

Reconhecimento dos Antígenos Recombinantes MPT-51 e GlcB do *Mycobacterium tuberculosis* por Anticorpos Séricos de Indivíduos com Tuberculose Ativa.

MELO CARDOSO, Cristina Almeida¹; **CARVALHO**, Viviane Souza; **VASCONCELOS JUNIOR**, Arioldo Carvalho; **ALVES**, João Araújo; **KIPNIS**, André, **JUNQUEIRA-KIPNIS**, Ana Paula².

Palavras-chave: MPT 51, GlcB, anticorpo, *Mycobacterium sp*, ELISA.

1-Introdução (justificativas e objetivos)

A tuberculose (TB) representa um problema de saúde mundial, com um total de 8,8 milhões de casos novos surgindo a cada ano e cerca de dois milhões de mortes no mundo todo (Frieden, Sterling *et al.*, 2003). O Brasil está entre os 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo (Hijjar, 2005). A tuberculose é uma doença infecciosa de evolução lenta causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e algumas espécies de bactérias pertencentes ao chamado complexo *Mycobacterium tuberculosis*. (Brosch, Gordon *et al.*, 2002). A via de transmissão é através do ar contaminado com núcleos de perdigotos contendo bacilos, expelidos por indivíduos doentes. Estes bacilos ao serem inalados, alcançam os alvéolos pulmonares e iniciam sua multiplicação. A infecção inicia-se no parênquima pulmonar, passando em seguida para os nódulos linfáticos da região hilar, podendo disseminar-se para vários órgãos e tecidos pela corrente sanguínea. A infecção do parênquima pulmonar e dos nódulos linfáticos constitui o complexo primário que caracteriza a infecção primária ou primo-infecção. A tuberculose primária, que se desenvolve em uma minoria infectada provavelmente é resultante da progressão do complexo pulmonar primário e da disseminação hematogênica/linfática não controlada pelos mecanismos imunes (Tufariello, Chan *et al.*, 2003).

Embora haja vários estudos para elucidar a resposta imune contra este bacilo, o mecanismo de proteção contra tuberculose não está completamente determinado. A imunidade celular desempenha um papel importante no controle da infecção. Assim as células Th1 estão envolvidas no desenvolvimento da resistência a doença, através de produção de citocinas como INF- γ que ativa os macrófagos para agirem como microbicidas (Flynn, Chan *et al.*, 1993). Apesar da resposta protetora depender da ativação de macrófagos e linfócitos T efetores, a resposta imune humoral parece ajudar no controle da disseminação da infecção e na integridade dos granulomas, sendo assim também induzida durante a infecção natural (Vordermeier, Venkataprasad *et al.*, 1996; Tsai, Chakravarty *et al.*, 2006).

Devido às falhas existentes nas técnicas de diagnóstico empregadas atualmente, seja pela dificuldade em diagnosticar a forma latente, da porcentagem de resultados falso-negativos na baciloscopia (30%) ou pela reprodução lenta do bacilo durante a cultura (4 a 8 semanas) (Dye, Scheele *et al.*, 1999), vários antígenos (Ag) isolados do *M. tuberculosis* têm sido testados para o desenvolvimento de técnicas para o diagnóstico (Kurth e Haas, 2002; Perkins, Conde *et al.*, 2003). Até o momento, nenhum desses antígenos mostrou-se como um forte candidato ao diagnóstico devido à baixa acurácia obtida nos resultados. Isso pode ser explicado pela alta endemicidade e alta prevalência de doenças crônicas em nossa região.

Neste trabalho, dois antígenos o MPT-51 e o GlcB são estudados como possíveis marcadores da tuberculose. O MPT-51 é uma proteína de 27 kDa secretada pelo *M.tuberculosis*, embora tenha sido descrito também em outras micobactérias: *M. leprae*, *M. avium* e *M.bovis*. O MPT-51 não possui ação de micoliltransferase, o que significa que essa proteína não participa da síntese do ácido micólico, um dos principais responsáveis pela virulência do bacilo, entretanto possui estrutura homóloga (40%) aos demais componentes do complexo Ag85, também conhecido como Ag 85D, FbpD, FbpC1 ou ainda MPB-51 (Wilson, Maughan *et al.*, 2004). O GlcB é uma enzima malato sintetase G (MSG), monomérica de 80-kDa, homóloga a malato sintetase (AceB) da bactéria *Corynebacterium glutamicum* e da enzima (MSG) da bactéria *Escherichia coli*. Além de ser usada em sorodiagnóstico, o GlcB parece ser um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes antimicobacteriano (Singh, Dong *et al.*, 2005). Espera-se determinar a existência ou não de anticorpos específicos para o antígenos recombinantes MPT 51 ou do GlcB do *M. tuberculosis* no soro de indivíduos com tuberculose ativa, comparado com soros de indivíduos saudáveis e pacientes hansênicos.

2-Metodologia

2.1- Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFG e cada voluntário assinou um termo de consentimento esclarecido sobre o trabalho proposto. Coletou-se amostras de sangue de voluntários classificados em três grupos, todos pareados por sexo e idade (\pm 6 anos): a-Pacientes com tuberculose pulmonar ativa (n=27), diagnosticados de acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde (baciloscopia e ou cultura positiva, radiografia evidente de tuberculose, sintomas clínicos da doença), com idade variando entre 21 e 74 anos, não portadores de HIV ou outra imunodeficiência; b-Indivíduos saudáveis vacinados com BCG, não reatores ao teste tuberculínico; c-Pacientes com hanseníase da forma clínica Virchoviana, sem evidências clínicas de doença imunossupressora.

2.2- Antígenos protéicos recombinantes produzidos em *E. coli*: GlcB e MPT-51, cedidos pela Universidade Estadual do Colorado, contrato nº NO1-AI-75320.

2.3- Anticorpos: Anti-IgG, anticorpo monoclonal de coelho, anti-IgG humana conjugado com peroxidase (IgG-HRP, BIO-RAD). Anti-IgM, anticorpo monoclonal de cabra, anti-IgM humana conjugado com peroxidase (IgM-HRP, ZYMED)

2.4- Teste de ELISA: O Ag MPT-51 ou o GlcB foi diluído em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 a 10µg/mL, distribuído em placas de poliestireno de 96 poços e incubado a -4°C por 18 horas para adsorção. Os soros diluídos 1/100 (para pesquisa de IgG) e 1/10 (para pesquisa de IgM) em PBS, leite desnatado 0,5%, foram adicionados nas placas, previamente bloqueadas por 2 horas com PBS, leite desnatado a 1%. Após o período de 1 hora, as placas foram lavadas em PBS Tween 20 a 0,05% por seis vezes. O conjugado composto por anticorpo ligado a peroxidase (anti-IgG total humana ou anti-IgM humana) diluído respectivamente a 1/15000 ou 1/5000 em tampão PBS, leite desnatado 0,5% foi adicionado às placas. Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas e aplicou-se o substrato composto de OPD e peróxido de oxigênio diluído em tampão citrato fosfato pH 5,1 por 15 minutos. O bloqueio da reação foi feito com ácido sulfúrico 4N. As placas foram lidas a 492nm em leitora de ELISA.

2.5- Análise estatística: Todos os resultados foram realizados em duplicata. 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.

3-Resultados e discussão:

3.1-Dados epidemiológicos dos participantes testados no ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG e IgM específicos para os antígenos recombinantes MPT-51 e GlcB do *Mycobacterium tuberculosis*. Um total de 27 amostras de soro de pacientes com TB pulmonar ativa, foram selecionadas e pareadas de acordo com o sexo e a idade com as amostras de controles saudáveis e de pacientes hansênicos. A tabela 1 mostra o perfil epidemiológico desses indivíduos utilizados neste experimento. A maioria dos indivíduos utilizados para este ensaio foi do sexo masculino (n=20) com idade variando de 18 a 74 anos. Muitos dos voluntários no nosso estudo não souberam informar se foram vacinados ou não com BCG e não apresentavam cicatriz vacinal.

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos participantes testados no ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG e IgM específicos para os antígenos recombinantes MPT-51 e GlcB do *Mycobacterium tuberculosis*.

| Grupos | TB ativa ^a (n=27) | Controle ^b (n=27) | Hansen ^c (n=27) |
|---|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <i>Informações referentes aos três grupos</i> | | | |
| Sexo (homens/mulheres) | 20/7 | 20/7 | 20/7 |
| Idade (Média de idade); variação | (42,6); 20-74 | (40,0); 18-59 | (42,1);19-72 |
| BCG (vacinados/SI*) | 17/10 | 8/19 | 10/17 |
| PPD (positivos/negativos/SI) | 5/8/13 | 0/27/0 | 0/0/27 |
| <i>Informações referentes ao grupo TB ativa</i> | | | |
| TB pulmonar | 27/27 | | |
| Tipos de lesão (cavit. #/não-cavit. ##/SI) | 1/25/1 | | |
| Quimioterapia (sem trat/em trat/SI) | 21/5/1 | | |

^aTB ativa: foram incluídos como portadores de TB ativa, segundo critérios do Ministério da Saúde, os indivíduos com diagnóstico confirmado por baciloscopia ou cultura e aqueles em que o médico, com base nos dados clínico-epidemiológicos e no resultado de exames complementares, firmou o diagnóstico de tuberculose. ^bControle: foram incluídos como controles, indivíduos saudáveis, HIV negativos e com baixo risco de outras doenças imunossupressoras e com PPD não reatores, pareados por sexo e idade com os pacientes tuberculosos (± 6 anos). ^cHansen: foram incluídos portadores de hanseníase, da forma Virchoviana, com baixo risco de infecção pelo HIV, pareados por sexo e idade com os pacientes tuberculosos (± 6 anos). *SI- não informado pelo indivíduo. #Cavit. – lesão pulmonar cavitária. ##Não-cavit.- lesão pulmonar não cavitária

3.2- Avaliação dos Níveis de Anticorpos IgM Contra os Antígenos MPT-51 e GlcB nos Pacientes com Tuberculose. Mensurou-se os níveis séricos de anticorpos da classe IgM contra os antígenos protéicos recombinantes MPT-51 e GlcB dos pacientes com tuberculose ativa, e comparou-se com os controles saudáveis e pacientes com hanseníase. As reações foram realizadas em duplicata, pelo ensaio de ELISA como descrito. Observou-se que os níveis de IgM anti-MPT-51 nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa foram mais elevados, discriminando assim esses pacientes dos outros grupos ($p < 0,01$) (Figura 1A). Já os níveis de IgM

anti-GlcB discriminaram os pacientes tuberculosos dos hansênicos ($p < 0,04$), não havendo diferença significativa entre os controles e pacientes com TB (Figura 1B).

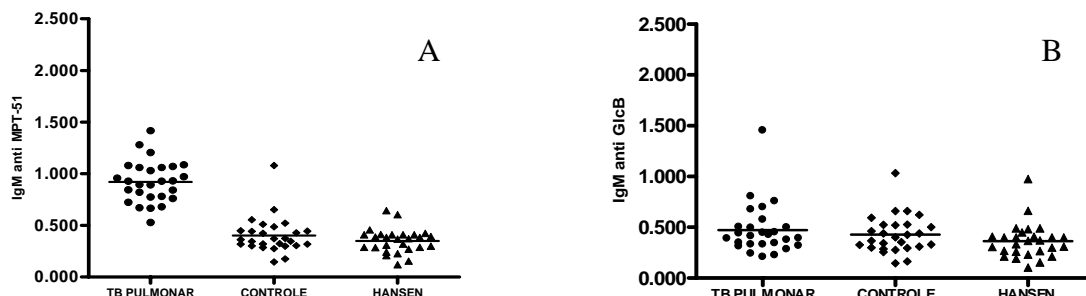


Figura 1. Detecção de anticorpos séricos IgM anti-MPT-51 e anti-GlcB no soro de indivíduos com tuberculose ativa. As amostras de soro de cada grupo foram pareadas por sexo e idade ($n=27$). A concentração individual de cada amostra (diluída 1/10) foi mensurada em duplicata pelo ensaio ELISA: 10 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno MPT-51 e anticorpo de cabra anti IgM humana conjugado a peroxidase diluído a 1/5000. **A.** Mostra que as leituras (DO) de IgM anti-MPT-51 dos grupos discrimina pacientes com TB ($p < 0,01$) **B.** DO de IgM Anti-GlcB discrimina apenas o grupo TB com o grupo hansen ($p < 0,04$).

3.3- Avaliação dos Níveis de Anticorpos IgG Contra os Antígenos MPT-51 e GlcB nos Pacientes com Tuberculose. Os níveis séricos de IgG contra o antígenos recombinantes MPT-51 e GlcB nos pacientes com tuberculose ativa foram dosados por ELISA em duplicata e também comparados com os outros grupos. IgG específica tanto para o Ag MPT-51 como para GlcB discrimina pacientes com TB de pacientes com hansen ($p < 0,01$) (Figura 2A). Entretanto, não houve diferença significativa quando se comparou os intervalos de confiança entre pacientes com TB e os controles saudáveis (Figura 2B).

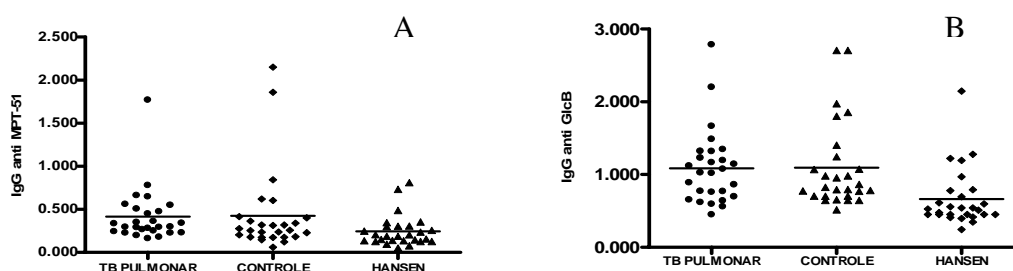


Figura 2. Determinação dos níveis séricos de IgG anti-MPT-51 e GlcB dos pacientes com tuberculose. As amostras de soro diluídas 1/100 dos pacientes com tuberculose ($n=27$) foram pareadas com os controles saudáveis e pacientes com hanseníase e avaliada individualmente por ELISA, usando 10 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno MPT-51 e anticorpo de coelho anti IgG humana conjugado a peroxidase diluído a 1/15000. As reações foram realizadas em duplicata. **A.** Mostra as leituras dos níveis de IgG contra o MPT-51 e **B.** As leituras de IgG anti GlcB dos diferentes dos grupos. Houve diferença estatística entre os pacientes com TB ativa quando comparados com pacientes com hanseníase ($p < 0,01$), tanto para IgG anti-MPT-51 como para IgG anti-GlcB.

Os anticorpos da classe IgM específicos ao MPT-51 foram os únicos que conseguiram discernir bem os pacientes com tuberculose ativa dos outros grupos analisados. Assim acreditamos que o MPT-51 poderá auxiliar no diagnóstico da tuberculose. Embora o antígeno MPT-51 seja secretado por várias espécies de micobactérias, inclusive pelo *M. leprae* agente causal da hanseníase (Harboe e

Wiker, 1998), representando um risco de reação cruzada em regiões endêmicas para hanseníase e tuberculose, as dosagens séricas tanto de IgG como IgM apresentam diferença significativa quando analisados os intervalos de confiança. O papel do MPT-51 na discriminação de pacientes tuberculosos de controles é controverso, enquanto alguns autores afirmam que a habilidade deste Ag em distinguir tuberculose ativa é inexpressiva (Lyashchenko, Colangeli *et al.*, 1998), outros acreditam no seu potencial discriminatório (Jackett, Bothamley *et al.*, 1988). Os resultados apresentados neste trabalho confirmam a habilidade deste Ag (MPT-51) na discriminação de pacientes com tuberculose ativa, assim como demonstram a sua capacidade em diferenciar tuberculose de hanseníase nesta área endêmica. Em relação ao antígeno GlcB, observou-se que tanto os controles como os pacientes com TB tiveram concentrações similares de anticorpos específicos da classe IgM (médias 0,428 e 0,472) e IgG (médias 1,094 e 1,087) respectivamente. Apesar do GlcB também ser secretado pelo *M. leprae*, este Ag foi capaz de distinguir entre pacientes com tuberculose ativa e hanseníase. No entanto, não foi possível discriminar os pacientes TB dos controles na maioria das dosagens, quando se utilizou como Ag o GlcB. Outros trabalhos ainda precisam ser realizados para aprimorar a especificidade e sensibilidade do ensaio ELISA na dosagem sérica de anticorpos contra esses antígenos recombinantes.

4- Conclusão: Anticorpos da classe IgM de indivíduos com tuberculose ativa reconhecem especificamente o antígeno MPT-51, sendo capazes de discriminar pacientes com doença ativa, de controles saudáveis e de pacientes hansenícos. Anticorpos da classe IgG, no entanto, não reconhecem especificamente tanto o antígeno GLcB quanto o MPT-51. O antígeno recombinante MPT-51 é um bom candidato para ser usado no diagnóstico da tuberculose ativa quando se utiliza a técnica de ELISA para quantificar IgM específica. **Fonte de financiamento- CNPq – FUNAPE-UFG**

5-Referências Bibliográficas

- Brosch, R., S. V. Gordon, *et al.* A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.6, Mar 19, p.3684-9. 2002.
- Dye, C., S. Scheele, *et al.* Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama*, v.282, n.7, Aug 18, p.677-86. 1999.
- Flynn, J. L., J. Chan, *et al.* An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med*, v.178, n.6, Dec 1, p.2249-54. 1993.
- Frieden, T. R., T. R. Sterling, *et al.* Tuberculosis. *Lancet*, v.362, n.9387, Sep 13, p.887-99. 2003.
- Harboe, M. e H. G. Wiker. Secreted proteins of Mycobacterium leprae. *Scand J Immunol*, v.48, n.6, Dec, p.577-84. 1998.
- Hijjar, M. A. Tuberculosis: an ongoing challenge. *Cad Saude Publica*, v.21, n.2, Mar-Apr, p.349; 348. 2005.
- Jackett, P. S., G. H. Bothamley, *et al.* Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*, v.26, n.11, Nov, p.2313-8. 1988.
- Kurth, R. e W. H. Haas. Epidemiology, diagnostic possibilities, and treatment of tuberculosis. *Ann Rheum Dis*, v.61 Suppl 2, Nov, p.ii59-61. 2002.
- Lyashchenko, K., R. Colangeli, *et al.* Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun*, v.66, n.8, Aug, p.3936-40. 1998.
- Perkins, M. D., M. B. Conde, *et al.* Serologic diagnosis of tuberculosis using a simple commercial multiantigen assay. *Chest*, v.123, n.1, Jan, p.107-12. 2003.
- Singh, K. K., Y. Dong, *et al.* Antigens of Mycobacterium tuberculosis recognized by antibodies during incipient, subclinical tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.12, n.2, Feb, p.354-8. 2005 Tsai, M. C.,

MELO CARDOSO, Cristina Almeida; **CARVALHO**, Viviane Souza; **VASCONCELOS JUNIOR**, Arioldo Carvalho; **ALVES**, João Araújo; **KIPNIS**, André, **JUNQUEIRA-KIPNIS**, Ana Paula. **Reconhecimento dos Antígenos Recombinantes MPT-51 e GlcB do *Mycobacterium tuberculosis* por anticorpos séricos de indivíduos com Tuberculose Ativa.** In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3, 2006, Goiânia. Anais eletrônicos do III Seminário de Pós-graduação da UFG [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006. NP

S. Chakravarty, *et al.* Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. Cell Microbiol, v.8, n.2, Feb, p.218-32. 2006.
Tufariello, J. M., J. Chan, *et al.* Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. Lancet Infect Dis, v.3, n.9, Sep, p.578-90. 2003.
Vordermeier, H. M., N. Venkataprasad, *et al.* Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. Clin Exp Immunol, v.106, n.2, Nov, p.312-6. 1996.
Wilson, R. A., W. N. Maughan, *et al.* The structure of Mycobacterium tuberculosis MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. J Mol Biol, v.335, n.2, Jan 9, p.519-30. 2004.

¹Mestranda em Medicina Tropical - Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sala 325, IPTSP-UFGO - mcacristina@hotmail.com

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