

RESPOSTA IMUNE HUMORAL AO ANTÍGENO rGroES DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM PACIENTES COM TUBERCULOSE E SEUS CONTATOS DOMICILIARES

Adeliane Castro da COSTA, Ana Paula JUNQUEIRA-KIPNIS, Michelle Cristina Guerreiro dos REIS, Bruna Daniella de Souza SILVA e Monalisa Martins TRENTINI.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235, esquina com 1ª Avenida, s/n, Setor Universitário, CEP 74605-050, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: adelianebiomedica@hotmail.com

Palavras Chaves: *Mycobacterium tuberculosis*. ELISA. Pacientes. Contatos.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença endêmica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Esta doença constitui um problema de saúde pública, visto que acarreta cerca de dois milhões de mortes por ano (Selvaraj et al., 2009). No Brasil, a tuberculose leva ao adoecimento cerca de 80.000 pessoas e provoca em torno de 5.000 mortes por ano. Em Goiás, no ano de 2005 o total de casos novos de tuberculose notificados foi de 745, sendo 472 da forma pulmonar bacilífera. Goiânia é um dos municípios do estado que exige atenção prioritária do Programa Nacional de Controle de Tuberculose (PNCT).

O *Mtb* é um patógeno intracelular caracterizado por promover uma ampla resposta imune dos tipos Th1, Th2, Th17, dentre outros (Abebe & Bjune 2009). As células B induzidas tanto por Th1 como por Th2 respondem produzindo anticorpos que, ativando o sistema complemento, ora favorecem a entrada do microorganismo na célula, ora induzem sua eliminação (Maglione & Chan, 2009). Em infecções agudas, as células B atuam na formação do granuloma e na imunidade efetiva contra o bacilo; na fase crônica, atuam na perpetuação da resposta imune e na prevenção da reativação da doença (Maglione & Chan, 2009). Atualmente, o teste padrão-ouro empregado para o diagnóstico laboratorial da TB baseia-se na demonstração de micobactérias nos fluidos corporais, porém, em razão de sua baixa sensibilidade (65% - 85%), novos testes baseados na resposta imune estão sendo estudados por serem considerados métodos laboratoriais rápidos e de baixo custo (Singh & Espitia, 2007). Em pacientes com TB, a resposta sorológica a antígenos de micobactérias tem sido avaliada principalmente pela técnica de ELISA (Singh & Espitia, 2007).

GroES é uma proteína de choque térmico produzida e secretada pelo *Mtb* quando este se encontra em condições de estresse. Este antígeno é conhecido como HSP10 (Boesen et al., 1995) e possui de 10kDa a 14kDa (Boesen et al.,1995;Kashyap et al.,2010). Sua imunogenicidade já foi comprovada, uma vez que é capaz de ser reconhecido por linfócitos de indivíduos com TB ativa ou

latente (Boesen et al.,1995;Arend et al.,2000). Já foi demonstrada, em estudo anterior, a importância deste antígeno como marcador de diagnóstico de tuberculose acítica por permitir a discriminação de indivíduos com tuberculose acítica de controles negativos (Kashyap et al.,2010). No entanto, ainda não foi estudado este padrão de resposta nos pacientes com TB pulmonar e em seus contatos intradomiciliares. Neste estudo, foi avaliada a resposta imune humoral de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e seus contatos intradomiciliares (CID) com prova tuberculínica (PT) positiva e negativa, no momento do diagnóstico, por meio de ensaio de ELISA ante o antígeno rGroES do *Mtb*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A população de estudos constituiu-se por pacientes maiores de 18 anos e de qualquer sexo: diagnóstico de tuberculose pulmonar (sintomatologia característica, radiografia sugestiva, baciloscopia positiva ou negativa), realizado pela equipe médica nos Centros de Assistência Integral à Saúde (CAIS) da região metropolitana de Goiânia e no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (HDTAA) e por indivíduos residentes no mesmo domicílio ou lote, frequentadores assíduos de qualquer sexo ou idade (Contatos).

Foram coletados 20 ml de sangue heparinizado de cada indivíduo no momento do diagnóstico. Foram aplicados intradermicamente 100µl de PPD Rt 23 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) no antebraço esquerdo de cada contato dos pacientes. A leitura da induração cutânea ocorreu 72 horas após a aplicação e os contatos foram classificados, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela OMS, em PT positivos (induração cutânea maior ou igual a 10 mm) e PT negativos (induração cutânea menor que 10 mm). Neste estudo, foi utilizado o antígeno proteico recombinante GroES (rGroES) do *Mtb* no método de ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-rGroES das classes IgM e IgG dos pacientes com doença ativa e dos contatos. As leituras dos indivíduos foram comparadas por meio do *test t* de *Student*, pelo qual foi considerada significância $p < 0,05$. As Análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prisma 5.

RESULTADOS

Dos 45 pacientes com tuberculose pulmonar ativa que participaram da pesquisa, 66,66% (n=30) eram do sexo masculino e 33,33% (n=15), do sexo feminino. A média de idade dos indivíduos do sexo masculino foi de 41,1 anos. Desses, 56,66% (n=17) receberam a vacina BCG e 43,33% (n=13) não apresentaram cicatriz vacinal; 93,33% (n=28) tiveram RX do tórax sugestivo de tuberculose pulmonar e 6,66% (n=2) não realizaram o RX do tórax; 93,33% (n=28) tiveram resultado de BAAR positivo e 3,33% (n=1), negativo e somente 3,33% (n=1) não foram submetidos à técnica de BAAR. Todos os pacientes receberam tratamento segundo o esquema 1 (rifampicina, isoniazida e pirazinamida) para a tuberculose pulmonar.

Entre os pacientes do sexo feminino, a média de idade foi de 43,86 anos. Do total,

46,66% (n=7) receberam a vacina BCG na infância e 53,33% (n=8) não apresentaram cicatriz vacinal; 93,33% (n=14) apresentaram RX do tórax sugestivo de tuberculose pulmonar e 6,66% (n=1) não realizaram RX pulmonar; 66,66% (n=10) tiveram resultado de BAAR positivo; 20% (n=3), negativo e apenas 13,33% (n=2) não foram submetidos à técnica de BAAR. A maioria das mulheres (n=13) foi submetida ao esquema de tratamento 1; contudo uma delas foi tratada com o esquema EIR (rifampicina, isoniazida e etambutol) de tratamento para tuberculose pulmonar.

Dos 172 contatos domiciliares dos pacientes com tuberculose pulmonar, que aceitaram participar da pesquisa, 51,46% (n=88) eram do sexo masculino, ao passo que 49,12% (n=84) eram do sexo feminino. Com relação aos contatos do sexo masculino, a média de idade foi de 31,4 anos. Desses, 77,27% (n=68) receberam a vacina BCG na infância, entretanto 22,27% (n=20) não apresentaram a cicatriz vacinal. Após a realização da PT no momento do diagnóstico do caso índice, 52 indivíduos com idade variando entre 6 e 73 anos apresentaram PT negativa e 36 indivíduos apresentaram resultados positivos.

A média de idade dos contatos do sexo feminino, participantes do estudo, foi de 34,6 anos. Neste grupo, 76,19% (n=64) receberam a vacina BCG na infância e 23,80% (n=20) não apresentaram cicatriz vacinal. Após 72 horas da realização da PT, 44 indivíduos com idade variando entre 8 e 80 anos apresentaram PT negativa e 40 indivíduos apresentaram PT positiva.

Na análise dos anticorpos da classe IgM, observou-se que os CID, PT negativa, apresentaram níveis de anticorpos da classe IgM específicos para o rGroEs ($0,2328 \pm 0,1423$) superiores aos pacientes ($0,1931 \pm 0,1400$) com $p = 0,0497$. Quando indivíduos com TB ativa e CID PT positiva foram comparados, níveis semelhantes de anticorpos da classe IgM específicos do rGroES foram encontrados (TB = $0,1931 \pm 0,1400$; CID PT+ ($0,2128 \pm 0,1510$)).

Na análise dos anticorpos da classe IgG, os indivíduos com tuberculose ativa apresentaram níveis superiores desses anticorpos, específicos do rGroES, ($0,2034 \pm 0,2142$), quando comparados aos níveis encontrados nos CID PT- ($0,1211 \pm 0,1456$), com $p=0,0168$. Com base nestes resultados, obteve-se sensibilidade de 78,38% (IC 95% de 61,79% a 90,17%) e especificidade de 31,76% (IC 95% de 22,08% a 42,76%), para um Cut-off de 0,0520. Para este teste ELISA, a área sobre a curva (AUC) foi de 0,6367. No entanto, os indivíduos com tuberculose ativa apresentaram níveis de anticorpos da classe IgG específicos do rGroES ($0,2034 \pm 0,2142$) semelhantes aos CID PT+ ($0,1673 \pm 0,1815$).

DISCUSSÃO

A análise dos dados obtidos neste estudo demonstra que a maioria dos indivíduos com TB ativa era do sexo masculino. De acordo com a OMS, a TB afeta mais homens do que mulheres em razão do dinamismo dos indivíduos do sexo masculino (WHO,2006). Além disso, a maioria dos

indivíduos com TB ativa era vacinada com BCG, já que havia a presença da cicatriz vacinal, porém a cobertura vacinal descrita em nossa população de estudo foi inferior ao esperado pela OMS no Brasil. Alguns indivíduos vacinados com BCG não induzem a formação de uma cicatriz vacinal, provavelmente por uma resposta preferencial do tipo Th2 em detrimento da Th1 que seria a esperada (Yenny et al.,2010). Em infecções pelo *Mtb*, a resposta imune humoral induzida por linfócitos Th2 impede respostas imunes exacerbadas que possam prejudicar o hospedeiro, sendo, muitas vezes, uma resposta reguladora. Estes anticorpos específicos do agente bacteriano parecem conferir pouca ou nenhuma imunidade protetora contra a micobactéria (Bonato et al.,1998). Os anticorpos irão opsonizar o *Mtb* e suas proteínas secretadas, facilitando seu reconhecimento pelas células do sistema imune (Flynn & Chan,2001). Há muito tem sido estudado o papel dos anticorpos na resposta imune humana à tuberculose com o intuito de utilizá-los em seu diagnóstico laboratorial (Jackett et al.,1988).

Os níveis plasmáticos de IgM anti-rGroES, em indivíduos PT negativa, foram superiores aos pacientes com TB, havendo diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p=0,0497$). Segundo Chua-Intra et al. (2002), o antígeno GroES é conservado entre espécies e seus homólogos estão presentes em células procariotas, o que poderia explicar a detecção de anticorpos IgM em nosso grupo de contatos PPD negativos. Entretanto, é importante salientar que a identificação de infecção por *M. tuberculosis* entre os contatos de pacientes tuberculosos bacilíferos é muito difícil, uma vez que a negatividade da PT pode estar associada a uma janela de reconhecimento imunológica e não, necessariamente, evidenciar uma ausência de infecção (Zang et al., 2010).

Ao contrário, foram verificados níveis plasmáticos superiores ($p=0,0169$) de anticorpos IgG anti-rGroES nos indivíduos TB em relação aos seus CID PT negativa, sugerindo que este antígeno pode discriminar estes dois grupos quando se avalia a presença de IgG. Estes achados concordam com Young & Garbe (1991) e Boesen et al. (1995), os quais relatam que o GroES é um antígeno imunodominante do *Mtb* capaz de provocar forte resposta de células B em indivíduos infectados e forte resposta de células T nas primeiras fases da doença.

Quando se avalia a produção de anticorpos da classe IgG anti-GroES do *Mtb*, verifica-se que o antígeno testado é capaz de discriminar indivíduos com TB ativa de seus contatos com PT negativa. Portanto, este antígeno poderia ser integrado a um teste para fins de triagem de indivíduos com tuberculose pulmonar.

ÓRGÃOS FINANCIADORES

CNPq: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), CNPq/MST/DECIT e Fundação de apoio a pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

REFERÊNCIAS:

1. Abebe F, Bjune G. The protective role of antibody response during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exper Immunol* 157: 235-243, 2009.
2. Arend SM, Geluk A, Meijgaarden KE, Dissel JT, Theisen M, Andersen P, Ottenhoff THM. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect Immun* 68: 3314-3321, 2000.
3. Boesen H, Jensen BN, Wilcke T, Andersen P. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63: 1491-1497, 1995.
4. Bonato VL, Lima VM, Tascom RE, Lowrie DP, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp 65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 66: 169-175, 1998.
5. Chan ED, Heifets L, Iseman MD. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber Lung Dis* 80: 131-140, 2000.
6. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Ann Rev Immunol* 19: 93-129, 2001.
7. Jaccott PS, Bothamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi J. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 26: 2313, 1988.
8. Kashyap RS, Saha SM, Nagdev KJ, Kelkar SS, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. Diagnostic Markers for Tuberculosis Ascites: A Preliminary Study. *Biomarker Insights* 5: 87-94, 2010.
9. Maglione PJ, Chan J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 39: 676-686, 2009.
10. Selvaraj P, Prabhu Anand S, Harishankar M, Alagarasu K. Plasma 1,25 Dihydroxy Vitamin D₃ Level and Expression of Vitamin D Receptor and Cathelicidin in Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Immun* 29: 470-478, 2009.
11. World Health Organization. *The global Plan to Stop TB 2006-2015*. Genève, WHO; 2006.
12. Young, DB, Garbe TR. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 59: 3086-3093, 1991.