

GUERREIRO REIS, Michelle Cristina; **RABAHI**, Marcelo Fouad; **KIPNIS**, André; **JUNQUEIRA-KIPNIS**, Ana Paula. Caracterização da resposta imune humoral de trabalhadores da área da saúde frente ao antígeno Glc-B do *Mycobacterium tuberculosis*. 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. n.p.

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE TRABALHADORES DA ÁREA DA SAÚDE FRENTE AO ANTÍGENO Glc-B DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

GUERREIRO REIS, Michelle Cristina¹; **RABAHI**, Marcelo Fouad; **KIPNIS**, André; **JUNQUEIRA-KIPNIS**, Ana Paula².

Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas. INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA – IPTSP / UFG. Email: michelleguerreiro@hotmail.com.

Palavras-chave: Glc-B, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose latente, ELISA.

1 – Introdução: A tuberculose, uma das doenças mais antigas do mundo, consiste até os dias de hoje em motivo de preocupação de saúde pública. A doença é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria intracelular facultativa que penetra no organismo humano pelas vias respiratórias alojando-se principalmente nos pulmões. A transmissão ocorre através de aerossóis contendo a bactéria expelida pela tosse, fala ou espirro de indivíduos doentes. Cada gotícula de aerossol contém de 1-3 bacilos e cada indivíduo infectado não tratado pode contaminar cerca de outros 20 indivíduos por ano.

Acredita-se que mundialmente cerca de 14,6 milhões de pessoas têm a tuberculose ativa, com aproximadamente nove milhões de casos novos, chegando a 1,7 milhões de mortes anuais e, cerca de dois milhões de pessoas são portadores latentes do bacilo. A incidência anual varia enormemente pelo mundo, com 356 casos por 100.000 habitantes na África, 41/100.000 nas Américas, e 5/100.000 no Reino Unido (WHO/2004). O Brasil é considerado área endêmica da tuberculose, com cerca de 44,5 casos por 100.000 habitantes, só no estado de Goiás a incidência foi de 21,3/100.000 habitantes (datasus/2002).

Dentre os indivíduos infectados 90% permanecem assintomáticos, ou latentes, e cerca de 10% desenvolvem a tuberculose ativa. Apenas 5-10% dos assintomáticos poderão desenvolver a doença em algum momento de imunossupressão. O teste de tuberculina (PPD) é utilizado até hoje para diagnóstico da tuberculose, associado aos exames clínico, radiológico e laboratorial (baciloscopia). O diagnóstico precoce da doença melhora as chances de cura do doente e ao mesmo tempo interrompe a cadeia de disseminação. Um dos maiores desafios em relação ao controle da tuberculose é o diagnóstico e tratamento da fase latente da doença. No entanto, há controvérsias se o bacilo entra realmente em estado de latência ou se ele consegue manter seus níveis de atividade metabólica tão baixos que não possam ser detectados pelas técnicas atuais (Flynn e Chan, 2001; Orme, 2001)(Lillebaek, Dirksen *et al.*, 2002). Dentre os indivíduos mais expostos ao contágio com o bacilo estão os trabalhadores da área da saúde (TAS). Esses indivíduos são expostos por longos períodos (pelo menos 8 horas diárias) a diversos pacientes em diferentes estágios da tuberculose e têm as suas chances aumentadas tanto de contrair a doença como de disseminá-la (Sterling e Haas, 2006)(Arend, Van Soolingen *et al.*, 2001). Antígenos protéicos do *Mycobacterium tuberculosis* reconhecidos por indivíduos tuberculosos vêm sendo estudados e desenvolvidos na tentativa de uso dos mesmos em testes para diagnóstico precoce da tuberculose. A malato sintase

GUERREIRO REIS, Michelle Cristina; **RABAH**, Marcelo Fouad; **KIPNIS**, André; **JUNQUEIRA-KIPNIS**, Ana Paula. Caracterização da resposta imune humoral de trabalhadores da área da saúde frente ao antígeno Glc-B do *Mycobacterium tuberculosis*. 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. n.p.

(Glc-B) é um destes antígenos. Ela é uma enzima, produzida pelo bacilo em condições de estresse, que desempenha papel importante na captação de carbono como fonte de energia para a bactéria (Smith, Huang *et al.*, 2003).

Neste trabalho tentamos caracterizar a resposta imune humoral de trabalhadores da área da saúde, saudáveis, classificados pelo teste de tuberculina como PPD positivos ou negativos, frente a este antígeno do *M. tuberculosis* e o seu potencial como teste de triagem para tuberculose.

2- Metodologia: **2.1- Trabalhadores da Área da Saúde:** os indivíduos foram recrutados no Hospital Anuar Auad (Hospital de Doenças Tropicais – HDT) no período de junho de 2001 a junho de 2004. O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos participantes, sendo este devidamente aprovado pela comissão de ética e pesquisa do referido hospital. Amostras de soros de 336 trabalhadores da área da saúde do HDT, que trabalharam pelo menos 20 horas semanais, de qualquer raça, sexo ou cor, acima de 18 anos, saudáveis e que não apresentavam gravidez, previamente classificados pelo teste da tuberculina em PPD positivos (>5 mm) ou negativos (<5 mm), foram coletadas e armazenadas a -20°C até o momento da realização dos ensaios. Alguns indivíduos tiveram o soro coletado mais de uma vez para acompanhamento. Os resultados das dosagens dos TAS foram agrupadas segundo a induração cutânea (tamanho em milímetros) do teste de tuberculina (PPD), ou seja, fez-se uma média aritmética de todas as leituras dos indivíduos que obtiveram o mesmo resultado no teste de PPD.

2.2- Pacientes com tuberculose pulmonar: indivíduos (n=12) com tuberculose pulmonar, virgens de tratamento, foram recrutados do HDT e após a assinatura do termo de consentimento esclarecido, amostras de sangue para obtenção de soro foram coletadas. Os soros foram identificados e armazenados a -20°C até o momento da realização dos ensaios.

2.3- Antígeno recombinante Glc-B: o antígeno proteico recombinante do *Mycobacterium tuberculosis*, Glc-B, foi produzido pela universidade norte-americana do estado do Colorado (Colorado State University), e fornecidos através do convênio estabelecido com a Universidade Federal de Goiás, cujo contrato é o de nº NO1-AI-75320.

2.4- ELISA (ensaio imunoenzimático): o antígeno proteico recombinante Glc-B foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 a 10 µg/ml e distribuído em placas de poliestireno com 96 poços e incubados a -4°C overnight para adsorção. Em seguida fez-se o bloqueio da reação: distribuiu-se nos poços (100 µl) PBS+ leite desnatado 1% e incubou-se por 2 horas a 37°C. Os soros foram diluídos, 1/10 para IgM, e 1/100 para IgG, em PBS+ leite desnatado 0,05 % e em seguida distribuídos nos poços (50 µl) e incubados por 2 horas a 37°C. Os anticorpos anti-IgM e anti-IgG humanos foram diluídos, a 1/3000 para IgM e a 1/15000 para IgG, e acrescentados (50µl) nos poços e incubados por 1 hora a 37°C. O substrato-cromógeno (OPD+ água oxigenada 30 volumes+tampão citrato-fosfato pH 5,0-5,2) – 50 µl – foi adicionado e deixado à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 minutos. Em seguida adicionou-se ácido sulfúrico (50 µl) para finalizar a reação e então leu-se em espectrofotômetro para placas de poliestireno usando o filtro de 492nm. Entre as etapas as placas foram lavadas com PBS+TWEEN 20 a 0,05% por seis vezes.

2.5- Análise estatística: utilizou-se o Teste *t* de student ou de variância (ANOVA) para análise dos resultados, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

GUERREIRO REIS, Michelle Cristina; **RABAHI**, Marcelo Fouad; **KIPNIS**, André; **JUNQUEIRA-KIPNIS**, Ana Paula. Caracterização da resposta imune humoral de trabalhadores da área da saúde frente ao antígeno Glc-B do *Mycobacterium tuberculosis*. 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. n.p.

Os resultados dos trabalhadores da área da saúde foram agrupados segundo o tamanho da induração cutânea (PPD).

3- Resultados e discussão:

Os dados sobre os trabalhadores da área da saúde (TAS) estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição por sexo, idade e tempo de serviço no hospital dos trabalhadores da área da saúde (TAS) participantes da pesquisa.

TAS	QUANTIDADE	IDADE (média)	TEMPO DE TRABALHO (média/anos)
MULHERES	290	41	8
HOMENS	46	38	4

As dosagens do anticorpo IgM contra o antígeno recombinante Glc-B do *Mycobacterium tuberculosis* dos trabalhadores da área da saúde (TAS) PPD positivos, PPD negativos e dos pacientes com tuberculose pulmonar (controles) são mostrados na Figura 1. Observou-se que não houve diferença estatística significativa entre as médias das dosagens dos TAS-PPD positivos (1,0 +/- 0,5), os TAS-PPD negativos (0,9 +/- 0,05) e os controles (0,8 +/- 0,25). Podemos concluir então que a dosagem do anticorpo da classe IgM para o GLc-B do *M. tuberculosis*, não permite a separação entre indivíduos doentes, saudáveis ou com infecção latente.

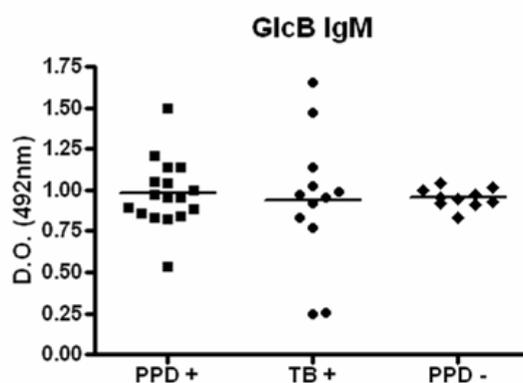


Figura 1. Quantificação dos anticorpos IgM dos TAS contra o antígeno GLc-B do *M. tuberculosis*. Os soros dos TAS e dos controles foram diluídos a 1/10 e em seguida os anticorpos IgM foram dosados através do ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando o filtro de 492 nm para leitura. Não houve diferença estatística significativa entre as médias das dosagens dos TAS PPD positivos, PPD negativos e os pacientes com tuberculose pulmonar (controles). As leituras foram agrupadas segundo o teste de tuberculina (induração cutânea medida em milímetros).

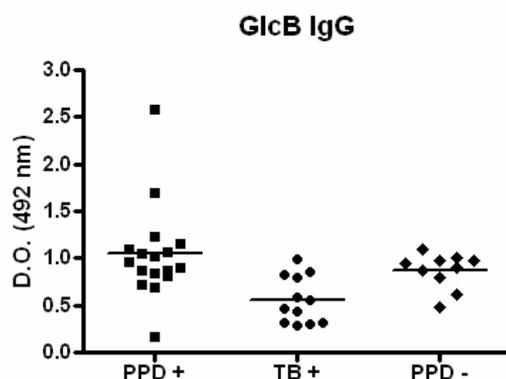


Figura 2. Quantificação dos anticorpos IgG dos TAS contra o antígeno GLc-B do *M. tuberculosis*. Os soros dos TAS e dos controles foram diluídos a 1/100 e em seguida os anticorpos IgG foram dosados através do ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando o filtro de 492 nm para leitura. Houve diferença estatística significativa entre as médias das dosagens dos TAS PPD positivos, PPD negativos e os pacientes com tuberculose pulmonar (controles). As leituras foram agrupadas segundo o teste de tuberculina (induração cutânea medida em milímetros).

Nas dosagens dos anticorpos IgG contra o antígeno recombinante Glc-B observou-se uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as médias das dosagens dos TAS e dos pacientes portadores de tuberculose ativa. Para os TAS-PPD positivos obtivemos média da densidade óptica das absorvâncias obtidas de $1,1 \pm 1,4$ enquanto que para os TAS-PPD negativos e os controles obtivemos médias de $0,8 \pm 0,25$ e $0,5 \pm 0,25$ respectivamente. Entre as dosagens dos TAS-PPD positivos e negativos não houve diferença estatística significativa. Pode-se afirmar com base nestes resultados que as dosagens do anticorpo IgG para o antígeno Glc-B permitem discernir entre os indivíduos saudáveis, os TAS, e os indivíduos doentes, aqueles com tuberculose pulmonar.

Embora a principal resposta imune contra o *Mycobacterium tuberculosis* seja mediada por células, a imunidade humoral pode ter um importante papel, já que nem todas as interações antígeno-hospedeiro são conhecidas. Neste estudo observou-se que indivíduos saudáveis apresentaram altos níveis de anticorpos da classe IgM contra o Glc-B, em quantidades equivalentes aos dos pacientes com a doença ativa. Seria esperado que os pacientes tuberculosos apresentassem anticorpos da classe IgM contra o Glc-B (Singh, Dong *et al.*, 2005), já que esta imunoglobulina é uma proteína de fase aguda produzida na presença do antígeno. No entanto, nos trabalhadores da área da saúde os níveis equivalentes de IgM poderiam ser explicados pela baixa especificidade desta imunoglobulina, o que permitiria a ocorrência de reações cruzadas. Quanto aos anticorpos da classe IgG observou-se que: os TAS, tanto os PPD positivos quanto os PPD negativos, apresentaram níveis de imunoglobulina mais altos do que os dos pacientes tuberculosos. A partir disso poderia ser especulado se os indivíduos saudáveis, PPD positivos e negativos, seriam portadores latentes do bacilo, tendo em vista que esta classe de anticorpos (IgG) é produzida mediante um segundo encontro com o antígeno e que talvez estes anticorpos tenham contribuído de alguma forma, (neutralização, opsonização, citotoxicidade mediada por células ou ativação do complemento) para que a doença não se estabelecesse. Desde a descoberta do *M. tuberculosis* o uso da soroterapia

GUERREIRO REIS, Michelle Cristina; **RABAH**, Marcelo Fouad; **KIPNIS**, André; **JUNQUEIRA-KIPNIS**, Ana Paula. Caracterização da resposta imune humoral de trabalhadores da área da saúde frente ao antígeno Glc-B do *Mycobacterium tuberculosis*. 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. n.p.

e o papel dos anticorpos vêm sendo discutidos sem que um consenso tenha sido alcançado. Apesar da proteção dos anticorpos contra microorganismos intracelulares ter pouca credibilidade, estudos recentes têm mostrado que anticorpos IgM têm um papel inibitório na replicação do *Toxoplasma gondii*, um patógeno intracelular obrigatório. O papel dos anticorpos na proteção contra vírus e fungos intracelulares também têm sido estudados e confirmados (Glatman-Freedman e Casadevall, 1998).

4-Conclusão: A dosagem de IgG para o antígeno Glc-B do *Mycobacterium tuberculosis* foi capaz de discriminar entre trabalhadores da área da saúde PPD positivos, PPD negativos e pacientes com tuberculose pulmonar (controles), sugerindo então o uso da técnica de ELISA para dosagem de IgG específica para a malato sintase (Glc-B) do *M. tuberculosis* no acompanhamento de indivíduos mais expostos ao bacilo, como por exemplo trabalhadores da área da saúde.

5- Referências Bibliográficas:

- Arend, S. M., D. Van Soolingen, *et al.* Repeatedly negative tuberculin skin tests followed by active tuberculosis in an immunocompetent individual. Neth J Med, v.58, n.2, Feb, p.76-81. 2001.
- Flynn, J. L. e J. Chan. Tuberculosis: latency and reactivation. Infect Immun, v.69, n.7, Jul, p.4195-201. 2001.
- Glatman-Freedman, A. e A. Casadevall. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev, v.11, n.3, Jul, p.514-32. 1998.
- Lillebaek, T., A. Dirksen, *et al.* Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. J Infect Dis, v.185, n.3, Feb 1, p.401-4. 2002.
- Orme, M. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). Int J Tuberc Lung Dis, v.5, n.7, Jul, p.589-93. 2001.
- 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.
- Smith, C. V., C. C. Huang, *et al.* Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, v.278, n.3, Jan 17, p.1735-43. 2003.
- Sterling, T. R. e D. W. Haas. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from health care workers. N Engl J Med, v.355, n.2, Jul 13, p.118-21. 2006.

¹ Aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical.
michelleguerreiro@hotmail.com.

² Orientadora. Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do IPTSP.
anapaula@iptsp.ufg.br

Apoio financeiro: CNPq, Funape/UFG.