

---

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

---

*Adeliane Castro da Costa, <sup>1</sup> Michelle Cristina Guerreiro dos Reis, <sup>2</sup> Bruna Daniella de Souza Silva, <sup>1</sup> Monalisa Martins Trentini <sup>3</sup> e Ana Paula Junqueira-Kipnis <sup>4</sup>*

**RESUMO**

A tuberculose (TB) continua sendo um dos mais urgentes problemas de saúde pública do mundo, com 8 a 10 milhões de novos casos e 2 a 3 milhões de mortes a cada ano. Cerca de 50 milhões de pessoas estão infectadas com o *Mycobacterium tuberculosis*. A fim de desenvolver testes para imunodiagnóstico da TB, vários antígenos têm sido testados na resposta imune humoral de pacientes com TB ativa. O teste imunoenzimático de ELISA realizado com amostras de plasma de 45 pacientes com tuberculose pulmonar e 172 contatos (96 prova tuberculínica negativa e 76, positiva) foi conduzido para avaliação da resposta imune humoral, com pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG contra o antígeno recombinante GroEs do *Mycobacterium tuberculosis* (MtGroEs). Pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresentaram maiores níveis de IgG anti-rGroEs do que indivíduos saudáveis, o que permitiu a discriminação entre os dois grupos e sugeriu resposta imune humoral específica a este antígeno.

**DESCRIPTORIOS:** *Mycobacterium tuberculosis*. GroEs. ELISA. Anticorpos IgG e IgM. Pacientes. Contatos.

**INTRODUÇÃO**

A tuberculose (TB) é uma doença de abrangência global causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), um dos patógenos humanos mais comuns. Esta doença constitui um problema de saúde pública, visto que acarreta cerca de

- 1 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).
- 2 Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do IPTSP da UFG.
- 3 Técnica do CNPQ nível-1.
- 4 Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do IPTSP, UFG.

Endereço para correspondência: Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Junqueira Kipnis, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235, esquina com 1<sup>a</sup> Avenida, s/n, Setor Universitário, CEP 74605-050, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: anapaula@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em: 16/11/2010. Revisto em: 18/3/2011. Aceito em: 24/3/2011.

dois milhões de mortes por ano (Selvaraj et al., 2009; Drumm et al., 2009). No Brasil, a tuberculose leva ao adoecimento cerca de 80.000 pessoas e provoca aproximadamente 5.000 mortes por ano. Em Goiás, de acordo com levantamento da Superintendência de Políticas e Atenção Integral à Saúde (Spais/SES-GO), 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). De maneira geral, os anticorpos agem inibindo a multiplicação do patógeno, pois medeiam a opsonização, a indução da cascata de ativação do sistema complemento e a citotoxicidade celular (Igietsme et al., 2003; Reljic & Ivanyi, 2006). Dentre os citados, a opsonização é considerada o mecanismo de ação mais importante dos anticorpos contra *Mtb* (Abebe & Bjune, 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 e Espitia, 2007). A prova tuberculínica (PT) (Huebner et al., 1993) e a produção de interferon (IFN- $\gamma$ ) são utilizadas para detectar a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Pai et al., 2004). Adicionalmente, vêm sendo estudados vários testes sorológicos para detectar a doença ativa (Gennaro, 2000; Chan et al., 2000). Em pacientes com TB, a resposta sorológica a antígenos de micobactérias tem sido avaliada principalmente pela técnica de ELISA (Singh e Espitia, 2007). Nosso grupo já demonstrou anteriormente a habilidade dos antígenos HSPX, MPT51 e GlcB em discriminar indivíduos doentes em região endêmica, assim como indivíduos com infecção recente (Rabahi et al., 2007; Almeida et al., 2008).

GroES é uma proteína de choque térmico produzida e secretada pelo *Mycobacterium tuberculosis* quando este se encontra em condições de estresse. Este antígeno é conhecido como HSP10 (Boesen et al., 1995) e possui de 10kDa a 14kDa (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) e, atualmente, está sendo utilizado em vacinas contra bactérias e doenças autoimunes (Boosbun et al., 2002; Andersen, 2007). No entanto, indivíduos saudáveis recém-vacinados com BCG também são capazes de reconhecer o GroES (Boesen et al., 1995; Ravn et al., 1997). Já foi

demonstrada, em estudo anterior, a importância deste antígeno como marcador de diagnóstico de tuberculose ascítica por permitir a discriminação de indivíduos com tuberculose ascítica 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 imunoenzimático ante o antígeno rGroES do *Mycobacterium tuberculosis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### População de estudo

Este é um estudo transversal sobre resposta imune humoral de pacientes com tuberculose pulmonar e seus contatos. Foram definidos como critérios de inclusão:

- a) pacientes maiores de 18 anos e de qualquer sexo: diagnóstico de tuberculose pulmonar – sintomatologia característica, radiografia sugestiva, baciloscopia positiva (escarro) 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);
- b) contatos: indivíduos residentes no mesmo domicílio ou lote, frequentadores assíduos e empregados domésticos do domicílio do paciente, de qualquer sexo ou idade.

Os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e os indivíduos menores de 18 anos foram incluídos mediante autorização de seus responsáveis. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal (CEPMHA) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás sob o nº 161/07. A população estudada compunha-se de 45 pacientes com TB pulmonar ativa, confirmada após terapêutica específica, e de 217 contatos. Todos os indivíduos que aceitaram participar foram submetidos a PT e a coleta de sangue para obtenção do plasma. A constatação da vacinação com BCG (bacilo Calmette-Guérin) se deu pela presença da cicatriz vacinal no braço direito.

### Coleta das amostras

Depois de preenchido o termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletados 20 ml de sangue heparinizado para obtenção do plasma de cada indivíduo no momento do diagnóstico. As amostras de plasma foram obtidas após centrifugação do sangue a 2.500xg por 15 minutos. Aliquotas de 500µl foram

congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Todas as amostras foram descongeladas apenas uma vez para execução dos ensaios. As coletas foram realizadas no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (HDTAA), em Goiânia, e no Cais Nova Era em Aparecida de Goiânia.

### Prova Tuberculínica (PT)

Foram aplicados intradermicamente  $100\mu\text{l}$  de PPD Rt 23551 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denamark) 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).

### Antígeno proteico

Neste estudo, foi utilizado o antígeno proteico recombinante GroES (rGroES) do *M. tuberculosis*, fornecido ao Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública mediante convênio firmado entre a Universidade Federal de Goiás e o Laboratório de Pesquisa da Universidade Estadual do Colorado (CSU), conforme o contrato nº NO1-AI-75320.

### Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O método ELISA indireto foi utilizado para pesquisa de anticorpos anti-rGroES das classes IgM e IgG dos pacientes com doença ativa e dos contatos. Após a padronização de todas as etapas, as placas de poliestireno de 96 poços (Corning) foram adsorvidas com o antígeno rGroES ( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluído em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,015 M, pH 9.8. Depois de incubadas por 18 horas na temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ , as placas foram bloqueadas utilizando-se o tampão carbonato-bicarbonato e leite desnatado 1% por duas horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . As amostras de plasma dos indivíduos incluídos no estudo foram diluídas (1/20) em tampão PBS, leite desnatado 0,06% e incubadas por duas horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação, as placas foram lavadas seis vezes com PBS 0,05% de Tween 20, sendo acrescentados  $50\mu\text{L}$  de conjugados IgM e IgG (Sigma Aldrich) nas concentrações 1/2.500 e 1/10.000, respectivamente, diluídos em PBS, leite desnatado 0,06% e incubados por uma hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após semelhante lavagem das placas, foi adicionada a solução de substrato pH 5.0 composta por 5mg de OPD,  $20\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 5mL de Tampão citrato-fosfato por placa. Em cada poço foram colocados  $50\mu\text{l}$  da solução de substrato e incubados por cinco minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionada a solução de parada –  $50\mu\text{l}/\text{poço}$  –, composta por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. A leitura das amostras

foi feita em leitora de ELISA (Multiskan Plus) a 492nm. A diluição das amostras destinadas ao teste foi realizada em duplicata e a média da adsorção foi expressa em densidade óptica. Controles negativos foram utilizados em todas as placas.

### Análise estatística

Os resultados das leituras foram expressos em densidade ótica. A construção dos gráficos e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPad Prisma 5. As leituras dos indivíduos foram comparadas por meio do *test t* de *Student*, pelo qual foi considerada significância  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Características clínicas e epidemiológicas

As características clínicas e epidemiológicas dos participantes do estudo encontram-se na Tabela 1. 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, como se observa na Tabela 1.

Os dados socioepidemiológicos dos contatos recrutados no momento do diagnóstico encontram-se na Tabela 2. 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.

*Tabela 1.* Dados socioepidemiológicos dos pacientes com tuberculose pulmonar

N=45	HOMENS	MULHERES
Gênero	30 (66,6%)	15 (33,3%)
Idade (anos)	41,10 (21-83)	43,86 (21-70)
BCG		
Sim	17(56,66%)	7 (46,66%)
Não	13 (43,33%)	8 (53,33%)
Raio x		
Sugestivo	28 (93,33%)	14 (93,33%)
Não realizado	2 (6,66%)	1 (1,66%)
BAAR		
Positivo	28 (93,33%)	10 (66,66%)
Negativo	1 (3,33%)	3 (20%)
Não realizado	1 (3,33%)	2 (13,33%)
Tratamento		
E1	30 (100%)	13 (86,66%)
Eir		1 (6,66%)

*Tabela 2.* Dados socioepidemiológicos dos contatos domiciliares dos pacientes com tuberculose pulmonar

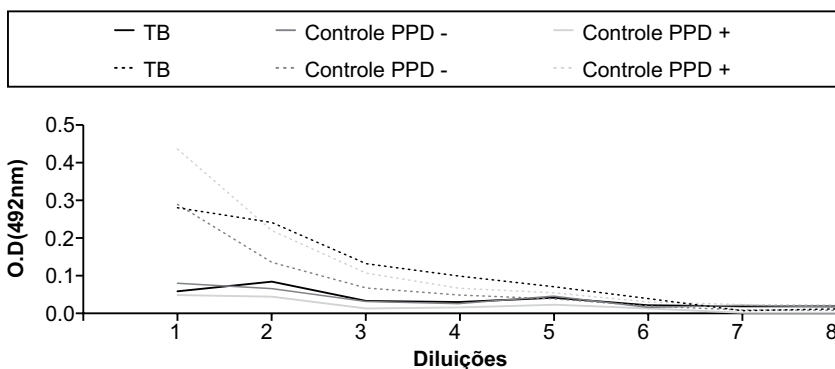
N=172	HOMENS	MULHERES
Gênero	88 (51,46%)	84 (49,12%)
Idade (anos)	31,40 (6-73)	34,6 (8-80)
BCG		
Sim	68 (77,27%)	64 (76,19%)
Não	20 (22,27%)	20 (23,80%)
PT		
Negativa	52 (59%)	44 (52,3%)
Positiva	36 (40,9%)	40 (47,6%)

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.

#### Resposta imune humoral contra o rGroES

A fim de avaliar a resposta imune humoral dos pacientes com TB e de seus contatos intradomiciliares (CID), foi feita a padronização da técnica de ELISA para dosagem de anticorpos IgM e IgG anti-rGroES do *Mtb*, como está demonstrado na Figura 1. Na padronização, foi testado o antígeno rGroES do *Mycobacterium*

*tuberculosis* nas concentrações de 5µg/ml e 10µg/ml, utilizando-se plasmas de pacientes TB, contatos PPD- e contatos PPD+ para ambas as concentrações de antígenos. A diluição seriada partiu da diluição inicial 1/5, fator 2, com diluição final 1/640, como apresentado na Figura 1. O mesmo processo foi feito na padronização da técnica de ELISA para detecção de IgG anti-rGroES (dados não mostrados). Com base na padronização, foi feita a escolha da concentração do antígeno de 10µg/ml e a diluição 1/20 para realização dos ensaios imunoenzimáticos, tanto para detecção de IgM quanto para detecção de IgG, por terem demonstrado melhor representação nos ensaios.



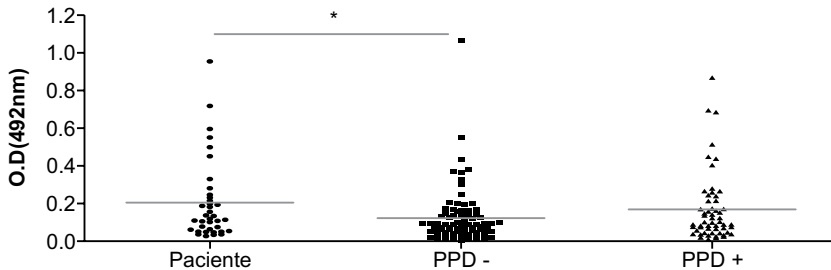
*Figura 1.* Padronização de ELISA com antígeno rGroES nas concentrações de 5µg/ml (Linear) e 10µg/ml (Pontilhado) nas diluições de 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 e 1/640, representadas pelos números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, respectivamente, utilizando-se plasmas de indivíduos com TB, controle PPD- e controle PPD+ para avaliação da resposta imune humoral em ambas as concentrações de antígeno.

Os contatos intradomiciliares (CID) foram divididos em PT positiva e PT negativa, de modo que fosse possível verificar se havia diferença na resposta imune humoral entre os pacientes e os contatos com PT positiva e PT negativa.

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  $p=0,0497$ , como se vê na Figura 2. 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+ ( $0,2128 \pm 0,1510$ )).

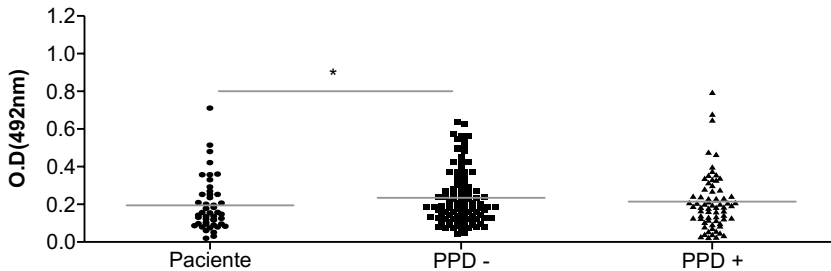
Na análise dos anticorpos da classe IgG, os indivíduos com tuberculose ativa apresentaram níveis superiores desses anticorpos, específicos do rGroES, ( $0,2034 \pm 0,2142$ ), quando comparados aos níveis encontrados nos CID PT- ( $0,1211 \pm 0,1456$ ), com  $p=0,0168$ . Utilizando a curva ROC (Receiving Operating Curve),

quando foram considerados os contatos intradomiciliares com PT negativa como controles negativos e fixando uma sensibilidade acima de 78% (uma vez que para o teste padrão ouro de diagnóstico para TB, a cultura do bacilo, apresenta sensibilidade variando de 65% a 85%), 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 ao rGroES ( $0,2034 \pm 0,2142$ ) semelhantes aos CID PT+ ( $0,1673 \pm 0,1815$ ), como se observa na Figura 3.



\* Diferença estatística entre os pacientes TB ativa e CID PPD-.

**Figura 2.** Níveis séricos de anticorpos da classe IgM no plasma de pacientes com tuberculose ativa e contatos intradomiciliares (CID) PPD- e PPD+, no momento do diagnóstico, contra o antígeno recombinante MtGroES.



\* Diferença estatística entre os pacientes TB ativa e CID PPD.

**Figura 3.** Níveis séricos de anticorpos da classe IgG no plasma de pacientes com tuberculose ativa e contatos intradomiciliares (CID) PPD- e PPD+, no momento do diagnóstico, contra o antígeno recombinante MtGroES.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, foi realizado um teste ELISA para comparar a resposta imune humoral contra o antígeno rGroES do *Mycobacterium tuberculosis* de



pacientes com tuberculose pulmonar ativa recém-diagnosticada e seus contatos intradomiciliares.

A análise dos dados obtidos neste estudo demonstra que a maioria dos indivíduos com TB ativa era do sexo masculino. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB afeta mais homens do que mulheres em razão do dinamismo e da liberdade da vida social dos indivíduos do sexo masculino, o que possibilita maior chance de infecção com o bacilo (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. A explicação para isso pode estar no fato de que 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). Além do mais, a maioria dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa não dispunha de caderneta de vacinação ou não tinha conhecimento de sua vacinação com BCG. Como os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa anteriormente já mostraram que a vacina BCG não influencia na resposta imune humoral de indivíduos doentes, esta discrepância não afeta diretamente os resultados obtidos neste trabalho (Rabahi et al., 2007).

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. Dessa maneira, os linfócitos Th2 produzem citocinas que induzem a produção de anticorpos pelos linfócitos B e inibem a ativação de células, regulando a resposta imunológica (Silva & Boéchat, 2004). 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).

Na resposta imune humoral de indivíduos saudáveis com PT negativa, os níveis plasmáticos de IgM anti-rGroES foram superiores aos pacientes com TB, havendo diferença estatística significativa entre os dois grupos ( $p=0,0497$ ). Segundo Boosbun et al. (2002), o antígeno GroES é conservado entre espécies e seus homólogos estão presentes em células procariontas, 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, avaliando a resposta imune humoral de pacientes com TB, foram verificados níveis plasmáticos superiores ( $p=0,0169$ ) de anticorpos IgG anti-rGroES nestes indivíduos 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 tuberculose ativa.

A análise da resposta imune humoral de indivíduos com tuberculose pulmonar ativa tem sido realizada por meio da dosagem de anticorpos específicos para vários antígenos do *Mtb*. Trabalhos realizados por Almeida et al. (2008) e Rabahi et al. (2007) caracterizaram e identificaram dois antígenos do *M. tuberculosis* como marcadores específicos de doença ativa e um antígeno como marcador de indivíduos TBIL, quando o soro dos participantes foi analisado utilizando-se a técnica de ELISA. Almeida et al. (2008), empregando o antígeno MPT51 recombinante, observaram que este antígeno tem a habilidade de discriminar pacientes com TB ativa de controles saudáveis por meio da dosagem de anticorpos das classes IgM e IgG. Rabahi et al. (2007), avaliando trabalhadores da área da saúde, observaram que o antígeno recombinante HSPX poderia ser utilizado para discriminar indivíduos com PT positiva dos com PT negativa por meio dos anticorpos IgM.

Quando se avalia a resposta imune humoral por meio da produção de anticorpos da classe IgG anti-rGroES do *Mycobacterium tuberculosis*, 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.

#### AGRADECIMENTOS

ACC recebe bolsa de mestrado do Conselho Nacional e Científico de Desenvolvimento Tecnológico(CNPq); MCGR e BDSS recebem bolsa de doutorado do CNPq. APIJK recebe bolsa de pesquisador 1D do CNPq. Este projeto foi financiado pelo 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).

#### ABSTRACT

Humoral immune response to *Mycobacterium tuberculosis* rGroES antigen in patients with tuberculosis and their household contacts

Tuberculosis (TB) remains one of the most important public health problems of the world, with 8-10 million new cases and 2-3 million deaths each year. About 50 million people are infected with *Mycobacterium tuberculosis*. In order to develop immunodiagnostic tests for TB, several antigens have been tested for the humoral immune response of patients with active TB. ELISA was performed with plasma samples from 45 patients with pulmonary TB and 172 contacts (96 negative and 76 positive for the tuberculin skin test). The humoral immune response was evaluated

through assessment of IgM and IgG antibodies against recombinant *Mycobacterium tuberculosis* GroES (MtGroEs). Patients with active pulmonary tuberculosis had higher levels of IgG anti-rGroEs than healthy individuals, allowing discrimination between the two groups.

**KEYWORDS:** *Mycobacterium tuberculosis*. MtGroEs. ELISA. IgG and IgM. Patients with Tuberculosis. Household contacts.

## REFERÊNCIAS

1. Abebe F, Bjune G. The protective role of antibody response during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exper Immunol* 157: 235-243, 2009.
2. Almeida CMC, Vasconcelos AC Jr, Kipnis A, Andrade AL, Junqueira-Kipnis AP. Humoral immune responses of tuberculosis patients in Brazil indicate recognition of *Mycobacterium tuberculosis* MPT-51 and GlcB. *Clin Vaccine Immunol* 15: 579-581, 2008.
3. Andersen P. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. *Trends Microbiol* 15: 7-13, 2007.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Chua-Intra B, Wilkinson RJ, Ivanyi J. Selective T-Cell Recognition of the N-Terminal Peptide of GroES in Tuberculosis. *Infect Immun* 70: 1645-1647, 2002
8. Chan ED, Heifets L, Iseman MD. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber Lung Dis* 80: 131-140, 2000.
9. Djuardi Y, Sartono E, Wibowo H, Supali T, Yazdanbakhsh M. A Longitudinal Study of BCG Vaccination in Early Childhood: The Development of Innate and Adaptive Immune Responses. *PLoS One* 5: 1-9, 2010.
10. Drumm JE, Mi K, Bilder P, Sun M, Lim J, Bielefeldt-Ohmann H, Basaraba R, So M, Zhu G, Tufariello JM, Izzo AA, Orme IM, Almo SC, Leyh TS, Chan J. *Mycobacterium tuberculosis* Universal Stress ProteinRv2623 Regulates Bacillary Growth by ATP-Binding: Requirement for Establishing Chronic Persistent Infection. *PLoS Pathog* 5: 1-13, 2009.
11. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Ann Rev Immunol* 19: 93-129, 2001.
12. Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 30 (Suppl 3): 243-246, 2000.
13. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 17: 968-975, 1993.
14. Igiesteme JU, Eko O FO, HE Q, Black CM. Antibody regulation of T-cell immunity: Implications for vaccine strategies against intra-cellular immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines* 3: 23-34, 2003.
15. Jaccett 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.
16. 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.
17. Maglione PJ, Chan J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 39: 676-686, 2009.

18. Singh M, Espitia C. Immunological Diagnosis. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis From basic science to patient care, 2007. Disponível em: [HTTP://www.tuberculosisistextbook.com/tuberculosis2007.pdf](http://www.tuberculosisistextbook.com/tuberculosis2007.pdf). Acesso em: 05/10/2010.
19. Pai M, Riley LW, Colford JM (Jr). Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 4: 761-776, 2004.
20. Rabahi MF, Junqueira-Kipnis AP, Reis MCG, Oelemann W, Conde MC. Humoral response to HspX and GlcB to previous and recent infection by *Mycobacterium tuberculosis*, *BMC. Infectious Diseases* 7: 148-156, 2007.
21. Ravn, P, Boesen H, Pedersen BK, Andersen P. Human T cell responses induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Immun* 158: 1949-1955, 1997.
22. Reljic R, Ivanyi J. A case for passive immunoprophylaxis against tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 6: 813-818, 2006.
23. Selvaraj P, Prabhuanand S, Harishankar M, Alagarasu K. Plasma 1,25 Dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub> Level and Expression of Vitamin D Receptor and Cathelicidin in Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Immun* 29: 470-478, 2009.
24. Silva JRL, Boéchat N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatologia pulmonar. *J Brasileiro de Pneumologia* 30: 478-484, 2004.
25. Superintendência de Políticas e Atenção Integral à Saúde (Spais/SES-GO), 2005. Disponível em: [HTTP:// www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq\\_364\\_tuberculose](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_364_tuberculose). Acesso em 06/10/2010.
26. World Health Organization. *The global Plan to Stop TB 2006-2015*. Genève, WHO; 2006.
27. Young DB, Garbe TR. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 59: 3086-3093, 1991.
28. Zhang Q, Xi S, Liu C, Xie H, Yue L, Zhao Y, Zang B, Gao X. Effects of HSYA on expression of bFGF protein and MMP-9 in BGC-823 transplantation tumor of nude mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 35: 2877-2881, 2010.