

ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR CONTRA O ANTÍGENO MPT-51 DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

CARVALHO, Viviane Souza¹; **CARDOSO**, Cristina Melo Cardoso Almeida; **JUNQUEIRA-KIPNIS**, Ana Paula².

Palavras-chave: tuberculose, MPT-51, resposta humoral, ELISA.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa que causa mais de dois milhões de morte por ano, no mundo todo (FRIEDEN et al, 2003). Apesar de ser uma doença de diagnóstico fácil, os altos índices de infecção podem ser explicados pelo fato de que a maioria desses indivíduos apresenta doença assintomática e acredita-se que o bacilo durante essa fase, encontra-se em latência. A tuberculose induz uma resposta imune protetora, envolvendo células T que secretam citocinas como o interferon gama para agirem sobre os macrófagos no intuito de eliminar os bacilos. No entanto os linfócitos B também são encontrados na formação do granuloma e acredita-se que a resposta humoral também é necessária para contenção desses bacilos (FLYNN, CHAN, 2001). Devido às falhas existentes nas técnicas de diagnóstico, muitos pesquisadores têm tentado identificar antígenos do *M. tuberculosis* que sejam capazes de induzir a formação de anticorpos (Ac) e que poderão ser usados para um sorodiagnóstico. O MPT-51 que é produzido pelo *M. tuberculosis* e por outras micobactérias patogênicas (WILSON et al, 2004) tem se destacado como um marcador de diagnóstico de tuberculose, especialmente em pacientes HIV+, onde as imunodeficiências favorecem a disseminação rápida do patógeno (RAMALINGAM et al, 2003). Nesse trabalho, utilizaremos o antígeno recombinante MPT-51 de *M. tuberculosis* para o teste de ELISA. Espera-se que esse antígeno seja reconhecido por pacientes que apresentem a tuberculose pulmonar e que seja capaz de discriminar indivíduos com tuberculose dos controles saudáveis, facilitando o processo de diagnóstico e evitando dessa forma, a difusão da doença.

2. METODOLOGIA

2.1- População

As amostras dos pacientes foram coletadas (n=27) no período de março de 2005 a dezembro de 2005 no Hospital de Doenças Tropicais, no Centro de Referência e Diagnóstico em Goiás e na Universidade Federal de Goiás. Todos os participantes, de ambos os sexos e maiores de 18 anos assinaram a um termo de consentimento, antes de serem vinculados à pesquisa. Os voluntários foram pareados por sexo e idade com dois outros grupos: indivíduos controle saudáveis e pacientes com hanseníase, de acordo com os critérios estabelecidos para cada grupo.

2.2- Antígeno e anticorpos

Antígeno protéico MPT-51 e anticorpos: Anti IgG, anticorpo monoclonal de coelho, anti-IgG humana conjugado com peroxidase (IgG-HRP, BIO-RAD R). Anti IgM, anticorpo monoclonal de cabra, anti-IgM humana conjugado com peroxidase (IgM-HRP, ZYMED R)

2.3- ELISA – Ensaio Imunoenzimático

A placa de poliestireno (NUNC) foi adsorvida com o antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 na concentração de 10µg/mL. Os soros foram diluídos em PBS, leite desnatado a 0,05% nas concentrações de 1/100 e 1/10, para a detecção de IgG e IgM, respectivamente. No caso do anticorpo IgG, o conjugado (Ac de coelho anti-IgG humana conjugado com peroxidase; Biolab) foi diluído na concentração de 1/15000, e para o anticorpo IgM, o conjugado (Ac de cabra anti-IgM humana conjugada com peroxidase; Biolab) foi diluído na concentração de 1/5000. O substrato foi preparado com OPD (5µg/ml - Ortofenilenodiamina- Sigma), peróxido de oxigênio (30V) e tampão citrato-fosfato pH 5,0-5,2. O bloqueio da reação foi feito com solução de ácido sulfúrico a 4N e a placa foi lida a 492nm por um espectrofotômetro de placas (Thermo Labsystem-original Multiskan). As densidades óticas foram analisadas utilizando o programa EXCELL, Microsoft e posteriormente os gráficos foram construídos no programa PRISMA.

2.4- Análise estatística.

A comparação entre as variâncias das densidades óticas obtidas nos diferentes grupos foi realizada por teste ANOVA. Foi considerado $p < 0,05$ como resultado significativamente diferente. Test T de student foi usado para comparar de maneira pareada os resultados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Análise da resposta imune humoral de pacientes com tuberculose pulmonar ao antígeno recombinante MPT-51 do *Mycobacterium tuberculosis* por imunoglobulinas humanas da classe IgG.

O resultado apresentado na Figura 1 demonstra os resultados do ELISA usando antígeno MPT-51 (10µg/ml) e os soros testes diluídos a 1/100. Anticorpos da classe IgG anti MPT-51 de pacientes tuberculosos apresentaram densidades óticas semelhantes àquelas observadas nas respostas dos controles. No entanto, comparando os resultados obtidos dos indivíduos com tuberculose ativa e do grupo hanseníase, foi possível observar uma diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,01$).

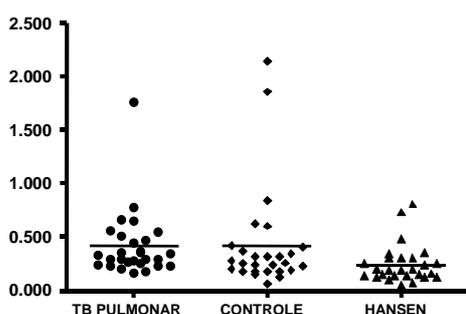


Figura 1. ELISA para anticorpos da classe IgG humanos contra o antígeno MPT-51. Soros de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, pareados por sexo e idade com indivíduos controle saudáveis e pacientes com hanseníase (n=27).

3.2-Análise da resposta imune humoral de pacientes com tuberculose pulmonar ao antígeno recombinante MPT-51 do *Mycobacterium tuberculosis* por imunoglobulinas humanas da classe IgM.

O resultado apresentado na Figura 2 demonstra os resultados do ELISA usando antígeno MPT-51 (10µg/ mL) e os soros testes diluídos a 1/10. Nesta Figura, observa-se que anticorpos da classe IgM anti MPT-51 de pacientes tuberculosos apresentam uma densidade ótica duas vezes maior que os controles e que os pacientes hanseníase, sendo portanto são capazes de discriminar controles

saudáveis, pacientes tuberculosos e indivíduos com doença com alta identidade genética com o *M. tuberculosis* como a hanseníase ($p < 0,01$).

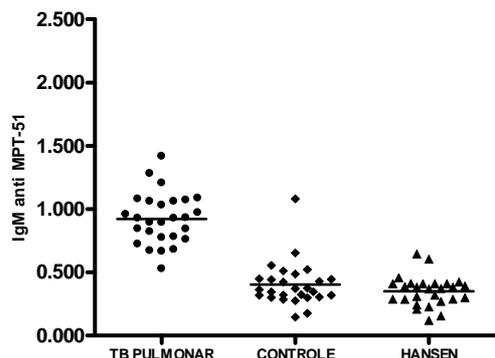


Figura 2. ELISA para anticorpos da classe IgM, humanos contra o antígeno MPT-51. Soros de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, pareados por sexo e idade com indivíduos controle saudáveis e pacientes com hanseníase (n=27).

4. CONCLUSÃO

Os resultados descritos acima indicaram que a sorologia feita com o antígeno MPT-51 demonstrou níveis de IgM específicas capazes de discriminar pacientes TB ativa de controles saudáveis e indivíduos hanseníase, enquanto que os níveis de IgG encontrados no soro dos pacientes TB ativa foram discriminantes somente para o grupo hanseníase e não para o controle.

Diante do que foi exposto, pode-se concluir que o antígeno recombinante MPT-51 consegue diferenciar pacientes tuberculosos de controles saudáveis e de indivíduos com hanseníase quando mensurados os níveis de anticorpos IgM e sendo assim, pode ser um bom candidato ao diagnóstico sorológico de tuberculose.

Fonte de financiamento-CNPq – FUNAPE

REFERÊNCIAS

- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet.*, 362: 887-99, 2003.
- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.*, 19: 93-129, 2001.
- Ramalingam B, Uma Devi KR, Raja A. Isotype-specific ant-38 and 27kda (mpt-51) response in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection. *Scand J Infect Dis.*, 35: 234-39, 2003.
- Wilson RA, Maughan WN, Kremer L, Besra GS, Fu"tterer K. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic α/β hydrolases. *J Mol Biol*; 335: 519-530, 2004.

¹Bolsista de Iniciação Científica, Departamento de Imunologia, Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sala 325, IPTSP – UFGO - pinkvivi_vet@hotmail.com

²Orientadora, Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sala 325, IPTSP – UFGO - anapaula@iptsp.ufg.br.