveis com testes de raio X e liberação de interferon-gama (IGRA) negativo. Já o grupo teste (grupo TB) foi composto por pacientes que apresentaram o bacilo MTB em amostras positivas no biológico no Laboratório de

Microbiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Para obtenção de amostras biológicas, foram convidados a participar da pesquisa indivíduos com idade superior a 18 anos, que aceitaram por meio de assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram obtidas 65 amostras de sangue, sendo 44 amostras de soro de pacientes com TB pulmonar ativa e 21 amostras de indivíduos que não apresentavam qualquer tipo de caso de TB. Essas amostras já foram coletadas e armazenadas a -80°C no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, UFU. Essa pesquisa conta com a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa sob o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 38450020.9.0000.5152.

4.2 Obtenção das proteínas

As proteínas recombinantes PMT64 e MTG3F3, miméticas a antígenos do MTB, foram construídas com base em regiões antigênicas da proteína MPT64, uma proteína secretada especificamente pelo complexo MTB. Essas regiões foram previamente identificadas por nosso grupo de pesquisa por meio da tecnologia de *Phage Display*, visando selecionar epítopos com alto potencial imunogênico. A construção dos plasmídeos contendo as sequências codificantes dessas proteínas foi realizada pela empresa *GenScript*, utilizando o vetor de expressão pET32a em *E. coli* BL21(DE3). As melhores condições de expressão foram previamente padronizadas pelo nosso grupo de pesquisa, com a produção das proteínas realizada por fermentação a 30 °C com incubação *overnight*.

Após a expressão, as proteínas recombinantes foram purificadas por Cromatografia de Afinidade e, em seguida, analisadas quanto ao seu padrão de bandas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A quantificação foi realizada por densitometria, utilizando o programa *ImageJ*, considerando-se exclusivamente a banda específica correspondente a cada proteína. As concentrações foram, então, ajustadas para posterior validação nos ensaios de ELISA.

4.3 Padronização do Elisa

4.3.1 ELISA 1

Com o objetivo de discriminar os pacientes com TB de indivíduos saudáveis, primeiramente foram realizados dois ensaios de ELISA sob condições distintas testadas. No primeiro foram utilizadas diferentes titulações do soro (1:100 e 1:250), e condições de bloqueio (BSA 3% e Molico 5%). Para isso, foram utilizadas placas de polietileno de 96 poços, que

foram sensibilizadas utilizando os valores-teste das proteínas PMT64 e MTG3F3, separadamente, diluídas em carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 8,6). Essa solução foi adicionada à placa, em um volume final ajustado para 50 µL por poço. Após a sensibilização, a placa foi mantida durante a noite a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada uma vez com tampão de lavagem (PBS Tween 0,05%, 300 µL por poço).

Para testar a melhor condição de bloqueio, foram comparadas as absorbâncias finais das placas quando bloqueadas com as soluções de BSA 3% e Molico 5%. A etapa de bloqueio foi realizada a 37°C, por 1 hora. Após essa incubação, a placa foi lavada duas vezes com regularidade de lavagem.

Para determinar a melhor diluição do soro a ser usado (1:100, 1:250), inicialmente, foram testadas amostras de um *pool* único com amostras de 5 indivíduos por grupo. A etapa de incubação com o anticorpo primário (soro humano) foi realizada a 37°C, por 1 hora. Após essa incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem. Após as lavagens, foi realizada uma incubação com anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com HRP (*Horseradish peroxidase*) (GE, clone: NA933V) diluído na proporção 1:5000 em PBS 1X, sendo incubado na estufa por 1 hora a 37°C e, em seguida, lavado por 3 vezes com particular de lavagem. Finalmente, a ligação foi revelada com 50 µL de solução revelada Tetrametilbenzidina (TMB) na proporção 1:1 em temperatura ambiente, e a ligação foi interrompida utilizando 25 µL de ácido sulfúrico 2M. Terminado o processo, a leitura da densidade óptica (OD) foi realizada a 450 nm.

4.3.2 ELISA 2

No segundo, foram usadas condições que se mostram promissoras como, a utilização de uma titulação do soro à 1:100, e bloqueio com BSA 3% para padronização da concentração das proteínas recombinantes. Porém esse ensaio teve o objetivo de testar diferentes concentrações das proteínas recombinantes (50ng, 100ng, 250ng e 500ng), além de usar um *pool* único com amostras de 6 indivíduos por grupo. O teste foi realizado de acordo com o procedimento citado acima.

4.3.3 ELISA 3

Subsequentemente houve a realização de outro teste para a comparação das condições testadas anteriormente, mas desta vez usando um *pool* com n maior (=20 indivíduos por grupo), para que assim fosse escolhidas as condições mais favoráveis comparativamente. Para isso foram usados o bloqueio com BSA 5%, além da verificação com diferentes valores de diluição

do soro a ser utilizados (1:50; 1:250 e 1:500), com diversas concentrações das proteínas recombinantes (100ng e 500ng), seguindo sempre o mesmo protocolo para o teste.

4.3.4 ELISA 4

Por fim foi realizado um teste de ELISA individualizado onde foi usado o maior *pool*, sendo feito com os pacientes individualizados ($n=20$). Utilizando as melhores condições avaliadas anteriormente de 250ng para concentrações proteínas, uma diluição do soro à 1:500 e o BSA à 5%, mantendo os procedimentos citados acima.

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo software *GraphPad Prism* 8.0. Foram utilizados testes não pareados, paramétricos ou não paramétricos, conforme a distribuição dos dados. Consideradas diferenças estatisticamente significativas para $p \geq 0,005\%$.

5. RESULTADOS

5.1 ELISA 1

Foram conduzidos vários testes e, a partir dos resultados obtidos em cada etapa, os critérios de comparação foram sendo ajustados progressivamente para os testes subsequentes, permitindo uma análise mais precisa. Primeiramente foram testados, o bloqueio da placa, onde foram comparadas soluções de BSA a 3% e Molico a 5%, sendo que a 3% foi a mais eficiente na redução de interferências inespecíficas. Além de testar a concentração do soro a 1:100 e 1:250, onde a concentração de 1:100 se mostrou promissora.

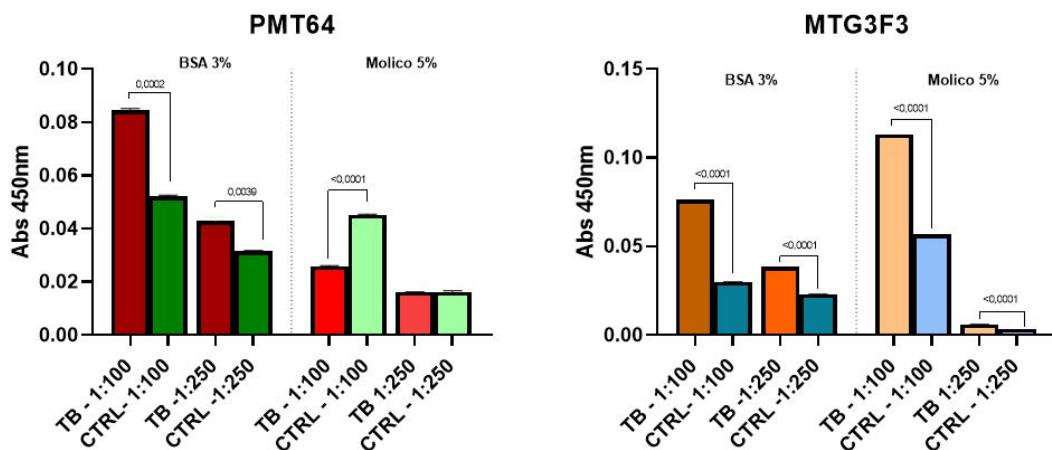


Figura 1: Testes de performance comparativa entre as soluções de bloqueio, comparando BSA 3% e Molico 5%, e concentração de soro 1:100 e 1:250. Teste t não-pareado. $P \geq 0,005\%$.

5.2 ELISA 2

No teste subsequente foram testados outros parâmetros, como a utilização de diferentes concentrações da proteína teste (100ng e 500ng) e do soro (1:50; 1:250 e 1:500). A partir dos resultados, determinou-se que a concentração ideal do soro seria 1:500 para ambas a proteínas, uma vez que proporcionou uma melhor distinção entre amostras positivas e negativas. Já a concentração da proteína não apresentou resultados significativos neste teste.

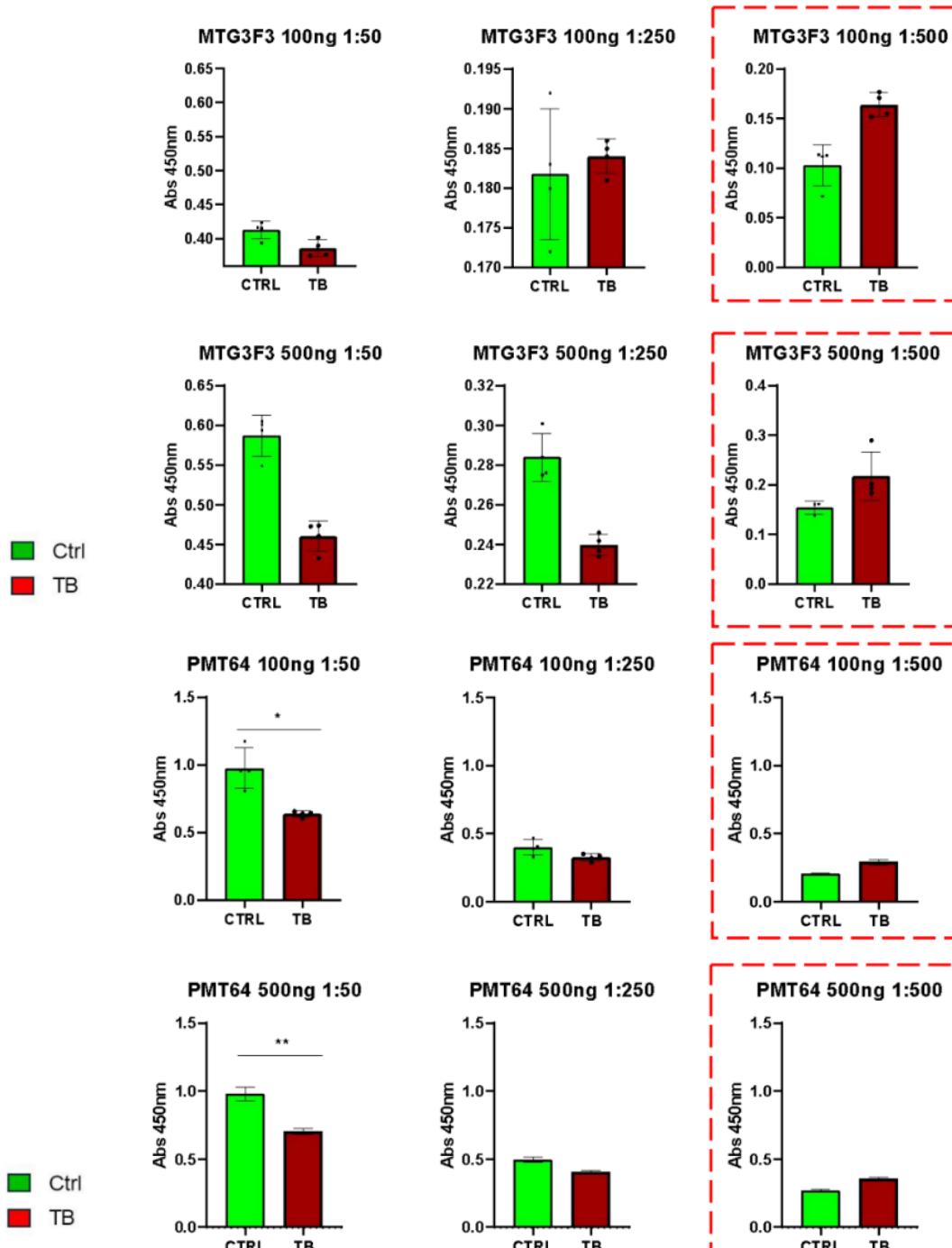


Figura 2: Teste de performance comparativa entre as concentrações de soro e diferentes concentrações da proteína teste, onde foi avaliado concentrações de 1:50; 1:250 e 1:500 e a

concentrações da proteína de 100ng e 500ng, tanto para proteína PMT64 quanto para a proteína MTG3F3 com a absorbância de 450nm. Teste t não-pareado. $P \geq 0,005\%$.

5.3 ELISA 3

Outra variável também analisada foram as diferentes concentrações da proteína teste, variando entre 50ng, 100ng, 250ng e 500ng. O melhor desempenho foi observado com a concentração de 100ng para a proteína MTG3F3 e de 250ng para a proteína PMT64. Além do comparativo entre PBS, PBS-T e BSA 3% para a diluição dos anticorpos, que demonstrou que para a proteína MTG3F3 o PBS-T foi mais efetivo, enquanto para proteína PMT64, o PBS foi mais positivo. Referente a última variável analisa, foi comparado a diluição do soro de 1:50, 1:250 e 1:500, e demonstrou que a diluição de 1:500 foi positiva para ambas as proteínas.

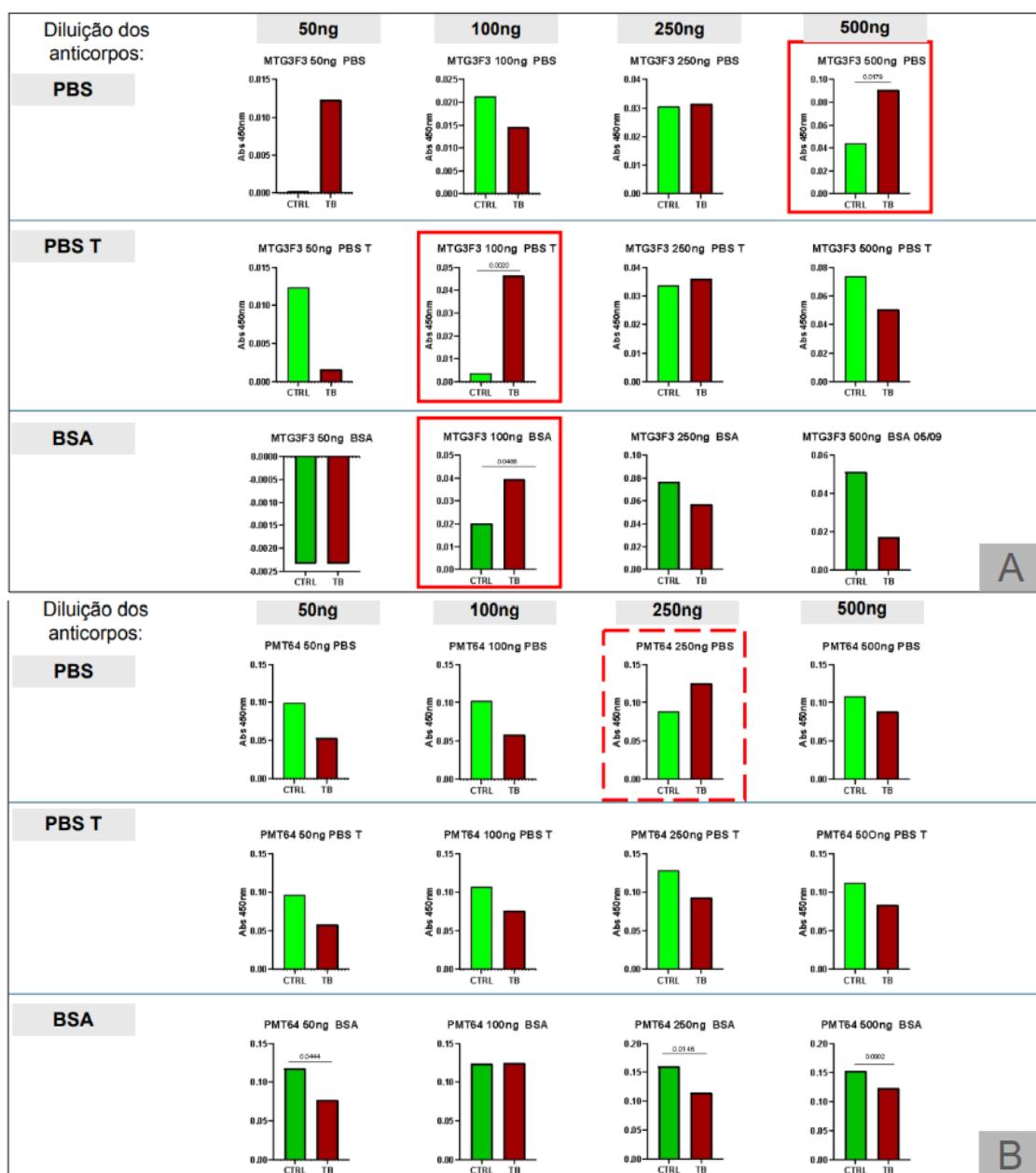


Figura 3: Teste comparativo para concentrações da proteína, comparando entre 50ng, 100ng, 250ng e 500ng. Além de verificar qual diluente para o anticorpo seria mais adequado, comparando entre PBS-T, PBS e BSA. (A) Resultados testados na proteína MTG3F3. (B) Resultados da proteína PMT64. As melhores condições testadas foram destacadas por margens vermelhas, onde é possível visualizar os melhores resultados. Teste t não-pareado. $P \geq 0,005\%$.

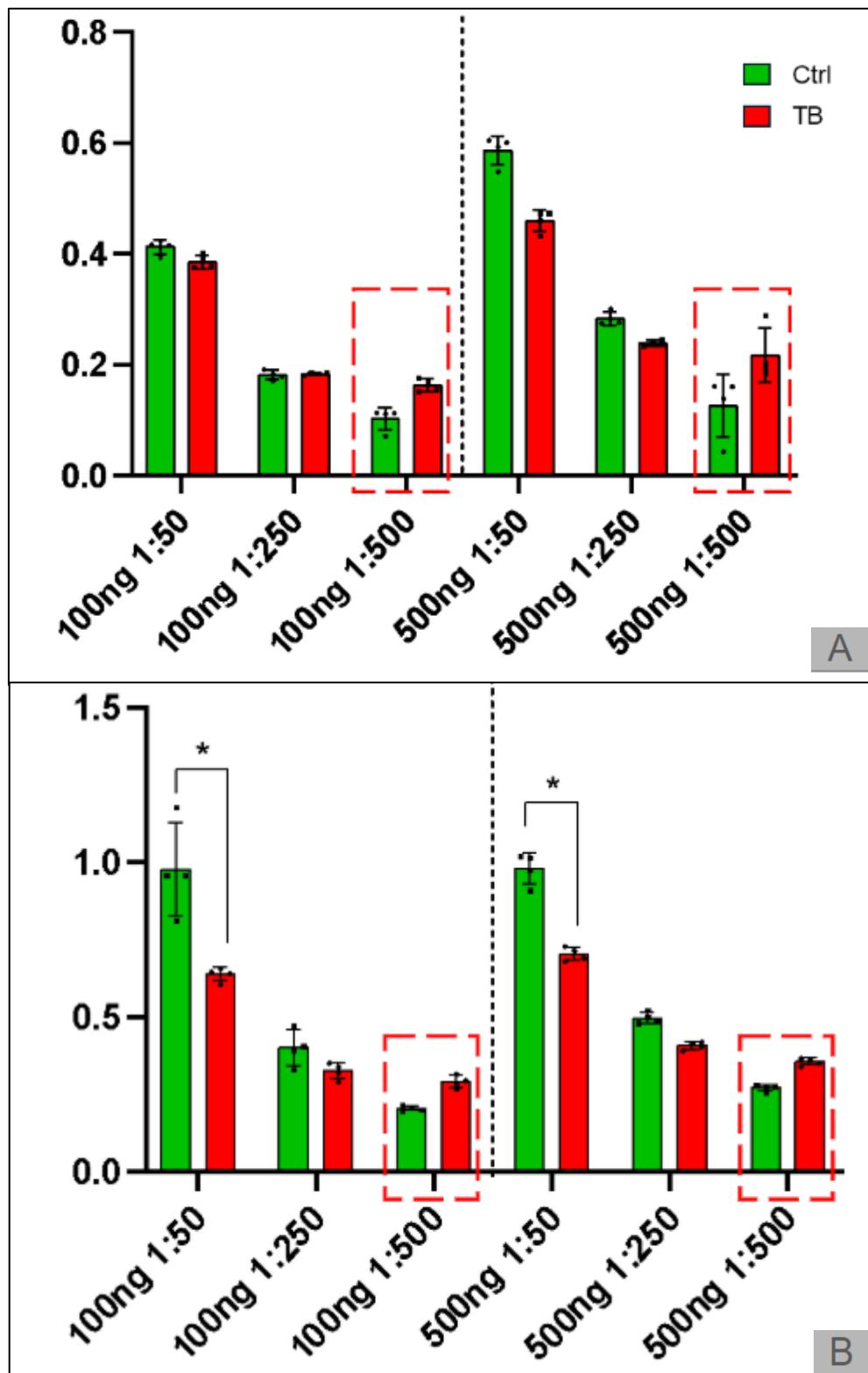


Figura 4: Teste comparativo para diluição do soro, usando as diluições de 1:50, 1:250 e 1:500. Sendo o gráfico A referente a proteína recombinante MTG3F3, já o gráfico B sobre a proteína PMT64. Teste t não-pareado. $P \geq 0,005\%$.

5.4 ELISA 4

Após a padronização das condições foi então realizado a análise individualizada do *pool* de pacientes individualizados ($n=20$). Nesse teste para proteína MTG3F3 houve uma pequena diferença entre as amostras de pacientes contaminados (TB) e os pacientes saudáveis (CTRL), mas sem resultados estatisticamente significativos. Enquanto a proteína PMT64 apresentou uma média que não mostrou discriminação entre os pacientes contaminados (TB) e os pacientes saudáveis (CTRL).

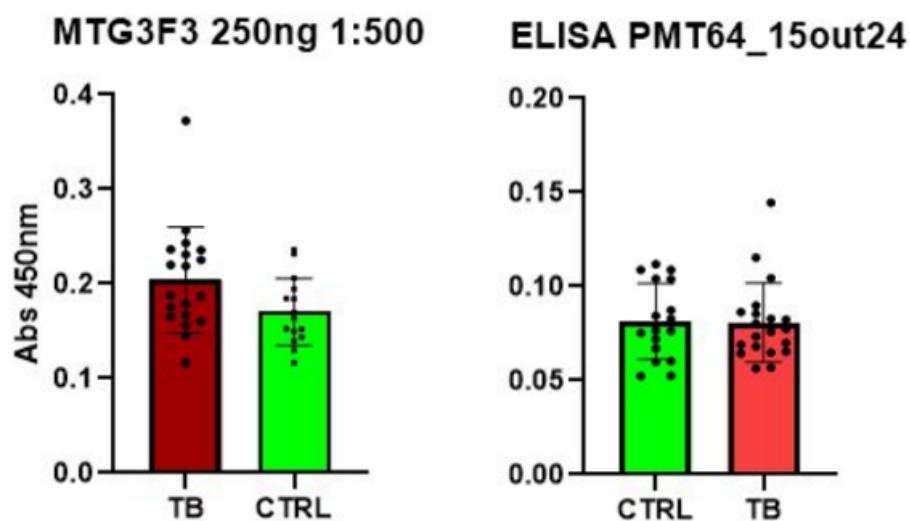


Figura 3: Teste comparativo para verificar discriminação de positivo e negativo para presença de amostra de pacientes com MTB (TB) e amostras de pacientes saudáveis (CTRL). Teste t não-pareado. $P \geq 0,005\%$.

6. DISCUSSÃO

A padronização criteriosa de ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA indireto, é fundamental para garantir maiores taxas de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos resultados. Durante a padronização, três etapas críticas para o sucesso do ensaio são: a escolha da solução de bloqueio, a titulação das amostras teste (soros) e a concentração da proteína antigênica para sensibilização da placa (Alves *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

A solução de bloqueio tem como objetivo evitar ligações inespecíficas nas regiões da placa que não foram recobertas pelo antígeno. A escolha inadequada pode resultar em alto sinal de fundo, comprometendo a distinção entre amostras positivas e negativas. Cada antígeno pode interagir de forma diferente com o bloqueador, podendo mascarar epítopos ou interferir na ligação do anticorpo primário. Assim, é essencial testar diferentes bloqueadores e concentrações

para definir aquele que proporcione menor ruído de fundo sem prejudicar a detecção específica (Carvalho *et al.*, 2023). A escolha de BSA 3% como solução de bloqueio mostrou-se mais eficaz na redução de ligações inespecíficas em comparação ao Molico 5% (Figura1). Essa diferença pode estar relacionada à composição variável do leite em pó, que contém caseínas e outros componentes capazes de interagir de forma não específica com proteínas da placa ou anticorpos. Outro ponto relevante sobre o leite em pó é que ele pode apresentar maior variabilidade entre lotes que o BSA, sendo muito relevante particularmente em ensaios de alta sensibilidade como o ELISA (Adamiec-Mroczeck *et al.*, 2025; Jeyachandran *et al.*, 2010; Thermo Fisher Scientific).

No que diz respeito à amostra, a diluição ideal do soro é fundamental para encontrar o ponto de equilíbrio entre sensibilidade e especificidade do teste. Devemos considerar que diluições muito baixas (soro concentrado) podem gerar ligação inespecífica e falsos positivos. Por outro lado, diluições muito altas podem resultar em perda de sinal e falsos negativos. O teste de diferentes diluições permite identificar a diluição ideal que mantém a detecção específica de anticorpos, com mínima reatividade cruzada ou ruído de fundo. No nosso caso, a variação observada entre 1:50; 1:100; 1:250 e 1:500 sugere que a concentração ideal pode depender da carga de anticorpos nos pacientes. A diluição 1:100, selecionada em etapas posteriores, pode ser mais adequada para capturar níveis elevados de anticorpos em indivíduos com TB ativa, enquanto diluições maiores (1:250 ou 1:500) poderiam ser úteis em contextos de baixa carga bacteriana. No entanto, a inconsistência entre os testes indica a necessidade de otimização adicional, considerando fatores como heterogeneidade sorológica e estágio da doença (Tran *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

Por fim, a quantidade de antígeno recobrindo a placa é determinante para a captação eficiente dos anticorpos presentes no soro. É necessário considerar que concentrações muito baixas podem reduzir a sensibilidade, dificultando a detecção de amostras com baixa carga de anticorpos. E concentrações excessivamente altas podem aumentar a ligação inespecífica e o consumo desnecessário de reagente. O ensaio de titulação da proteína permite definir a menor concentração capaz de manter alta sensibilidade, otimizando o custo-benefício do teste (Alhajj *et al.*, 2025; Thermo Fisher Scientific). Aqui, as concentrações de antígeno também apresentaram variações significativas: 100 ng para MTG3F3 e 250 ng para PMT64 foram as mais promissoras, visto que sugerem tendências na discriminação entre amostras positivas e pacientes saudáveis (Figura 3).

Finalmente sobre a capacidade de validação do teste que foi analisada e mostrou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos TB e CTRL nas análises individualizadas ($n=20$) é um ponto crítico. Isso pode indicar limitações na capacidade

discriminatória das proteínas testadas, possivelmente devido à variabilidade na resposta imune dos pacientes em decorrências de infecções prévias ou à presença de anticorpos contra antígenos não relacionados à TB. Tais achados destacam a importância de estudos adicionais para aprimorar a especificidade e sensibilidade desses marcadores em diferentes populações e cenários clínicos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram avanços na padronização de um teste ELISA indireto para detecção de anticorpos contra antígenos recombinantes do MTB, embora desafios na discriminação entre os grupos precisem ainda de mais ajustes para garantir maior sensibilidade e melhor especificidade. Foram abordadas diversas estratégias que visavam padronizar condições mais favoráveis para discriminação de amostras de indivíduos infectados com tuberculose e indivíduos saudáveis, no entanto mais testes e ajustes precisam ser realizados para alcançarmos melhores resultados.

8. REFERÊNCIAS

- ACHARYA, B. *et al.* Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Biol Rep**, v. 47, n. 5, p. 4065-4075, mai. 2020. DOI: 10.1007/s11033-020-05413-7.
- ADAMIEC-MROCZEK, J. *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determining neutrophil elastase (NE) - a potential useful marker of multi-organ damage observed in COVID-19 and post-Covid-19 (PCS). **Front Mol Biosci**, v. 12, p. 1542898, fev. 2025. DOI: 10.3389/fmolb.2025.1542898.
- ALHAJJ, M. *et al.* Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. In: **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, jan. 2025.
- AL-MATARY, A. M.; AL GASHAA, F. A. S. Comparison of different rapid screening tests and ELISA for HBV, HCV, and HIV among healthy blood donors and recipients at Jibla University Hospital Yemen. **J Med Life**, v. 15, n. 11, p. 1403-1408, nov. 2022. DOI: 10.25122/jml-2022-0051.
- ALVES, T. *et al.* Standardization and validation of an indirect ELISA based on the extraction of proteins from *Leptospira spp.* as an antigen for the diagnosis of canine leptospirosis. **Arq Inst Biol**, v. 90, e00232022, 2023. DOI: 10.1590/1808-1657000232022.
- BAGCCHI, S. WHO's Global Tuberculosis Report 2022. **Lancet Microbe**, v. 4, n. 1, p. e20, jan. 2023.
- BI, K. *et al.* The past, present and future of tuberculosis treatment. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 51, n. 6, p. 657-668, dez. 2022. DOI: 10.3724/zdxbbyxb-2022-0454.
- BORGES, L. *et al.* Technical bioanalytical considerations for detection and quantification of cytokines in ELISA assays. **Cytokine**, v. 151, p. 155615, mar. 2022. DOI: 10.1016/j.cyto.2021.155615.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 288 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para o diagnóstico laboratorial de tuberculose e micobactérias não tuberculosas de interesse em Saúde Pública no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 494 p.
- CARVALHO, W. A. *et al.* A necessidade da etapa de bloqueio em ensaios de ELISA. **Embrapa Pecuária Sul**, n. 55, 2023.
- CHEN, H. *et al.* A Peptidomic Approach to Identify Novel Antigen Biomarkers for the Diagnosis of Tuberculosis. **Infect Drug Resist**, v. 15, p. 4617-4626, ago. 2022. DOI: 10.2147/IDR.S373652.

CHURCHYARD, G. *et al.* What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. **J Infect Dis**, v. 216, suppl_6, p. S629-S635, nov. 2017. DOI: 10.1093/infdis/jix362.

CONCEIÇÃO, E. C. *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil before the whole genome sequencing era: a literature review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 116, e200517, mar. 2021. DOI: 10.1590/0074-02760200517.

CROWTHER, J. R. The ELISA guidebook. **Methods Mol Biol**, v. 149, p. III-IV, 1-413, 2000. DOI: 10.1385/1592590497.

DIAS, V. M. C. H. *et al.* Testes sorológicos para COVID-19: interpretação e aplicações práticas. **Journal of Infection Control**, supl. COVID-ABIH, 16 jun. 2020. Disponível em: https://sbn.org.br/fileadmin/user_upload/Noticias/Artigo_de_Revisao_para_Journal_of_Infection_Control.pdf.

ENGEL, N. *et al.* Rapid molecular tests for tuberculosis and tuberculosis drug resistance: a qualitative evidence synthesis of recipient and provider views. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, n. 4, p. CD014877, abr. 2022. DOI: 10.1002/14651858.CD014877.pub2.

GRILL, F. J. *et al.* Development of a rapid lateral flow assay for detection of anti-coccidioidal antibodies. **J Clin Microbiol**, v. 61, n. 9, p. e0063123, set. 2023. DOI: 10.1128/jcm.00631-23.

GUERREIRO, T. A.; SILVA, T. F. Panorama epidemiológico da tuberculose em crianças e adolescentes no Brasil: análise de casos notificados entre 2003 e 2023. **Ciências da Saúde**, v. 28, n. 138, 03 set. 2024. DOI: 10.69849/revistaft/ar10202409031159.

HAYRAPETYAN, H. *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. **Methods Mol Biol**, v. 2612, p. 1-17, 2023. DOI: 10.1007/978-1-0716-2903-1_1.

JACOBO-DELGADO, Y. M. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* cell-wall and antimicrobial peptides: a mission impossible? **Front Immunol**, v. 14, p. 1194923, mai. 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1194923.

JAFARI, C. *et al.* Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by combined molecular and immunological methods. **Eur Respir J**, v. 51, n. 5, mai. 2018. DOI: 10.1183/13993003.02189-2017.

JEYACHANDRAN, Y. L. *et al.* Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. **J Colloid Interface Sci**, v. 341, n. 1, p. 136-142, jan. 2010. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.09.007.

LEI, Y. *et al.* Geographical evolutionary pathway of global tuberculosis incidence trends. **BMC Public Health**, v. 23, n. 1, p. 755, abr. 2023. DOI: 10.1186/s12889-023-15553-7.

LEUNG, A. N. Pulmonary tuberculosis: the essentials. **Radiology**, v. 210, n. 2, p. 307-322, fev. 1999. DOI: 10.1148/radiology.210.2.r99ja34307.

- LIU, C. *et al.* Quantification of circulating *Mycobacterium tuberculosis* antigen peptides allows rapid diagnosis of active disease and treatment monitoring. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 15, p. 3969-3974, abr. 2017. DOI: 10.1073/pnas.1621360114.
- LUIES, L.; DU PREEZ, I. The Echo of Pulmonary Tuberculosis: Mechanisms of Clinical Symptoms and Other Disease-Induced Systemic Complications. **Clin Microbiol Rev**, v. 33, n. 4, jul. 2020. DOI: 10.1128/CMR.00036-20.
- MAGNO, L. *et al.* Desafios e propostas para ampliação da testagem e diagnóstico para COVID-19 no Brasil. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 25, p. 3355-3364, set. 2020. DOI: 10.1590/1413-81232020259.17812020.
- MAISON, D. P. Tuberculosis pathophysiology and anti-VEGF intervention. **J Clin Tuberc Other Mycobact Dis**, v. 27, p. 100300, mai. 2022. DOI: 10.1016/j.jctube.2022.100300.
- MAITRA, A. *et al.* Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. **FEMS Microbiol Rev**, v. 43, n. 5, p. 548-575, set. 2019. DOI: 10.1093/femsre/fuz016.
- NATARAJAN, A. *et al.* A systemic review on tuberculosis. **Indian J Tuberc**, v. 67, n. 3, p. 295-311, jul. 2020. DOI: 10.1016/j.ijtb.2020.02.005.
- NGUYEN, N. N. *et al.* Correlation of ELISA method with three other automated serological tests for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. **PLoS One**, v. 15, n. 10, p. e0240076, out. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0240076.
- PAN, X. *et al.* mpt64 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* with negative MPT64 antigen assay results from a tertiary hospital in Southeastern China. **Front Med**, v. 12, p. 1531853, fev. 2025. DOI: 10.3389/fmed.2025.1531853.
- PANDEY, S. *et al.* Macrophages in Microbial Pathogenesis: Commonalities of Defense Evasion Mechanisms. **Infect Immun**, v. 90, n. 5, p. e0029121, mai. 2022. DOI: 10.1128/IAI.00291-21.
- RAVIMOHAN, S. *et al.* Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. **Eur Respir Rev**, v. 27, n. 147, p. 170077, mar. 2018. DOI: 10.1183/16000617.0077-2017.
- ROSSONI, A. M. O. *et al.* Evaluation of pulmonary tuberculosis diagnostic tests in children and adolescents at a pediatric reference center. **Pulmonology**, v. 28, n. 2, p. 83-89, 2022. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2020.01.001.
- RYU, Y. J. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms. **Tuberc Respir Dis (Seoul)**, v. 78, n. 2, p. 64-71, abr. 2015. DOI: 10.4046/trd.2015.78.2.64.
- SAKULA, A. Robert koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Can Vet J**, v. 24, n. 4, p. 127-131, abr. 1983.

SMITH, J. P. *et al.* Quantifying *Mycobacterium tuberculosis* Transmission Dynamics Across Global Settings: A Systematic Analysis. **Am J Epidemiol**, v. 192, n. 1, p. 133-145, jan. 2023. DOI: 10.1093/aje/kwac181.

SUN, J.; CHAMPION, P. A.; BIGI, F. Editorial: Cellular and Molecular Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* Virulence. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 9, p. 331, out. 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00331.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Blocking buffers for Western Blot and ELISA**. [S. l.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/blocking-buffers-western-blot-elisa.html>.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **ELISA development and optimization**. [S. l.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa/elisa-development-optimization.html>.

TRAN, A. C. *et al.* Serological analysis reveals differential antibody responses between TB patients and latently infected individuals from the TB endemic country of Mozambique. **Front Med**, v. 10, p. 1286785, out. 2023. DOI: 10.3389/fmed.2023.1286785.

VILLA, T. C. *et al.* Early diagnosis of tuberculosis in the health services in different regions of Brazil. **Rev Lat Am Enfermagem**, v. 21, p. 190-198, 2013. DOI: 10.1590/S0104-11692013000700024.

WANG, P. *et al.* Establishment of an indirect ELISA for *Mycobacterium tuberculosis* MTB39A protein antibody. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 107, n. 20, p. 6339-6349, out. 2023. DOI: 10.1007/s00253-023-12715-w.

WHO - World Health Organization. **Global tuberculosis report 2023**. Geneva: WHO, 2023. 75 p. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>.

WHO - World Health Organization. **THE END TB strategy**, 2015. Geneva. 20 p Disponível em: Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-TB-2015.19>