

GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA
ANTÍGENOS DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
PARA IMUNODIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA
PARATUBERCULOSE E TUBERCULOSE BOVINA

GILIANE DA SILVA DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ
FEVEREIRO - 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA
ANTÍGENOS DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
PARA IMUNODIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA
PARATUBERCULOSE E TUBERCULOSE BOVINA

GILIANE DA SILVA DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Elena Lassounskaia

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ
FEVEREIRO - 2010

GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA
ANTÍGENOS DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
PARA IMUNODIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA
PARATUBERCULOSE E TUBERCULOSE BOVINA

GILIANE DA SILVA DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia e
Biotecnologia.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2010.

Comissão examinadora:

Annelise Wilken de Abreu - FMC
Doutora em Biotecnologia e Biotecnologia - UENF

Mariana Novo Nunes Campos - HGG
Doutora em Biotecnologia e Biotecnologia - UENF

Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho - UENF
Doutor em Patologia Animal - UENF

ELENA LASSOUNSKAIA - UENF
Doutora em Ciências Médicas – Ênfase: Imunologia/Alergologia – *Rússia*

ORIENTADORA

AGRADECIMENTOS

- ❖ Primeiramente a Deus. Por ter permitido que através de sua benção pudesse me dar força para que a cada dia fosse renovada minha superação, acreditando sempre em sua palavra e no teu amor, fazendo com que eu pudesse vencer todos os meus obstáculos.

- ❖ Aos meus pais, Matilde e Alcides, por terem me incentivado sempre a estudar e que muitas das vezes deixaram de fazer algo para investirem em minha educação profissional.

- ❖ Ao meu namorado Gustavo, que tem sido meu companheiro e meu verdadeiro amigo, e por ter me aturado nos meus momentos de chatice e por ter me incentivado a chegar até aqui.

- ❖ Às minhas irmãs, Magna e Alcilane, por todo apoio, incentivo e também por terem me aguentado durante todo meu tempo de chatice.

- ❖ Ao grupo “elenetes”: Verônica, Marcele, Simone, Fabrício, Eduardo. Um grupo de parceiros e amigos. Obrigada por tudo!

- ❖ A minha orientadora, Elena, por ter acreditado na minha capacidade e por ter me ensinado os primeiros passos desta nova fase da minha vida (a passagem para o mundo profissional).

- ❖ Aos demais amigos e professores do LBR, Claudia, Núbia, Jorge, Rita, Juliana Azevedo, Thatiana, Marlon, Laila, Willian, Franz, Lynna, David, Thaís, Flávia, Alba, Fernando, Danielle, Sara, Pollyana, prof. Jorge, prof. Milton, prof.^a Michelle, prof.^a Andrea. Obrigado pela amizade e companherismo!

- ❖ Aos meus grandes amigos e irmãos: Cristina, Fabrício, David, Antônio, Thatiana, Raul, Claudinha, Monique pelos momentos de alegria, tristeza, ansiedade, desespero e sinceridade; pelas longas conversas, pelo aprendizado e pela paciência. Sem

vocês, esses anos não teriam sido tão felizes, e seria muito mais difícil prosseguir. E a todos os companheiros de turma, pelos bons e inesquecíveis anos de convívio.

- ❖ As minhas companheiras, Rosana, Rosane, Camila, por todos os bons momentos vividos na república, pela paciência e pelo companheirismo.
- ❖ Ao professor Eulógio, por te me ajudado e ensinado, todos esses anos a trabalhar com cortes histológicos. Muito obrigada professor!!!!!!!!!!
- ❖ À querida Ana Bárbara, pelo incentivo e por estar sempre disposta a ajudar e por ter cedido suas amostras que foram valiosas durante o ensaio de imunohistoquímica. Sou sua fã!!!!!!!
- ❖ Aos amigos do Laboratório de Sanidade Animal, Alessa Siqueira, Bruna Paes, Ricardo Guerreiro, Luciano, Luciana, Lio, Bárbara por toda ajuda e pelos bons momentos de convívio.
- ❖ À Prof^a. Tereza, por sempre estar pronta a nos ensinar e por nos mostrar o caminho para que possamos crescer profissionalmente.
- ❖ Aos professores, Eulógio, Annelise e Mariana por terem aceitado participar da minha banca.
- ❖ A UENF/ FAPERJ, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | |
| ÍNDICE DE TABELAS | |
| Resumo | |
| Abstract | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. O gênero <i>Mycobacterium</i> : espécies de importância médica | 1 |
| Figura 1: Representação esquemática da parede celular micobacteriana. (Brennan,P.J., Nikaido,H. 1995) | 3 |
| 1.2. Tuberculose humana | 3 |
| 1.2.1. Transmissão | 5 |
| 1.2.2. Tratamento | 6 |
| 1.2.3. Diagnóstico da tuberculose humana | 7 |
| 1.3. Tuberculose Bovina | 9 |
| 1.3.1. Diagnóstico da tuberculose bovina | 12 |
| 1.4. Paratuberculose Bovina | 13 |
| 1.5. Iniciativas para um diagnóstico preciso da Paratuberculose e Tuberculose humana e bovina | 17 |
| 1.6. Tecnologia de Hibridomas | 19 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 22 |
| 3. OBJETIVO: | 23 |
| 3.1. Objetivos específicos: | 23 |
| 4. METODOLOGIA | 24 |
| 4.1- Animais | 24 |
| 4.2- Imunização e produção de hibridomas anti –rApa MPTB | 24 |
| 4.3. Obtenção dos macrófagos peritoneais para camada nutritiva (<i>Feeder Layer</i>):.. | 25 |
| 4.4. Cultura Celular | 25 |
| 4.5. Clonagem dos Hibridomas | 25 |
| 4.6. Produção de líquido ascítico | 26 |
| 4.7. Seleção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra os antígenos micobacterianos | 26 |
| 4.7.1. Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) | 26 |
| 4.8. <i>Western Blotting</i> | 27 |
| 4.8.1 Preparação das amostras | 27 |
| 4.8.2- Transferência e Tratamento da Membrana | 28 |
| 4.9. Detecção de antígenos micobacterianos por imunofluorescência | 28 |
| 4.10. Imunohistoquímica | 29 |
| 4.11. Obtenção de proteína Apa do sobrenadante de filtrado de cultura (CFP) das micobactérias | 30 |
| 4.12. Isolamento do antígeno Apa do sobrenadante de filtrado de cultura de <i>M.</i> <i>avium</i> e <i>M. bovis</i> - BCG por imunoprecipitação | 30 |
| 4.13. Determinação do isotipo dos anticorpos monoclonais | 31 |
| 5. RESULTADOS | 32 |
| 5.1. Titulação dos anticorpos nos soros dos camundongos imunizados pelo antígeno rApa – MPTB | 32 |
| 5.2. Eficiência da fusão e seleção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-APA MPTB | 33 |
| 5.3. Eficiência da subclonagem e seleção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra antígeno rAPA – MPTB | 33 |

| | |
|---|----|
| Tabela 2 - Rendimento da primeira/segunda/terceira subclonagem dos hibridomas específicos para rAPA - MPTB..... | 34 |
| 5.4 - Caracterização da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos através de ensaio imunoenzimático – ELISA..... | 34 |
| 5.5 – Produção de líquido ascítico e titulação dos anticorpos do ascite contra rApa - MPTB..... | 35 |
| 5.6- Caracterização da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos através da técnica de <i>Western Blotting</i> | 36 |
| 5.7. Concentração e isolamento do antígeno Apa do sobrenadante de filtrado de cultura de <i>M. avium</i> e <i>M. bovis</i> – <i>BCG</i> | 40 |
| 5.8. Obtenção de novos híbridos estáveis capazes de produzir anticorpos monoclonais contra Apa na sua forma nativa úteis para o imunodiagnóstico..... | 43 |
| 5.9- Caracterização da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos..... | 44 |
| 5.10. Determinação do isotipo dos anticorpos monoclonais | 45 |
| 5.11. Testes imunohistoquímicos para avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais..... | 46 |
| 5.12 - Avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais nos testes de microscopia de fluorescência..... | 49 |
| 6. DISCUSSÃO | 52 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 57 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 58 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação esquemática da parede celular bacteriana..... | 3 |
| Figura 2 - Titulação dos anticorpos nos soros dos camundongos imunizados pelo antígeno rApa – MPTB..... | 32 |
| Figura 3– Análise da especificidade dos hibridomas para diferentes antígenos micobacterianos..... | 35 |
| Figura 4– Titulação do ascite do hibridoma 6F/9/3/2..... | 36 |
| Figura 5 – Caracterização da especificidade dos anticorpos anti-Apa produzidos através de <i>Western Blotting</i> | 38 |
| Figura 6 - Caracterização da especificidade dos anticorpos anti-Apa em diferentes espécies micobacterianas através de <i>Western Blotting</i> | 39 |
| Figura 7 – Caracterização da especificidade dos anticorpos anti-Apa em diferentes espécies micobacterianas através de <i>Western Blotting</i> | 41 |
| Figura 8- Isolamento do antígeno Apa do CFP de <i>M. avium</i> | 43 |
| Figura 9 – Obtenção de novos hibridomas anti-rApa MPTB..... | 44 |
| Figura 10 – Caracterização da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos através da técnica de <i>Western Blotting</i> | 45 |
| Figura 11 – Determinação do Isotipo dos anticorpos monoclonais..... | 46 |
| Figura 12 – Técnica de Ziehl-Neelsen para marcação das micobactérias BAAR+ na lesão do tecido bovino diagnosticado para tuberculose e paratuberculose bovina..... | 47 |
| Figura 13– Marcação de <i>M. bovis</i> na lesão tecidual bovina diagnosticada para tuberculose bovina utilizando anticorpo policlonal de coelho anti Apa Mtb H37Rv..... | 48 |
| Figura 14 – Controle negativo para a lesão do tecido bovino diagnosticado para tuberculose bovina utilizando soro de camundongo não-imunizado..... | 48 |
| Figura 15 - Marcação de <i>M. avium paratuberculosis</i> na lesão intestinal do bovino diagnosticado para paratuberculose utilizando anticorpo monoclonal A4\14 (aumento de 100 x)..... | 49 |
| Figura 16– Análise da especificidade dos anticorpos monoclonais 1A/14, 1E/10 através microscopia de fluorescência..... | 51 |

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos nos abatedouros de inspeção estadual, distribuídos por região do RJ – 2003.....11

Tabela 2 - Rendimento da primeira/segunda/terceira subclonagem dos híbridos específicos para APA *M. avium paratuberculosis*.....34

Resumo

A tuberculose (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis*, continua a ser um grande problema de saúde pública acometendo anualmente 8 a 9 milhões de pessoas no mundo, sendo responsável por cerca 3 milhões de mortes a cada ano. A tuberculose e paratuberculose bovina, causadas pelas *M. bovis* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPTB), respectivamente, são importantes enfermidades veterinárias que ameaçam a agropecuária industrial. A incidência destas doenças é subestimada devido ao diagnóstico precário. Este trabalho visou produzir anticorpos monoclonais (Mabs) como uma ferramenta para o imunodiagnóstico diferencial da Tuberculose e Paratuberculose bovinas. O desafio foi produzir Mabs capazes de diferenciar as bactérias de famílias *M. tuberculosis* e *M. avium* e utilizá-los para imunodeteção e identificação das micobactérias em lesões de gado bovino através de teste imunohistoquímico. Como alvo de detecção foi escolhido um antígeno micobacteriano, Apa/Mtb32, que está expresso de formas diferentes nas espécies micobacterianas. Os hibridomas foram gerados através da fusão das células de mieloma e dos esplenócitos dos camundongos imunizados pela proteína rApa MPTB e os hibridomas específicos para este antígeno foram selecionados, subclonados, e finalmente foram obtidos seis hibridomas estáveis. Os Mabs foram produzidos em sobrenadantes de cultura dos hibridomas e na forma de ascite. A especificidade destes anticorpos e a capacidade de reconhecer Apa recombinante e nativa foi avaliada em testes de ELISA e *Western blotting*. Os dados demonstram que todos Mabs foram capazes de reconhecer especificamente antígeno Apa no lisado bruto de MPTB e *M. avium* (duas isoformas de 50 e 60 kDa), e não ligaram Apa de *M. bovis* ou *M. tuberculosis*, demonstrando sua utilidade para diferenciar estas micobactérias. Os Mabs foram aplicados para isolamento de Apa secretada pelas *M. avium* do sobrenadante de cultura bacteriana através de imunoprecipitação e para imunodeteção de micobactérias em material infectado. Em testes de imunofluorescência, os Mabs foram capazes de marcar *M. avium* intracelular em culturas dos macrófagos infectados, demonstrando ser promissor para detecção destas bactérias em material clínico ou ambiental. Sua utilidade no reconhecimento específico de MPTB nos cortes das lesões intestinais do gado bovino com paratuberculose foi confirmada em teste imunohistoquímico.

Palavras-chave: hibridomas, anticorpos monoclonais, Apa, paratuberculose, tuberculose humana e bovina, imunodeteccão.

Abstract

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* continues to be a serious Public Health problem that annually affects 8 to 9 million people in the world, accounting for about 3 million deaths each year. Bovine Tuberculosis and Paratuberculosis caused by *M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPTB) are important veterinarian infections threatened to industrial cattle breeding. The incidence of infections caused by these mycobacteria in cattle is underestimated due to poor diagnostics. This work was aimed to produce monoclonal antibodies (Mabs) as an instrument for differential immunodiagnosics of Bovine Tuberculosis and Paratuberculosis. Our challenge was to produce Mabs able to differentiate bacteria belonged to *M. tuberculosis* and *M. avium* families, and to employ these Mabs for the detection and identification of mycobacteria in tissue lesions of the infected cattle. A protein Apa/Mtb32 expressing differently in different mycobacterial species was chosen as a target of detection. Hybridomas were generated through the fusion of myeloma cells with splenocytes obtained from mice immunized with rApa MPTB antigen. Hybridomas specific to rApa were selected, subcloned, and stable hybridomas were obtained finally. Mabs were produced in the supernatants of hybridoma cell culture and through the ascite induction. Capacity of these Mabs to recognition of recombinant and native Apa was evaluated in the ELISA and Western blotting assays. The obtained data demonstrated that that all the Mabs were able to the specific recognition of the Apa antigen in the whole cell lisate of MPTB and *M. avium* (two isoforms of 50 and 60 kDa) and did not bind Apa obtained from BCG or *M. tuberculosis*, demonstrating utility of these Mabs for differentiation of different mycobacterial species. The Mabs were implicated to isolation of the Apa secreted to the supernatants of *M. avium* culture employing immunoprecipitation and to the tests of mycobacterial immunodetection in the infected materials. In the immunifluorescence tests, the Mabs were useful to mark intracellular *M. avium* in the cultures of infected macrophages. Additionally, the Mabs specifically recognized MPTB in immunohistochemical test of intestinal lesions obtained from the cattle with paratuberculosis. The Mabs produced in this work are the useful instrument for the

immunodiagnostics of paratuberculosis and its differentiation from intestinal form of Bovine tuberculosis caused by *M. bovis*.

Keywords: hybridoma, monoclonal antibodies, Apa antigen, paratuberculosis, tuberculosis, immunodetection.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Mycobacterium*: espécies de importância médica

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é constituído pelas espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*, que causam doenças em homens e animais, sendo a tuberculose a doença mais grave e de importância na saúde pública. O *M. tuberculosis* é o principal agente da tuberculose humana, seguido pelo *M. bovis*, principal agente da tuberculose em bovinos. Em humanos, foi uma das principais causas de tuberculose humana antes da pasteurização do leite; *M. africanum*, agente da tuberculose humana encontrado mais frequentemente na África, e *M. microti*, que causa tuberculose em roedores (Cosma *et al.*, 2003).

Outro grupo de micobactérias genotipicamente diferente dos constituintes do complexo Mtb são as que formam o complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), o qual inclui dois grupos (*M. avium* e *M. intracellulare*), assim agrupadas devido às características bioquímicas e genóticas semelhantes. O *M. avium* é subdividido em quatro subespécies: *subsp. avium*, *subsp. paratuberculosis*, *subsp. silvaticum* e *subsp. hominissuis* (Tortoli, 2006). Essas espécies de micobactérias, principalmente *M. avium*, podem produzir quadro clínico semelhante à tuberculose pulmonar disseminada em pessoas imunodeficientes, nas quais a cultura e a identificação das cepas são necessárias para diagnóstico diferencial (Cosma *et al.*, 2003).

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (*Map*) possui grande relevância em bovinos, pois é o agente causador da paratuberculose, manifestada como uma infecção intestinal do gado. Nos humanos, esta bactéria é investigada como provável causador da doença de Crohn (Ristow, *et al.*, 2007).

O gênero *Mycobacterium* é constituído por bacilos imóveis, não esporulados, não encapsulados, medindo 1-10 micrômetros de comprimento e 0,2-0,6 micrômetros de largura, e que tem como característica principal serem bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Essa característica designa bactérias que resistem à descoloração com álcool acidificado quando coradas à quente com fucsina fenicada e dessa forma apresentam coloração avermelhada (técnica de Ziehl-Neelsen), quando observadas em esfregaços ao microscópio óptico. Essa propriedade deve-se principalmente às características dos lipídeos que compõem a parede celular dessas bactérias (Trabulsi *et al.*, 1999).

A estrutura básica da parede celular é típica das bactérias Gram-positivas: uma membrana citoplasmática interna recoberta por uma espessa camada de peptidoglicano sem membrana externa. O esqueleto do peptidoglicano está ligado covalentemente à molécula de ácido micólico – arabinogalactano e é recoberto por lipídeos livres e polipeptídios (Murray *et al.*, 2000), provendo o molde padrão para inserção de lipídeos livres e polipeptídios como micolatos de trealose, manosídeos de fosfatidilinositol (PIMs) e seus derivados glicosilados, lipomananas (LM) e lipoarabinomananas (LAM), os quais contribuem para fisiologia singular, e capacidade de indução de infecção (patogenicidade) pelas espécies de micobactérias (Devinder K. *et al.*, 2006; Ryan K. J. *et al.*, 2004). Existe, porém, uma variedade de lipídeos e glicolipídeos associados de forma não covalente à parede celular da micobactéria, e muitas destas moléculas são potentes imunomoduladores, tais como o lipoarabinomanana (LAM) que é o principal e o mais estudado glicolipídio associado à parede celular micobacteriana (Glickman e Jacobs, 2001).

A molécula LAM tem sua estrutura muito preservada nas diferentes espécies de micobactéria, apesar de ser fortemente manosilada nas bactérias de família *M. tuberculosis* (*M. bovis* e *M. tuberculosis*) e muito menos manosilada ou não-manosilada em *M. avium* ou *M. smegmatis* (Brennan *et al.*, 1995) (figura 1).

Estas diferenças de resíduos tem sido alvo de estudos, a fim de obter anticorpos monoclonais que reconheçam especificamente estas alterações, facilitando, assim o imunodiagnóstico diferencial das espécies micobacterianas.

Outro antígeno que tem apresentado forte interesse é o Apa (antígeno alanina-prolina), secretado pelas micobactérias metabolicamente ativas, que pode ser alvo interessante para o reconhecimento na imunodeteção. Este encontra-se em várias micobactérias tais como *M. bovis* BCG, *M. bovis*, *M. tuberculosis* e *M. avium subsp. avium* e *subsp. paratuberculosis* (Horn C. *et al.*, 1996; Arias-Bouda *et al.*, 2000).

Estudos recentes vêm indicando o antígeno Apa como promissor para o imunodiagnóstico, uma vez que no filtrado do sobrenadante da cultura bacteriana esta proteína encontra-se glicosilada, possuindo além de uma parte molecular principal, pequenos epítomos diferentes a ela agregados e ortólogos dentre as espécies micobacterianas nas quais estão presentes sendo um instrumento útil para o diagnóstico das diferentes micobactérias (Arias-Bouda *et al.*, 2000).

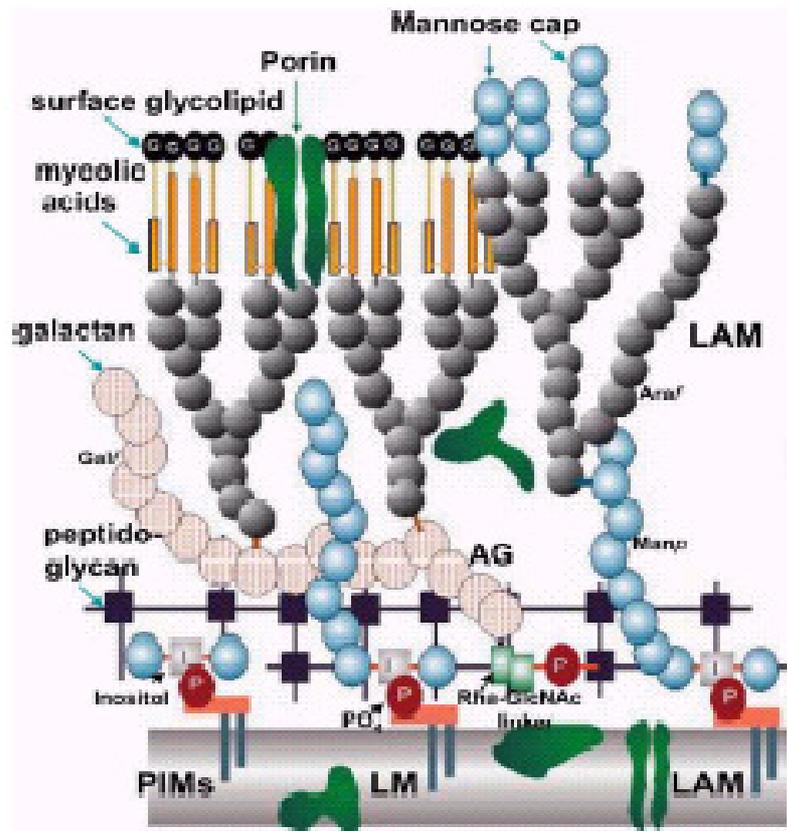


Figura 1: Representação esquemática da parede celular micobacteriana. (Brennan,P.J., Nikaido,H. 1995)

1.2. Tuberculose humana

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, que atinge principalmente os pulmões devido à facilidade de contaminação pelas vias aéreas, mas pode acometer qualquer órgão, como: ossos, rins, pleura, gânglios, meninges, intestino e cérebro, etc. É uma doença de alta prevalência nos países em desenvolvimento e apresenta o maior índice de mortalidade entre todas as infecções provocadas por bactérias (Ducati *et al.*, 2005). A estimativa relata que 8,9 milhões de novos casos de tuberculose ocorreram no ano de 2004 e 1,7 milhões de pessoas morreram desta doença no mesmo ano em todo o mundo (World Health Organization, 2008). Estima-se que 1/3 da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, e que cerca de 95% dos casos e 98% dos óbitos por tuberculose ocorram em países em desenvolvimento (WHO, 2008). Índia, China, Indonésia, Bangladesh e Paquistão,

os países mais populosos da Ásia, apresentam as maiores incidências da doença e contribuem com mais da metade do total global de casos (Teixeira H. C. *et al.*, 2007).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a tuberculose continua sendo um grave problema de saúde pública. A cada ano tem sido notificados cerca de 90 mil novos casos da doença e registrados mais de 6 mil óbitos (Frieden *et al.*, 2003). Acredita-se que cerca de 50 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, o que coloca o Brasil na 15ª posição da lista dos 22 países de mais alta carga de tuberculose do mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS).

O Estado do Rio de Janeiro apresenta uma das mais elevadas taxas de incidência de tuberculose em todo país. A cada ano, em média, são notificados 16.000 casos de tuberculose (<http://www.cve.saude.sp.gov.br/>). A incidência da tuberculose em Campos dos Goytacazes atingiu 58.9 casos por 100.000 habitantes em 2002, ou seja, 240 casos notificados anualmente (Pessanha L.C.D., 2003), demonstrando o caráter emergente da doença.

Apesar de ser uma das doenças infecciosas mais antigas, bem conhecida e há mais de meio século vulnerável ao tratamento medicamentoso, a tuberculose permanece como um dos principais agravos à saúde a ser enfrentado em âmbito global. Contribui para este fato às desigualdades sociais, insuficiência de pesquisas visando o desenvolvimento de novos tratamentos e diagnósticos, fluxos migratórios, deficiências do sistema de saúde e alta prevalência dos casos de tuberculose multi-drogas resistentes e associados à infecção pelo HIV (Ministério da saúde, 2006).

O crescimento mundial dos casos da doença motivou a Organização Mundial de Saúde anunciar o estado de emergência global em TB em 1993 e elaborar as medidas capazes de melhorar o controle desta doença. Entre estas metas encontra-se a busca dos novos métodos de diagnóstico da TB: rápidos, simples e baratos, adequados para os países em desenvolvimento. A implementação destes métodos pode diminuir o tempo até início do tratamento reduzindo o tempo da infectividade do paciente (Ministério da saúde, 2006).

Os seres humanos são os únicos reservatórios do *M. tuberculosis* e existem evidências da doença desde o período neolítico. A transmissão da tuberculose ocorre mais freqüentemente através da via respiratória, a partir de aerossóis produzidos no ato da tosse, fala e espirro de pessoas portadoras do bacilo, na fase bacilífera (CDC, 2005).

O paciente com tuberculose pulmonar bacilífera, numa tosse, pode liberar 3500 partículas infectantes. Quando espirra, são lançados aproximadamente 1 milhão de partículas infectantes no ambiente. As gotículas de aerossol, contendo partículas infectantes, são aspiradas por indivíduos saudáveis e os bacilos alojam-se nos alvéolos pulmonares por tempo indefinido, permanecendo contidos por células de defesa do organismo em estruturas denominadas granulomas (CDC, 2005). Em virtude da redução da resistência orgânica (desnutrição, estresse ou associação com outras doenças imunossupressoras), o bacilo tende a proliferar intensamente e pode levar o indivíduo à morte, caso não haja tratamento adequado. Com a doença instalada, o indivíduo portador é capaz de contaminar terceiros.

A infecção, em adultos, atinge principalmente os pulmões, mas pode afetar qualquer outro órgão ou tecido, como pleura, linfonodos, ossos, sistema urinário, cérebro, meninges, olhos, entre outros. A infecção extrapulmonar é mais comum em indivíduos com baixa imunidade, atingindo principalmente crianças e indivíduos infectados com HIV. Em 90% dos indivíduos infectados, o sistema imune consegue impedir o desenvolvimento da doença. Nos 10% dos indivíduos que desenvolvem a doença, a metade desenvolve um quadro de tuberculose primária logo após a implantação das bactérias no pulmão, e a outra metade desenvolve a doença devido a uma reativação de uma tuberculose latente ou através de uma reinfecção pela bactéria (Ministério da Saúde, 2006).

1.2.1. Transmissão

A probabilidade da transmissão depende do grau de infecção da pessoa com tuberculose e da quantidade de bacilos expelidos, forma e duração da exposição ao bacilo, virulência e a competência imunológica do paciente (Frataszi C.*et al*; 1997). A doença evolui quando os bacilos, fagocitados pelos macrófagos, aí se multiplicam, provocando uma reação inflamatória no tecido infectado. No estágio inicial, a doença apresenta-se na forma infiltrativa, com a formação de múltiplos granulomas em órgãos que possuam micobactérias. Os granulomas são formados por macrófagos contendo micobactérias vivas e mortas circundadas por linfócitos e macrófagos epitelióides, centralizando uma necrose de caseificação que podem calcificar-se e através deste, controlar o crescimento e disseminação bacteriana (Pieters, 2001).

Em uma fase mais tardia da doença, a morte das células no granuloma leva à necrose e destruição do tecido pulmonar formando os tuberculomas (cavernas).

Nesta etapa, os vasos sanguíneos podem se romper e é por isso que os pacientes no estágio mais avançado da doença apresentam tosse com eliminação de escarro e muco com hemoptise (Lounis *et al*; 2001).

Os sinais mais freqüentes são o comprometimento da saúde do paciente, febre baixa com sudorese pela manhã, falta de apetite e emagrecimento. Pode ocorrer também dor torácica, tosse inicialmente seca e depois acompanhada ou não de escarros com presença de sangue (www.cve.saude.sp.gov.br).

1.2.2. Tratamento

O tratamento da tuberculose é padronizado no Brasil. As medicações são distribuídas pelo Sistema Único de Saúde, através de seus postos municipais de atendimento. O tratamento inicial (preferencial) chama-se RHZ e inclui três medicações: rifampicina(R), isoniazida(H) e pirazinamida(Z). Usando este tipo de tratamento no período de pelo menos seis meses, o paciente pode apresentar uma cura de aproximadamente 100%, isso se a medicação for utilizada de forma regular, ou seja, todos os dias, e se a bactéria for suscetível às drogas (ABC da saúde, 2006).

Cepas de Mtb resistentes a isoniazida e a rifampicina com ou sem resistência a outras drogas são denominadas cepas multidrogas-resistentes (MDR-TB). Atualmente, aproximadamente 3% de todos os pacientes diagnosticados têm MDR-TB no mundo. Essa proporção aumenta em pacientes que não tiveram sucesso com o tratamento recebido inicialmente. Isso ocorre, principalmente, devido a um tratamento inadequado e irregular que favorece a seleção das bactérias carregadoras das mutações nos genes de resistência (Sharma e Mohan, 2004).

A primeira vacina contra a tuberculose foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin, do Instituto Pasteur. Eles fizeram a atenuação de uma micobactéria relacionada à Mtb (*Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin [BCG]), através de um processo de crescimento desta cultura por um período de 13 anos em meio específico, monitorando a diminuição da virulência desta bactéria. Em 1921, a vacina BCG foi pela primeira vez administrada a crianças da França, onde ela provou ser um sucesso, com uma redução da mortalidade em 90%. Desde então, a vacina BCG têm sido a mais usada de todas as vacinas, sendo uma vacina barata e segura (Doherty e Andersen, 2005).

Apesar do sucesso que a vacina BCG tem demonstrado nas últimas décadas, ela apresenta uma proteção por um período limitado, na infância, principalmente contra a forma mais grave da doença - meningite tuberculosa, além do que ela não é eficaz em indivíduos já sensibilizados com antígenos micobacterianos, seja por uma vacinação prévia pela BCG, ou por exposição à micobactéria ou a presença de uma infecção latente. Desta forma, vem se estudando o desenvolvimento de novas vacinas que possam suprir esta deficiência (Doherty e Andersen, 2005).

O diagnóstico da tuberculose compreende: exame físico (avaliação do padrão geral de saúde do paciente), exame clínico; exame bacteriológico, através da baciloscopia do escarro; cultura microbiológica, para casos com baciloscopia negativa e suspeita de tuberculose; exame radiológico do tórax ou tomografia computadorizada; prova tuberculínica - PPD (*Purified Protein Derivative*), que indica se houve contato com o bacilo, mas não indica doença; exame anatomopatológico (histológico e citológico); exames bioquímicos; exames sorológicos e de biologia molecular, que ainda são pouco utilizados devido à escassez de profissionais na área e o alto custo (Dinnes .J; Deeks .J,2007).

1.2.3. Diagnóstico da tuberculose humana

As principais medidas para conter o avanço da TB no mundo englobam o diagnóstico precoce dos pacientes, tratamento efetivo contra as formas resistentes de TB e uma vacina mais aperfeiçoada e protetora do que a atual BCG (World Health Organization, 2008).

O diagnóstico da tuberculose em seus estágios iniciais, aliado à poliquimioterapia, pode contribuir para o controle da disseminação da infecção. Os métodos atuais de diagnóstico apresentam problemas, como: baixa sensibilidade da baciloscopia; longo tempo de realização das culturas microbiológicas; e baixa especificidade do teste cutâneo com o derivado protéico purificado do *Mycobacterium tuberculosis*, além disso, não têm tido o sucesso desejado para diminuir a incidência da TB de forma significativa (Organização Mundial da Saúde, 2006). Atualmente, o diagnóstico da TB é feito através do histórico epidemiológico do indivíduo, para saber se ele teve contato com algum adulto tuberculoso ou mora em área endêmica; observação de sinais e sintomas específicos da tuberculose; realização do PPD (*Purified Protein Derivative*), realização de radiografia do tórax, nos casos de suspeita de TB pulmonar (www.cve.saude.sp.gov.br).

A técnica mais usada para diagnóstico da tuberculose humana pulmonar é a baciloscopia. A tosse não produtiva é o sintoma mais comum no início da doença. Com o desenvolvimento da infecção, o escarro começa a ser produzido quando aumenta a inflamação e a necrose do tecido pulmonar. Devido a isso, a baciloscopia é o método prioritário de diagnóstico e controle durante o tratamento da TB (Teixeira, Abramo *et al.*, 2007). O principal método para pesquisa de bacilos em amostras de escarro é a coloração de Ziehl-Neelsen. É um método barato e que não exige equipamentos caros para ser realizado, mas, apresenta desvantagens por não diferenciar as espécies de micobactérias (Teixeira, Abramo *et al.*, 2007).

As culturas do escarro são utilizadas em conjunto com a baciloscopia para diagnóstico da TB. Tem a vantagem de permitir a detecção e o isolamento da micobactéria, a identificação da espécie e/ou do complexo isolado, e a determinação da sensibilidade do microorganismo aos quimioterápicos para TB, mas, demora mais de 8 semanas para confirmar o diagnóstico em meio de cultura sólida, um mínimo de 2-3 semanas em BACTEC, e as facilidades para cultivar são limitadas na maioria dos países nos quais a doença é endêmica por causa da biossegurança que exige o laboratório de Biossegurança nível III. Visto que o tratamento da tuberculose leva pelo menos 6 meses, o rápido diagnóstico da doença ativa é essencial para o gerenciamento e controle desta doença (Frieden *et al.*, 2003).

Uma alternativa laboratorial para diagnosticar a tuberculose é a utilização do TTI (Teste Tuberculínico Intradérmico). É um método baseado na reação celular desenvolvida na pele, 24 a 72 h depois da inoculação intradérmica de PPD (*Purified Protein Derivative*), que é uma mistura de proteínas de micobactérias de baixo peso molecular, na dose de 0,1 mL no antebraço. Após 72 h, a leitura da induração formada é feita, e dependendo dos fatores de risco do indivíduo, resultados entre 5-15 mm ou mais podem ser considerados positivos (American Thoracic Society, 2001). Sua especificidade é baixa, contém diversos antígenos amplamente compartilhados entre diferentes espécies de micobactérias, como as micobactérias do ambiente, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. bovis* (BCG). Vários estudos têm demonstrado que o PPD não distingue com segurança pessoas vacinadas com BCG daquelas expostas a micobactérias do ambiente ou infectadas com *M. tuberculosis*. O fato de o PPD ainda continuar em uso, revela a necessidade urgente de viabilizar testes mais específicos para o diagnóstico da TB (Teixeira, Abramo *et al.*, 2007).

A obtenção de um diagnóstico rápido, sem cultura dos bacilos, se dá através do uso de sondas de ácidos nucléicos, pela tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *Polymerase chain reaction*). O PCR pode ser um método ideal para identificação de DNA micobacteriano em amostras clínicas, mas requer tecnologia sofisticada e com custo elevado para países em desenvolvimento (Beig *et al.*, 1995).

Dentre os métodos diagnósticos atualmente utilizados para TB, nenhum deles tem obtido o sucesso desejado para diminuir a incidência da doença de forma significativa nem capacidade de diagnosticar precocemente a tuberculose (Frieden *et al.*, 2003; Organização Mundial da Saúde, 2006).

1.3. Tuberculose Bovina

A tuberculose bovina é uma zoonose de caráter inflamatório e infecto-contagioso, cujo agente micobacteriano é o *Mycobacterium bovis*. Caracteriza-se pelo desenvolvimento progressivo de lesões nodulares denominadas tubérculos, que podem localizar-se em qualquer órgão ou tecido (Roxo, 2007). Esta doença é considerada como o maior problema em saúde pública por sua transmissão ao homem através do leite de vacas infectadas. Contudo, o desenvolvimento da pasteurização contribuiu intensamente para minimizar esse problema (Abrahão, 2005).

O agente infeccioso não acomete apenas o bovino, mas também o homem, cão, gato, porco, ovelha, cabra e cavalo (Matthias, 1998). O *M. bovis* é cosmopolita, distribuindo-se principalmente, em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, notadamente, naqueles com criações intensivas de bovinos leiteiros (Abrahão, 2005). Esta enfermidade causa prejuízos à pecuária e riscos à saúde da população que consome produtos de origem animal (Lilenbaum *et al.*, 2000), e atualmente vem ganhando destaque assumindo caráter de doença profissional, mais freqüente entre os indivíduos que lidam diretamente com animais infectados ou com produtos provenientes destes, como tratadores, veterinários e laboratoristas, manifestando-se não somente na forma clássica de tuberculose intestinal ou escrofulose (transmitida por alimentos) nos linfonodos cervicais, mas, principalmente, na forma pulmonar (transmitida por aerossóis) (Haddad N. *et al.*, 2004).

No Brasil não existem estudos abrangentes sobre o comprometimento humano pelo bacilo bovino, mas na Argentina, nos anos 80 a 90, foram realizadas extensas

pesquisas de todos os casos clínicos de tuberculose humana, onde se verificou que a doença se apresentava tanto na forma digestiva quanto pulmonar em 5 a 6% dos casos totais e que 64% desses eram em trabalhadores rurais (Roxo, 1998).

A tuberculose bovina pode ser introduzida no rebanho, principalmente pela aquisição de animais infectados, podendo propagar-se entre os bovinos sadios independente do sexo, raça ou idade do animal (Souza et al., 1999). Uma vez infectado, o bovino é capaz de transmitir a doença aos outros, mesmo antes do desenvolvimento das lesões nos tecidos. O bacilo pode ser eliminado pela respiração, leite, fezes, pelo corrimento nasal, urina, secreções vaginais e uterinas e pelo sêmen (Rugiero et al., 2007).

Esta enfermidade apresenta distribuição mundial, mas nos EUA, Canadá e países da Europa sua incidência foi controlada pela preconização das campanhas de erradicação e controle, através do teste de tuberculina e abate dos animais infectados (Jones et al., 1997). *M. bovis* é responsável pelos 30% de acometimento infanto-juvenil e pelos 2% a 8% dos novos casos de tuberculose pulmonar e extra-pulmonar humana, respectivamente, na América Latina. Na Ásia, 94% do gado e mais de 99% da população de búfalos encontram-se infectados. Além disso, 94% da população asiática encontra-se em situação de risco (Bakshi C.S. et al., 2005).

Os avanços nos conhecimentos da doença e a tecnologia disponível não têm sido suficientes, principalmente em países em desenvolvimento, para diminuir os casos de morbidade e mortalidade. Um método de avaliação da incidência da tuberculose bovina é através da realização de inspeções epidemiológicas em matadouros, procurando, a partir de carcaças desviadas ao Departamento de Inspeção Final, identificar lesões semelhantes às provocadas pela tuberculose.

A epidemiologia da tuberculose bovina, no Brasil, é mais intensificada no estado de Minas Gerais, o maior produtor de leite do país. Propriedades produtoras de leite tecnificadas apresentaram índices de 15% de tuberculose bovina, com pelo menos um animal positivo para o teste intradérmico. Os dados sugerem que há risco de infecção direta para a população humana numericamente significativa, quer sejam trabalhadores rurais da indústria de carnes ou veterinários (Zanini, 2002).

No Rio de Janeiro, de 1632 animais testados, em treze propriedades diferentes da Região dos Lagos, 12,7% destes apresentaram reatividade ao PPD (Lilenbaun et al., 1998). Os mais altos índices de positividade para este teste foram relatados nos

estados do Nordeste, e os menores, nos estados do Sul e Sudeste (Abrahão *et al.*, 2005).

Nas regiões Norte e Noroeste Fluminense os índices de prevalência da tuberculose bovina foram de 0,47% para o gado abatido em estabelecimentos de inspeção estadual de Campos dos Goytacazes, durante o ano de 2003 (tabela 1). O serviço de Inspeção Federal do Rio de Janeiro revelou uma incidência de 0,30% no ano de 2002 e 0,27% no ano de 2003 e primeiro semestre de 2004 (Ferreira, 2005).

Tabela 1 - Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos nos abatedouros de inspeção estadual, distribuídos por região do RJ – 2003.

| Procedência dos animais / RJ | Número de animais abatidos | Número de animais com lesões similares à tuberculose | Prevalência (%) |
|------------------------------|----------------------------|--|-----------------|
| Araruama | 409 | 6 | 1,47 |
| Cabo Frio | 24 | 1 | 4,16 |
| Casemiro de Abreu | 41 | -- | -- |
| Rio das Ostras | 144 | 1 | 0,70 |
| São Pedro da Aldeia | 60 | -- | -- |
| Saquarema | 21 | -- | -- |
| Baixada Litorânea | 699 | 8 | 1,14 |
| Campos | 3826 | 16 | 0,42 |
| Carapebus | 21 | -- | -- |
| Cardoso Moreira | 699 | 7 | 1,00 |
| Conceição de Macabú | 20 | -- | -- |
| Macaé | 225 | 2 | 0,88 |
| Quissamã | 86 | -- | -- |
| São Fidélis | 741 | -- | -- |
| São Francisco Itabapoana | 1504 | 8 | 0,53 |
| São João da Barra | 20 | -- | -- |
| Região Norte Fluminense | 7142 | 33 | 0,46 |
| Aperibé | 11 | -- | -- |
| Bom Jesus do Itabapoana | 1451 | 6 | 0,41 |
| Cambuci | 155 | -- | -- |
| Italva | 184 | -- | -- |
| Itaocara | 512 | 2 | 0,39 |
| Itaperuna | 531 | 3 | 0,56 |
| Laje do Muriaé | 22 | -- | -- |
| Miracema | 21 | -- | -- |
| Natividade | 22 | -- | -- |
| Santo Antônio de Pádua | 119 | -- | -- |
| São José de Ubá | 48 | -- | -- |
| Região Noroeste Fluminense | 3076 | 11 | 0,36 |
| Cantagalo | 22 | -- | -- |
| Cordeiro | 11 | -- | -- |
| Santa Maria Madalena | 12 | -- | -- |
| São Sebastião do Alto | 12 | -- | -- |
| Silva Jardim | 66 | -- | -- |
| Sumidouro | 15 | -- | -- |
| Trajano de Moraes | 21 | -- | -- |
| Região Serrana | 194 | -- | -- |
| Guapimirim | 21 | -- | -- |
| Região Metropolitana | 21 | -- | -- |
| TOTAL | 11132 | 52 | 0,47 |

Fonte: Secretaria Estadual de Agricultura, Abastecimento, Pesca e Desenvolvimento de Interior. SDS SIE/RJ

Tendo em vista a dimensão do problema e sua importância para a saúde pública, muitos países adotaram programas de controle da doença, tais como: rotina de inspeção de carnes, pasteurização do leite e medidas de controle da doença nas populações animais (Kantor e Ritacco, 1994). O controle da tuberculose bovina baseia-se, principalmente, na realização periódica da prova da tuberculina e abate dos animais que reagirem positivamente. Dessa forma, em áreas de produção de leite recomenda-se a tuberculinização anual (Riet-Correa *et al.*, 2001). Já em áreas de produção de gado de corte pode-se identificar os estabelecimentos infectados através do estudo das lesões observadas nos estabelecimentos de abate (Riet-Correa *et al.*, 2001).

No Brasil, existe um programa específico para o controle da tuberculose bovina, denominado PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, condicionado à obtenção de três testes de rebanho negativos consecutivos, realizados num intervalo de 90 a 120 dias entre o primeiro e o segundo testes, e de 180 a 240 dias entre o segundo e o terceiro testes. Visa combater essas enfermidades, muito semelhantes, na população bovina e bubalina, diminuindo a incidência e prevalência dessas, a fim de minimizar as perdas econômicas e oferecer garantias de inocuidade dos alimentos, tanto carne como leite e derivados, ao consumo interno e aumentar a competitividade dos nossos produtos no mercado internacional (MAPA - PNCEBT, 2001).

1.3.1. Diagnóstico da tuberculose bovina

Laboratorialmente, devido à aparente similaridade na apresentação clínica, o tratamento e prognóstico da infecção no homem pelo *M. bovis* e *M. tuberculosis*, sempre apresentaram falhas no diagnóstico diferencial destas micobactérias, principalmente nos países onde se julgava erradicada a tuberculose bovina (Pinto, 2003).

Um dos métodos de diagnósticos *in vivo* para bovinos é o exame clínico, que apresenta como restrição a dificuldade para sua utilização o fato dos sintomas ocorrerem em estágios avançados da doença. Outro ensaio empregado é o teste tuberculínico, que consiste em uma prova cutânea indireta, a qual pela sensibilidade, simplicidade e praticidade permanece como o teste de eleição.

O teste tuberculínico consiste na avaliação de uma reação de hipersensibilidade tardia em animais previamente expostos ao bacilo da tuberculose. Para desencadear a reação de hipersensibilidade são empregadas tuberculinas sintéticas de dois tipos: a PPD bovina, procedente do *M. bovis*; e a PPD aviária proveniente do *M. avium* (Rugiero, 2007).

O ensaio de gama interferon bovino empregado no diagnóstico *in vitro* da tuberculose tem como objetivo detectar a reatividade celular, através de uma resposta celular específica à infecção pelo *M. bovis*. Vale ressaltar, porém, que seu emprego ainda oferece algumas restrições, como o elevado custo.

No animal morto, a necropsia baseada nas lesões macro e microscópica é o método mais comum para comprovar a doença. As amostras processadas para exames histopatológicos podem ser submetidas ao método de colorações de rotina pela hematoxilina e eosina (HE) e especiais, como Ziehl Neelsen (ZN), e imunohistoquímica (Thoresen *et al.*, 1994).

Os métodos histológicos empregados para o diagnóstico da tuberculose são rápidos e baratos, contudo exigem grandes concentrações de bactérias (cerca de 10^4 bacilos por mL ou mais), ressalte-se ainda que outros microrganismos podem produzir lesões semelhantes a da tuberculose bovina por *M. bovis* (Thoresen *et al.*, 1994).

1.4. Paratuberculose Bovina

A paratuberculose, ou doença de Johne, é uma doença de natureza infecciosa causada por *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*) (Kreeger *et al.*, 1991). Atinge principalmente os ruminantes, originando uma enterite granulomatosa. O microorganismo atinge primeiramente a mucosa intestinal, sendo caracterizada por um quadro de emagrecimento progressivo e fatal, acompanhado de diarreia intermitente com excreção de bacilos nas fezes (Lilenbaum *et al.*, 2007). Devido ao período de incubação geralmente longo, os animais infectados podem excretar o microorganismo em suas fezes por 15 a 18 meses, antes de surgirem os primeiros sinais clínicos da doença (Radostits *et al.*, 2002), que se apresentam sob duas formas, uma clínica com sinais típicos de perda rápida de peso, diarreia crônica, e redução na produção de leite (Collins, 2003; Chiodini *et al.*, 1984) e a forma subclínica onde não se percebem os sinais, mas o agente pode se disseminar no

ambiente tornando-se uma fonte de risco ao rebanho ou animais próximos (Lilenbaum *et al.*, 2007).

A importância da paratuberculose nos ruminantes domésticos tem sido apresentada em diversos estudos, na medida em que é uma doença que causa perdas econômicas relevantes em todo mundo (Körmendy *et al.*, 1989, Losinger 2006). Frequentemente, os ruminantes são infectados quando jovens por transmissão oral-fecal, ou seja, ingerem leite ou entram em contato com pastagens contaminadas por fezes de animais infectados com *Map*. A infecção também pode ser transmitida de forma vertical para o feto (Nielsen S. S. *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que *Map* é viável por mais de 250 dias em água, solo, fezes e secreções de animais (Nielsen S. S. *et al.*, 2008; Davidson R. S *et al.*, 2008).

É um microorganismo que apresenta o crescimento mais fastidioso dentre todas as micobactérias, e seu isolamento em meio de cultura é tarefa trabalhosa e demorada (Lilenbaum *et al.*, 2007). Seu meio de cultura depende da incorporação, de um fator de crescimento, chamado micobactina, derivado de uma micobactéria apatogênica, a *Mycobacterium phlei* (Carter, 1988; Manual Merck, 1997). Isto torna uma característica importante para a sua identificação, pois, muitas micobactérias são capazes de produzir por si mesmas a micobactina, porém, o *Map* não possui esta capacidade, necessitando deste fator para crescer em laboratório (Ristow *et al.*, 2007).

O processamento laboratorial é trabalhoso e o tempo de crescimento do microorganismo é demorado, levando cerca de 8 a 12 semanas a 37° C (Ristow *et al.*, 2007).

Além de causar doenças em animais, nos últimos anos, algumas pesquisas sugerem o possível envolvimento deste microorganismo com a etiologia de uma inflamação crônica e granulomatosa no intestino de humanos, conhecida como Doença de Crohn, já que houve o isolamento de *Map* em humanos portadores desta patologia (Hermon – Taylor *et al.*, 1990).

A paratuberculose é responsável por perdas econômicas que ocorrem pela redução na produtividade, maior susceptibilidade a outras doenças, aumento dos custos sanitários e maior taxa de descarte precoce dos animais (Hutchinson, 1996). Apresenta distribuição mundial, em países de agropecuária industrial, como Brasil e Argentina, as doenças micobacterianas do gado bovino, como Tuberculose e Paratuberculose (PTB), continuam gerando um grande problema veterinário e de

saúde pública, principalmente nas áreas agrárias destes países e nos trabalhadores dos frigoríficos. Suas ocorrências estão associadas aos animais importados, sendo a principal causa de óbitos entre bovinos e ovinos (variam de 1.6% a 20%) em países como Nova Zelândia, Áustria, Reino Unido e outros países europeus (Lilenbaum *et al.*, 2007).

Na Argentina, a soroprevalência das fazendas de criação contra antígenos de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MPTB) varia entre 7,2% e 19,6% em Cuenca del Salado (Província de Buenos Aires) (Paolicchi *et al.*, 2003). A soroprevalência no gado bovino produtor de leite é ainda maior - cerca de 51%. O diagnóstico clínico detecta a doença somente em 5% a 10% dos casos. Um estudo efetuado na Argentina demonstrou uma estimativa da diminuição na produção de carne e/ou leite em cerca de 19% por causa de PTB. Segundo dados de soroprevalência de PTB, a estimativa das perdas econômicas referentes ao valor bruto da produção pecuária e da comercialização e transporte, durante todo ano 2001 foi aproximadamente de U\$S 22.0 milhões (zona de criação de Cuenca del Salado) e de U\$S 6.3 milhões (Cuencas Lecheras) na Província de Buenos Aires (Paolicchi *et al.*, 2001).

No Brasil, alguns trabalhos em relação à soroprevalência de Paratuberculose no rebanho vêm sendo feitos, mas não há estudos epidemiológicos suficientes. Apesar de serem trabalhos isolados, permitem uma idéia da estimativa da enfermidade em nosso país. Foi estimada a soroprevalência de 46% das 639 amostras testadas em 5 rebanhos de corte no Mato Grosso do Sul (Rivera *et al.*, 1996); no Rio de Janeiro este número atingiu 16% das 1004 amostras de soro testadas (Ferreira *et al.*, 2001) e em São Paulo, 37,9% das 403 vacas testadas em 20 rebanhos leiteiros apresentaram a doença (Laranja da Fonseca *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que a importância da paratuberculose é subestimada no Brasil devido às dificuldades no diagnóstico clínico e laboratorial.

O diagnóstico da paratuberculose bovina é particularmente difícil, feito com maior frequência através da cultura de fezes. O cultivo fecal é, ainda hoje, considerado o teste mais útil na detecção de animais com a infecção subclínica, sendo considerado método ouro (gold standard), com 100% de especificidade, entretanto o Map apresenta o crescimento mais fastidioso dentre todas as micobactérias, com o período de incubação de até 8 -16 semanas, dependente de

fonte exógena de micobactina J, o que pode levar meses até o diagnóstico final (Lilenbaum *et al.*, 2007).

O exame microscópico por meio da coloração de Ziehl-Neelsen dos esfregaços fecais e de tecidos dos animais infectados é uma forma rápida e econômica de obter o diagnóstico, dependendo da presença de agregados de bacilos, que podem ser excretadas de forma intermitente (Coelho *et al.*, 2008). Nos casos mais avançados da doença, este diagnóstico não oferece nenhuma dúvida, uma vez que os bacilos são muito abundantes e adotam uma disposição característica em grumos, devido à manutenção da estrutura que têm no interior dos macrófagos. Nos casos em que a quantidade de bacilos é menor em estados iniciais da doença, o diagnóstico torna-se mais difícil e desvantajoso, à medida que, a amostra que se examina ao microscópio pode não permitir a visualização da micobactéria devido ao fato de ser em pequena quantidade, e a observação de bacilos isolados de origem ambiental é relativamente comum e a simples visualização pode não propiciar diferenciação de outro tipo micobacteriano o que torna o diagnóstico difícil devido à baixa especificidade da técnica (Coelho *et al.*, 2008).

Outro método que é utilizado para o diagnóstico da paratuberculose bovina é a imunohistoquímica que possibilita a detecção de antígenos teciduais por meio de utilização de anticorpos específicos (Delgado *et al.*, 2009). É altamente sensível, capaz de detectar os antígenos e até mesmo seus fragmentos nas lesões. Esta técnica mostra-se mais sensível que a coloração álcool-ácido-resistente destes patógenos. Entretanto, este procedimento não é específico, não diferenciando as espécies do gênero *Mycobacterium* spp (Paolicchi *et al.*, 2001).

Ensaio moleculares baseados em seqüências específicas de DNA permitem uma identificação rápida e segura, e têm sido usados para confirmar resultados de cultura positiva e para identificar *Map* em fezes, leite ou tecidos. Contudo, esta técnica requer equipamentos específicos, técnicos especializados e custo elevado, fator limitante para países em desenvolvimento (Lilenbaum *et al.*, 2007).

Testes de imunidade celular são os mais realizados por terem baixo custo, facilidade para obter e processar as amostras e rapidez na obtenção de resultados. O teste alérgico, intradérmico, é realizado através de produtos micobacterianos como os Derivados Protéicos Purificados (Purified Protein Derivative - PPD), tuberculina aviária ou a jonina (extrato de *Map*). É um teste de sensibilidade, em que os animais infectados com o *Map* produzem uma resposta imune do tipo celular quando entram

em contato com os produtos microbianos - PPD, tuberculina aviária e jonina (Stehman, 1993). Este teste não se mostra útil por ocorrerem com frequência resultados falso-positivos e falso-negativos (Stehman, 1993). Devido à reação antigênica cruzada ocasionada pela presença de micobactérias presentes no meio ambiente (Harris e Barletta, 2001).

O controle e a erradicação da paratuberculose dependem da execução das práticas que limitam o risco da transmissão da doença, como um bom manejo (Manual Merck, 1997; Wraight *et al.*, 2000). Além do que, devem ser adotadas medidas preventivas, como testes diagnósticos, limitação do movimento animal entre as fazendas e vacinação. Mundialmente, as medidas de controle são baseadas em abate dos animais positivos (Manual Merck, 1997), separação da mãe imediatamente após o nascimento dos filhos de vacas positivas, alimentação com colostro pasteurizado ou proveniente de vacas negativas. A separação dos animais adultos e jovens é importante, evitando a transmissão entre os grupos, principalmente, pela água de beber e alimentos contaminados pelas fezes.

Não há tratamento específico para a paratuberculose. Entretanto, o método de “teste e abate” dos animais doentes é o mais utilizado entre os pecuaristas. A doença é geralmente detectada em um estágio avançado, e não compensa financeiramente os gastos com drogas, para o tratamento destes animais. Deste modo, é mais fácil sacrificar o animal (Harris e Barletta, 2001).

1.5. Iniciativas para um diagnóstico preciso da Paratuberculose e Tuberculose humana e bovina

Diante das dificuldades apresentadas sobre o diagnóstico destas micobacterioses, vários métodos alternativos têm sido desenvolvidos e intensamente estudados. Dentre esses métodos, destacam-se os baseados em biologia molecular e os de imunodiagnóstico baseados na detecção e identificação dos antígenos micobacterianos em material clínico, através da utilização de anticorpos monoclonais. Em relação aos métodos de imunodiagnóstico, as proteínas que são secretadas em meio de cultura durante o crescimento das micobacterias têm recebido toda atenção, devido sua interação inicial com o sistema imune do hospedeiro. Estas proteínas têm sido estudadas como possíveis candidatas a vacina e para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico.

Membros do gênero *Mycobacterium* secretam uma variedade de proteínas que são detectáveis em filtrado de meio de cultura. Dentre elas, podemos destacar um complexo de 45/47 kDa denominado Apa (alanine-proline antigen) ou Mtb 32, que contém uma alta porcentagem de alanina (20%) e prolina (20%), e é uma das proteínas ativamente secretadas pelas micobactérias durante seu crescimento. No filtrado do meio de cultura, este complexo protéico representa 2% de todo material secretado e possui as propriedades antigênicas imunodominantes (Horn C. *et al.*, 1996; Arias-Bouda L. M. P *et al.*, 2000). O Apa se encontra em várias micobactérias tais como *M. bovis* BCG, *M. bovis* (MB), *M. tuberculosis* (MT) e *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPTB). Esta proteína está expressa de forma diferente nas bactérias de família *M. tuberculosis* e *M. avium*. A composição de aminoácidos de Apa de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPTB-Apa) difere em comprimento com outros ortólogos. MPTB-Apa possui 368 resíduos, 43 aminoácidos a mais que no complexo de *M. tuberculosis* (Gioffré *et al.*, 2009). Foi demonstrado que em sobrenadante de filtrado de cultura de MPTB, MPTB-Apa apresenta peso molecular 50 – 60 kDa e MB- Apa ou MT-Apa apresenta um peso de 45 – 47 kDa no sobrenadante de cultura destas micobactérias (Gioffré *et al.*, 2009).

Outro antígeno que tem sido alvo de pesquisa é a lipoarabinomanana (LAM), maior componente da parede da célula micobacteriana, onde está presente em altas concentrações, além de ter sido detectada em amostras clínicas de pacientes com tuberculose. Essas características fazem o LAM um antígeno candidato para o imunodiagnóstico da tuberculose (Tessema *et al.*, 2001). A molécula LAM tem sua estrutura muito preservada nas diferentes espécies de micobactéria, apesar de ser fortemente manosilada nas bactérias de família *M. tuberculosis* (*M. bovis* e *M. tuberculosis*) e muito menos manosilada ou não-manosilada em *M. avium* ou *M. smegmatis* (Brennan *et al.*, 1990).

Anticorpos monoclonais, gerados contra antígenos de cada espécie de micobactérias podem ser capazes de diferenciá-las, e possuem grande vantagem para este tipo de imunodiagnóstico. Cambiaso *et al.* (1995) e Arias-Bouda (2000) têm demonstrado resultados positivos na utilização de anticorpos específicos anti-Man-LAM de *M. tuberculosis*, em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em escarro de pacientes infectados com TB, e que o nível de detecção foi de 10^4 bactérias/ml, compatível com a sensibilidade da baciloscopia. Enquanto que Boehme *et al.* (2005) indicaram uma sensibilidade de 80%, usando anticorpos contra Man-LAM em urina de pacientes com

TB contra 62% de sensibilidade da baciloscopia do escarro.

Estes antígenos (proteínas secretadas) que estão presentes no complexo de *M. avium* e não em *M. bovis* e *M. tuberculosis* são alvos interessantes para o diagnóstico diferencial entre tuberculose e paratuberculose bovina e também entre infecções do complexo de *M. avium* e tuberculose em humanos através da imunodeteção destes em material clínico de pacientes e animais infectados (Laqueyrie *et al.*, 1995).

As propriedades imunogênicas desses antígenos facilitam obtenção de anticorpos contra estas proteínas e a produção de anticorpos monoclonais seria de grande relevância uma ferramenta útil e definitiva na identificação dessas micobacterioses.

1.6. Tecnologia de Hibridomas

A geração de anticorpos monoclonais revolucionou a imunologia e foi de grande impacto em diversos campos de pesquisas e na clínica médica.

Ao contrário dos anticorpos policlonais do soro, que são produzidos normalmente pelo animal imunizado, os anticorpos monoclonais são gerados artificialmente e apresentam alta especificidade para um único epítipo antigênico, além de poderem ser produzidos em larga escala através da geração de hibridomas (Oi & Herzenberg, 1980; Milstein, 1981; Goding, 1986). Estes têm sido amplamente utilizados na caracterização de novas proteínas de superfície celular, proteínas solúveis, aplicação para a imunoterapia. O uso de anticorpos monoclonais para o estudo dos antígenos micobacterianos apresenta grande vantagem em relação aos anticorpos policlonais, pois, para os últimos sempre há alguma possibilidade de ligação com outros antígenos, devido às dificuldades de purificação completa do antígeno para imunização.

A técnica de imortalização de linfócitos B que produzem anticorpos monoclonais específicos é a base da tecnologia de hibridomas (Abbas A. K. *et al.*, 2005).

O primeiro método desenvolvido e agora correntemente utilizado para a produção de anticorpos monoclonais de especificidade conhecida foi descrito por Georges Köhler e César Milstein em 1975 (eles receberam o prêmio Nobel de Medicina em 1984 por suas pesquisas). Esta técnica foi desenvolvida baseada no fato de que cada clone de linfócito B produz anticorpos de uma única especificidade, únicos isotipo, idiotipo e alotipo. Como células B normais não podem crescer

indefinidamente, era necessário imortalizar células B produtoras de anticorpos específicos. Este objetivo foi alcançado através da fusão de células B do baço do camundongo imunizado com o antígeno de interesse, com células tumorais (mielomas), gerando hibridomas capazes de produzir anticorpos homogêneos (Abbas A. K. *et al.*, 2005).

O hibridoma produtor de um anticorpo de interesse pode ser isolado por um processo de seleção. Se este hibridoma passar por um processo de clonagem no qual clones específicos são selecionados, de modo que toda a progênie seja derivada de uma célula parental clonada, um anticorpo monoclonal é obtido.

A tecnologia de hibridomas requer o cultivo de linhagens de células tumorais, as células do mieloma (Oi & Herzenberg, 1980; Milstein, 1981; Goding, 1986). O mieloma ou plasmocitoma é um tumor maligno de células B cujas células se multiplicam rapidamente, e produzem grandes quantidades de imunoglobulinas ou seus componentes, denominadas proteínas mielomatosas (Wu *et al.*, 1970). O tumor representa um clone imortal de células B descendente de uma única célula progenitora, que pode ser cultivado indefinidamente e que secretam imunoglobulinas estruturalmente idênticas.

Os mielomas utilizados na geração dos hibridomas não secretam imunoglobulinas e, crescem em meio de cultura comumente utilizado, mas não em meio seletivo definido. As linhagens celulares que podem ser usadas como parceiros de fusão para a obtenção dos hibridomas são criadas pela indução de vias de síntese de nucleotídeos defeituosas (Abbas A. K. *et al.*, 2005).

As células normais sintetizam o nucleotídeo purina e timidilato, ambos precursores de DNA, na *via de novo* que requer tetrahidrofolato. Algumas drogas, tais como a aminopterina, bloqueiam a ativação de tetrahidrofolato através da inibição de síntese de purinas e, portanto, inibem a síntese de DNA pela *via de novo*. Células tratadas com aminopterina podem usar a via de salvação para a síntese de DNA, na qual a purina é sintetizada a partir de um suplemento exógeno de hipoxantina usando a enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), e o timidilato é sintetizado a partir de timidina usando a enzima timidina quinase (TK). Por esse motivo, estas células crescem normalmente na presença de Aminopterina em meio de cultura suplementado com hipoxantina e timidina (meio HAT), (citado em Abbas A. K. *et al.*, 2005).

As células de mieloma (podem ser) defeituosas na enzima HGPRT ou TK através de mutagênese, seguida pela seleção sobrevivem em meio contendo os substratos para essas enzimas e são selecionadas para fusão (citado em da Silva W. D. *et al*, 2003).

As células de mieloma negativas para HGPRT ou TK não podem usar a via de salvação e, portanto morrerão quando cultivadas no meio de cultura HAT. Se as células B normais são fusionadas com células negativas para HGPRT ou TK as células B fornecerão a(s) enzima(s) necessária(s), de modo que o híbrido possa sintetizar DNA e crescer em meio HAT (da Silva W. D. *et al*, 2003).

A seleção dos híbridos ocorre dentro de duas semanas, os clones de hibridomas crescem e tornam-se visíveis e o sobrenadante da cultura a ser examinado para verificar a produção de anticorpos específicos para o antígeno da imunização. O método mais comumente utilizado para a verificação da positividade é o ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) (Ansell P. R., 2000).

Os híbridos positivos são selecionados, clonados para garantir a monoclonalidade, e depois são cultivados com o objetivo de obter sobrenadantes de cultura que contém os anticorpos monoclonais desejados. Outra fonte de anticorpos monoclonais é o fluido ascítico acumulado na cavidade peritoneal de camundongos que foram injetados, intraperitonealmente, com o hibridoma. A concentração anticorpos monoclonais obtidos em fluido ascítico é em torno de 1 - 5 mg/ml de proteínas, enquanto que nos sobrenadantes é de 5 - 25µg/ml (da Silva W. D. *et al*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

A situação emergencial da paratuberculose e tuberculose humana e bovina na região Norte Fluminense demonstra uma grande necessidade de um diagnóstico laboratorial específico e sensível das infecções micobacterianas, de preferência que possibilite diferenciar espécies micobacterianas causadoras da doença, o que permitirá começar imediatamente a terapia adequada prevenindo a transmissão da micobactéria.

Em animais, os principais métodos de diagnóstico das infecções micobacterianas se baseiam na análise histopatológica das lesões teciduais do gado abatido e teste tuberculínico com Derivados Protéicos Purificados (PPD) de *M. tuberculosis* ou *M. avium*, que não são muito específicos e não permitem diferenciar infecções provocadas pelas espécies micobacterianas diferentes.

Antígenos micobacterianos expressados de forma diferente nas espécies de micobactérias podem surgir como um alvo para imunodeteção e diagnóstico diferencial das infecções micobacterianas. O antígeno Apa é uma proteína produzida por *M. avium* e *M. tuberculosis* em isoformas diferentes. As propriedades imunogênicas desse antígeno facilitam obtenção de anticorpos contra esta proteína e a produção de anticorpos monoclonais específicos para espécies de determinadas micobactérias, pode ser uma ferramenta útil para o diagnóstico diferencial de micobacterioses.

3. OBJETIVO:

O objetivo deste trabalho é a criação de anticorpos monoclonais como uma ferramenta para imunodiagnóstico das doenças de importância para Saúde Pública como a Tuberculose (TB) e a Paratuberculose (PTB) bovina, baseada na detecção e identificação do antígeno rApa MPTB em material clínico.

3.1. Objetivos específicos:

1. Gerar hibridomas capazes de produzir anticorpos monoclonais contra o antígeno Apa de *M. avium subesp. paratuberculosis* ;
2. Selecionar os hibridomas produtores de anticorpos monoclonais específicos para diferentes espécies de micobactéria, úteis para detecção e diferenciação;
3. Aplicar os anticorpos produzidos na detecção e identificação de micobactérias em material clínico através dos ensaios: ELISA, imunofluorescência, e imunohistologia.

4. METODOLOGIA

4.1- Animais

Foram utilizados oito camundongos BALB/c, adquiridos de fornecedor credenciado, sendo estes criados e mantidos em micro-isoladores pelo Biotério de Camundongos da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Os animais foram abrigados em ambiente padrão, com livre acesso para água e comida. Todos os animais foram mantidos e utilizados sob condições éticas de acordo com as recomendações internacionais e da Comissão de Ética em Animais de Laboratório do Centro de Biociências e Biotecnologia- UENF.

4.2- Imunização e produção de hibridomas anti –rApa MPTB

Um grupo de três camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados intraperitonealmente em dois períodos contendo intervalo de 21 dias com a proteína APA recombinante de *M. avium subesp. paratuberculosis* (cedido pela Dra Andrea Gioffre, INTA. Argentina), contendo 30 µg em 0.5ml de PBS (pH 7.3) por injeção. Os antígenos foram emulsificados em Freund's incomplete adjuvant em todas as imunizações. Após isso, foi injetada a dose de reforço: 20 µg de proteína em PBS, por via intraperitoneal. Quatro dias após a inoculação foi feita a coleta de sangue e realizado teste de ELISA para quantificar o título dos anticorpos. Após 21^o dia a partir de data da última inoculação do antígeno, foi realizado um booster (três injeções do antígeno nos dias consecutivos) com 10 µg da proteína em PBS por via intraperitoneal. No dia seguinte os camundongos foram sacrificados e o baço foi utilizado para obtenção das células imunes.

Células provenientes do baço dos camundongos imunizados foram fundidas com células de mieloma NS0 transfectadas pelo gene anti-apoptótico hsp70 humano para aumentar o rendimento dos hibridomas (Lasunskaja et al., 2003). A fusão foi feita utilizando-se PEG 4000 (GibcoBRL,EUA), segundo metodologia descrita por Kohler e Milstein (1975). Após a fusão, as células foram ressuspensas em meio DMEM – F12 (Gibco BRL,EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 20µl/ml de gentamicina (Gibco BRL,EUA), 50µM de β - mercaptoetanol e agente seletivo HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina) 50X (Sigma Chemical,EUA). A suspensão

celular foi semeada em placas de 96 poços (Corning, EUA), que continham previamente uma monocamada de células peritoneais de camundongos BALB/c, de modo que a concentração de células em cada poço fosse de 2×10^5 células, e em seguida foram incubadas em estufa 37°C. Quando as colônias de hibridomas atingiram aproximadamente 300 células, os respectivos sobrenadantes foram analisados através do teste de ELISA e anti- APA.

4.3. Obtenção dos macrófagos peritoneais para camada nutritiva (Feeder Layer):

Os macrófagos foram obtidos através da lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, de 5 semanas, com meio Dulbecco's Modified Eagles Medium F-12 (DMEM-F12, GIBCO, BRL). Foram injetados 5 ml de meio DMEM-F12 no peritônio de cada um dos camundongos, e deixados por aproximadamente 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, o líquido peritoneal foi coletado e centrifugado a 1200 g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 10 ml de meio DMEM-F12, contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO, BRL, EUA). A suspensão celular foi distribuída em placas de 96 poços (100µl/poço) e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24h.

4.4. Cultura Celular

As células de mieloma murinas NS0 foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm³ (corning) e os hibridomas posteriormente gerados, foram cultivados em placas de 96 poços (corning) e em garrafas de plástico de 25 cm³. Todos os processos acima descritos utilizaram como meio nutricional Dulbecco's Modified Eagles Medium F-12 (DMEM-F12, GIBCO, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, BRL, EUA), 20% de antibiótico gentamicina e 0,5 mM de 2β-mercaptoetanol a 37°C e 5% de CO₂, com troca de meio a cada três dias.

4.5. Clonagem dos Hibridomas

Os hibridomas positivos no teste de ELISA foram clonados por diluição limitante. As células contidas em cada poço positivo foram quantificadas, diluídas a

20 células/mL e semeadas no volume de 100 µL por poço, em placas de 96 orifícios, contendo 100 µL de meio DMEM-F12 e macrófagos peritoneais de camundongo (2×10^5 células/mL). Cada clone foi subclonado pelo menos três vezes antes de ser ampliado para coleta de sobrenadante e/ou produção de líquido ascítico e congelado em nitrogênio líquido.

4.6. Produção de líquido ascítico

Após 7 dias de injeção de 0,5ml de Pristane (Sigma Chemical Co,EUA) por via intraperitoneal, os camundongos BALB/c foram injetados pela mesma via com 2×10^6 células do hibridoma em estudo, previamente lavadas com PBS. Os camundongos foram observados diariamente e cerca de 10 dias após a injeção das células, os líquidos ascíticos foram coletados. Estes foram centrifugados a 1000g e os respectivos sobrenadantes foram testados por ELISA e mantidos à 4°C.

4.7. Seleção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra os antígenos micobacterianos

4.7.1. Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA)

Como antígenos, foram utilizados lisados O-BCG-wcl, *M. avium*- wcl, rApa e *M. avium. paratuberculosis*-wcl e CFP (proteína de filtrado de cultura) de *M. avium. paratuberculosis* (cedida pelo INTA-Argentina) ou a proteína Apa H37Rv (cedida pela Colorado State University- USA)

Cinquenta microlitros destes antígenos na concentração de 2µg/mL diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.7 (Na_2CO_3 0.015 M; NaHCO_3 0.035 M) foram adicionados para cada orifício da placa teste de ELISA separadamente (Cell Star) e incubados por 18 horas a 4°C. A seguir, os poços foram lavados duas vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST 0.05%) e bloqueados com meio de cultura (DMEM-F12) com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 1 hora. Passado o tempo de bloqueio, a placa foi lavada com PBST 0,05% por duas vezes. Então, adicionou-se 50 µL do sobrenadante das culturas de hibridomas ou líquido ascítico diluído em PBST (1:3000) foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente.

A fim de evitar ligações primárias inespecíficas, a placa foi lavada três vezes com PBST 0,05%. Posteriormente, cada poço foi incubado com anticorpo secundário de camundongo anti-Ig total de camundongo conjugado à peroxidase (Southern Biotechnologies Associates), diluído 1:2000 em PBST 0.05%, por 1 hora à temperatura ambiente. A placa, então, foi lavada três vezes com PBST 0.05%. A reação foi revelada com 50 µl da solução OPD (o-fenilenodiamina – 2HCl, ácido cítrico 20mM, fosfato de sódio 40mM). A reação foi interrompida adicionando-se 50 µl de H₂SO₄ 3N por poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm.

4.8. Western Blotting

4.8.1 Preparação das amostras

As proteínas constituintes de *M. bovis* BCG - *wcl* (10µg/canaleta), *M. avium* (15µg/canaleta) foram precipitadas em acetona (três vezes com o volume da amostra), a -20 °C, por 30 minutos e desnaturadas em tampão de amostra 4x (60 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 5% 2-β-mercaptoetanol, 10% de glicerol, 0,025% azul de bromofenol), fervidas por 5 minutos, e centrifugadas a 200g por 7 minutos e analisadas por eletroforese em SDS-PAGE a 10%.

Para os antígenos Apa purificado de MAPA (INTA- Argentina) e Apa purificado de Mtb H37Rv (Colorado State University-USA) foram utilizados 2 µg /canaleta, *M. avium. paratuberculosis-wcl* e CFP *M. avium. paratuberculosis* foram utilizados 20µg/canaleta e desnaturados em tampão de amostra especificado acima.

A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi realizada segundo a metodologia de Laemmli (1970), em gel descontínuo, constituído de: gel separador (10% acrilamida, 0,2% bisacrilamida, 0,1% SDS, e 0,375 M tris pH 8,8), gel de concentração (5% acrilamida, 0,5% bisacrilamida, 0,1% SDS e 0,125 M tris pH 6,8) e tampão de corrida (25mM Tris, 192 mM glicina e 0,1% SDS pH 8,3). As corridas eletroforéticas foram realizadas no sistema de mini-gel (Dual Gel Caster Amersham Pharmacia Biotech), utilizando-se tampão de corrida sob 80 V constantes no gel de concentração e 110 V constantes no gel separador. A massa molecular das amostras de proteínas foi comparada com padrão de massa moleculares conhecidas.

4.8.2- Transferência e Tratamento da Membrana

Após a corrida eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para uma matriz de nitrocelulose com poros de 0,45µm (Amersham Life Sciences), de acordo com Towbin *et al.* (1979), utilizando o equipamento de transferência líquida BioRad em tampão de transferência Tris-Glicina (25mM Tris, 192 mM glicina e 20% de metanol) por 1 hora e 40 minutos em constantes 250 mA. Após a transferência das proteínas, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS) durante 18 horas a 4°C. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpos monoclonais dos sobrenadantes das culturas de hibridomas (sem diluição), ou com ascite diluída 1:5000 ou com os anticorpos contra o antígeno Apa descritos acima.

As membranas foram lavadas três vezes com PBST 0,05% durante 5 minutos. Após as lavagens, foi acrescentado o anticorpo secundário de cabra anti-Ig total de camundongo conjugado a peroxidase (Southern Biotechnologies, EUA) ou anticorpo anti-Ig total de coelho conjugado a peroxidase, ambos diluídos 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas nas mesmas condições acima citadas.

A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB (diaminobenzidina) (100µl Tris-HCL 2 M pH 7,5, 4,9 ml de água destilada, 5 mg DAB, 0,3ml imidazol 0,1 M, 5 µl H₂O₂).

4.9. Detecção de antígenos micobacterianos por imunofluorescência

Macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7 foram descongelados e cultivados por cinco dias. Então, foram plaqueados na concentração 3×10^5 células/ml poço em placa de 24 poços, com lamínulas estéreis em cada. No dia seguinte, as células foram infectadas com as seguintes micobactérias: *M. bovis*- BCG e *M. avium* na proporção de 50:1 (micobactérias/macrófagos). Após 72 horas, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (500µl/poço) por 1 hora em temperatura ambiente. Foram realizadas três lavagens com PBS para posterior permeabilização por triton 0,5% (500µl/poço) por 30 minutos em temperatura ambiente.

As lamínulas dentro das placas de 24 poços foram bloqueadas durante 30 minutos à 4°C com DMEM-F12 suplementado com 10% de soro. Foram realizadas

três lavagens com PBS (300µl/poço). Em seguida, foram tratadas com os anticorpos monoclonais obtidos no sobrenadante da cultura, e provenientes de ascite (1:3000) e anti-Apa policlonal (1:20) Colorado State University-USA. Como controles foram utilizados como controle positivo, soro policlonal e como controle negativo, PBS e poços sem infecção. Foram realizadas quatro lavagens com PBS (300µl/poço). Foram adicionados os anticorpos secundários anti-camundongos biotinilados (1:1000) ou conjugados com FITC (1:100) na ausência de luz, durante 1 hora. Foram realizadas quatro lavagens com PBS (300µl/poço). As lamínulas tratadas com anticorpos secundários biotinilados foram lavadas três vezes com PBS (300µl/poço) e a estas adicionada estreptavidina conjugado com ficoeritrina (1: 100) (PE).

Para montagem das lâminas, foi adicionado 1µl de N- propil galato à lâmina e a lamínula foi colocada sobre a gota com a parte contendo as células voltada para a lâmina. Para vedar, foi passada uma fina camada de esmalte nas bordas da lamínula.

4.10. Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada no Laboratório de Sanidade Animal (LSA) localizado no Hospital Veterinário na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Seções inclusas em parafina de 4µm contendo lesões teciduais de bovinos infectados com paratuberculose bovina e tuberculose humana, foram obtidas das amostras incluídas em parafina, colhidas em lâminas histológicas silanizadas (Silano, Sigma-Aldrich, MO, USA) submetidas à desparafinização em 5 banhos em xilol (10 minutos) e reidratadação em 3 banhos em álcool absoluto e 2 em álcool 90% (5 minutos) e 3 banhos em água deionizada (5 minutos). A seguir, os espécimes foram tratados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 30V (Vetec, RJ, Brasil) a 30% por 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, foram colocados em banho-maria a 98°C em tampão citrato (Vetec, RJ, Brasil), por 30 minutos para recuperação antigênica, e mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos. Subseqüentemente, as lâminas foram cuidadosamente enxutas com papel toalha, os cortes envolvidos circularmente com Dako pen® (Dako, CA, USA), e os espécimes foram incubados por 1 hora com solução para bloqueio de ligações

inespecíficas (Trisma-NaCl (Vetec, RJ, Brasil) com 1% de soroalbumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA – Sigma-Aldrich, MO, USA)] e 1% de leite em pó desnatado (Molico™ - Nestlé, SP, Brasil). Depois de descartada a solução de bloqueio, as seções foram incubadas com os anticorpos monoclonais anti -Apa (MPTB) sem diluição, e ascite numa diluição de 1:3000 e incubados *overnight* a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas (5 minutos) com solução salina de Trisma com Tween20 -TBS (Vetec, RJ, Brasil) e tratadas (30 minutos) com o *Kit* LSAB-HRP⁺ (Dako, CA, USA), lavadas (5 minutos) com TBS e reveladas com *Kit* cromógeno DAB (Dako, CA, USA); contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em banhos de álcool (1 minuto) e montadas com Permount® (Sigma-Aldrich, MO, USA).

4.11. Obtenção de proteína Apa do sobrenadante de filtrado de cultura (CFP) das micobacterias

As proteínas secretadas foram obtidas através da filtração de sobrenadante do cultura de *M. avium* e *M. bovis* BCG com filtros de 0.22µm (Nalge Nunc). As proteínas foram precipitadas em acetona (três vezes com o volume da amostra), a -20°C, durante 2 horas e centrifugadas a 2500g por 20 minutos. Os traços de acetona foram evaporados *overnight* a 4°C e o pellet foi ressuspenso em tampão Low Ripa (20mM Tris HCL Ph 7.5, 150 mM NaCL, 2 mM EDTA, 0.5 % triton X-100, 1 mM ortovolanato de sódio) para imunoprecipitação.

4.12. Isolamento do antígeno Apa do sobrenadante de filtrado de cultura de *M. avium* e *M. bovis*- BCG por imunoprecipitação

Quinhentos microgramas (500 µg) do sobrenadante do filtrado de cultura de *M. avium* e *M. bovis*- BCG foram misturados com 6 µl do líquido ascítico do hibridoma 6F/9/3/2 ou com 15 µl do anticorpo policlonal de coelho anti Apa Mtb H37Rv e, 30 µl da proteína G Agarose (CALBIOCHEM). Á estas misturas foi adicionado tampão Low Ripa até o volume total de 500 µl e estas foram incubadas durante a noite, sob agitação a 4°C. Após esta incubação, a mistura foi lavada 3 vezes com tampão Low Ripa através de centrifugação a 2500 g por 5 minutos. O precipitado foi

ressuspendido em tampão de amostra, fervido por 5 minutos e aplicados no gel de SDS- PAGE a 12%.

4.13. Determinação do isotipo dos anticorpos monoclonais

O isotipo dos anticorpos monoclonais obtidos foi determinado por teste de ELISA, seguido como descrito anteriormente, no qual foram utilizados anticorpos secundários específicos para os diferentes isotipos de imunoglobulinas (anti- IgG1, anti- IgG2a, anti- IgG2b, anti- IgG3).

5. RESULTADOS

5.1. Titulação dos anticorpos nos soros dos camundongos imunizados pelo antígeno rApa – MPTB

Os camundongos imunizados, através de inoculação intraperitoneal com 30 μg da proteína recombinante rApa MPTB no dia 1^o e de 20 μg no dia 21^o, tiveram as amostras de sangue coletadas no dia 25, que foram submetidas ao teste de titulação de anticorpos anti – Apa utilizando ELISA (nas diluições de 1:500 até 1:2500). Para controle negativo, foram usadas amostras de soro obtidas antes de imunização.

Os soros dos camundongos 2 e 3 apresentaram os maiores títulos de anticorpos quando comparados com o camundongo 1, como demonstra a curva de titulação de anticorpos anti – Apa MPTB (Figura 2). O camundongo 3 foi escolhido como o doador de esplenócitos para a realização da fusão.

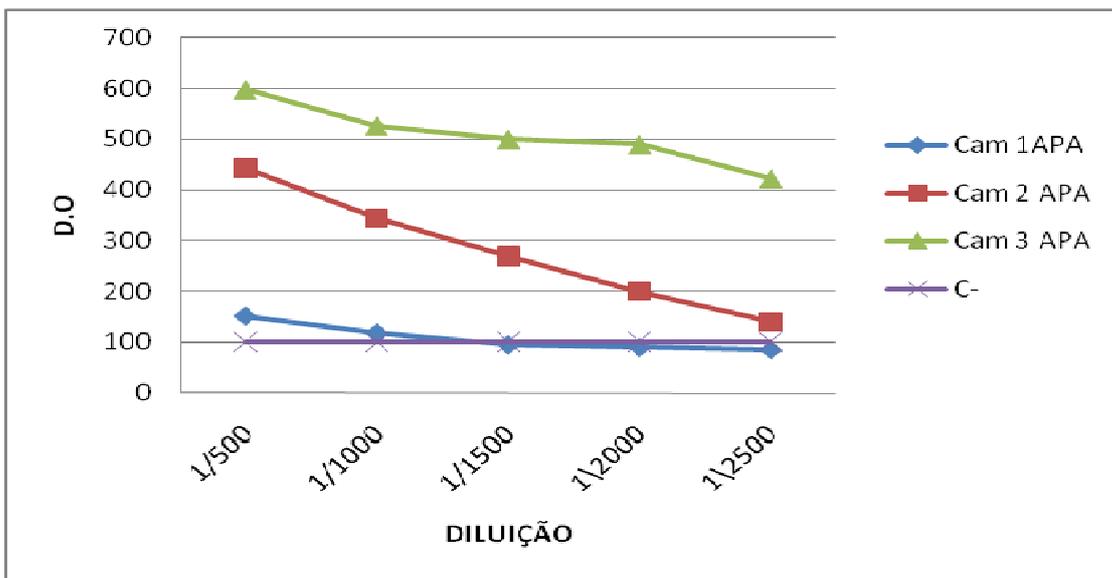


Figura 2 - Obtenção de hibridomas anti-rApa MPTB. Titulação dos anticorpos no soro dos camundongos imunizados com antígeno rApa de *M. avium paratuberculosis* (MPTB). Os camundongos foram imunizados com 30 μg de rAPA no dia 1^o e com 20 μg no 21^o e as amostras de sangue foram coletadas no 4^o dia após sua segunda imunização e testados por ELISA. Como Controle negativo foi utilizado soro do camundongo pré – imune.

5.2. Eficiência da fusão e seleção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-APA MPTB

As células esplênicas do camundongo 3 foram utilizadas para a fusão com as células de mieloma NS0 para a produção dos híbridos. Cerca de 40% dos poços de cultura plaqueados após a fusão apresentaram crescimento de hibridomas, o que representa o rendimento total da fusão.

Os poços positivos para o crescimento dos hibridomas foram testados por ELISA para a presença (no sobrenadante das culturas) de anticorpos contra antígeno rAPA de *M. avium paratuberculosis* (2µg/ml). Apenas 1 (6F) híbrido foi positivo para este antígeno, sendo este selecionado para a subclonagem.

5.3. Eficiência da subclonagem e seleção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra antígeno rAPA – MPTB

O hibridoma selecionado foi subclonado e testado quanto à especificidade contra o antígeno rAPA MPTB. Foram feitas três subclonagens do hibridoma (6F), e em todas (primeira, segunda e terceira) subclonagens este híbrido apresentou 100% de positividade, demonstrando um nível alto de estabilidade apresentado por este híbrido após a fusão. Esse híbrido foi expandido para ser realizada a coleta de sobrenadante e caracterização dos anticorpos monoclonais (tabela 2).

Tabela 2 - Rendimento da primeira/segunda/terceira subclonagem dos hibridomas específicos para rAPA - MPTB

| Clone | Nº de poços avaliados do clone/Nº ELISA-positivos | % | Nº de poços avaliados do clone/Nº ELISA-positivos | % |
|-------|---|-----|---|-----|
| | 1º clonagem | | 2ª clonagem | |
| 6F | 70/70 | 100 | 53/53 | 100 |

| Clone | Nº de poços avaliados para cada hibridoma (1 colônia/poço) | Nº de hibridomas ELISA positivos | % |
|-------|--|----------------------------------|-----|
| | 3º clonagem | | |
| 6F | 50 | 50 | 100 |

5.4 - Caracterização da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos através de ensaio imunoenzimático – ELISA

Os sobrenadantes das culturas 6F/9/3/2 e 6F/3/5/9 foram coletados, e armazenados em tubos de 15 ml a 4°C e utilizados para caracterização dos anticorpos.

O teste de ELISA foi realizado utilizando-se diferentes antígenos micobacterianos: proteína rAPA – MPTB; lisados de micobactéria: *M. avium-wcl* e *M. avium paratuberculosis-wcl*; proteínas do filtrado de cultura de micobactérias - CFP MPTB e CFP de *M. tuberculosis*, Mtb, diluídos em tampão bicarbonato 0.05 M na concentração de 2µg/ml/poço.

Os dados apresentados na figura 3 demonstram que os hibridomas obtidos foram capazes de reconhecer somente rApa- MPTB. O não reconhecimento da proteína secretada de MPTB deve-se a baixa concentração dos anticorpos monoclonais, normalmente encontrada nos sobrenadantes de cultura de hibridoma e/ou baixa concentração de Apa-MPTB em lisado, que não foi suficiente para o reconhecimento da proteína no ELISA.

Os hibridomas selecionados (6F/9/3/2 e 6F/3/5/9), que apresentaram estabilidade e mantiveram característica positiva, foram congelados e preservados em nitrogênio líquido.

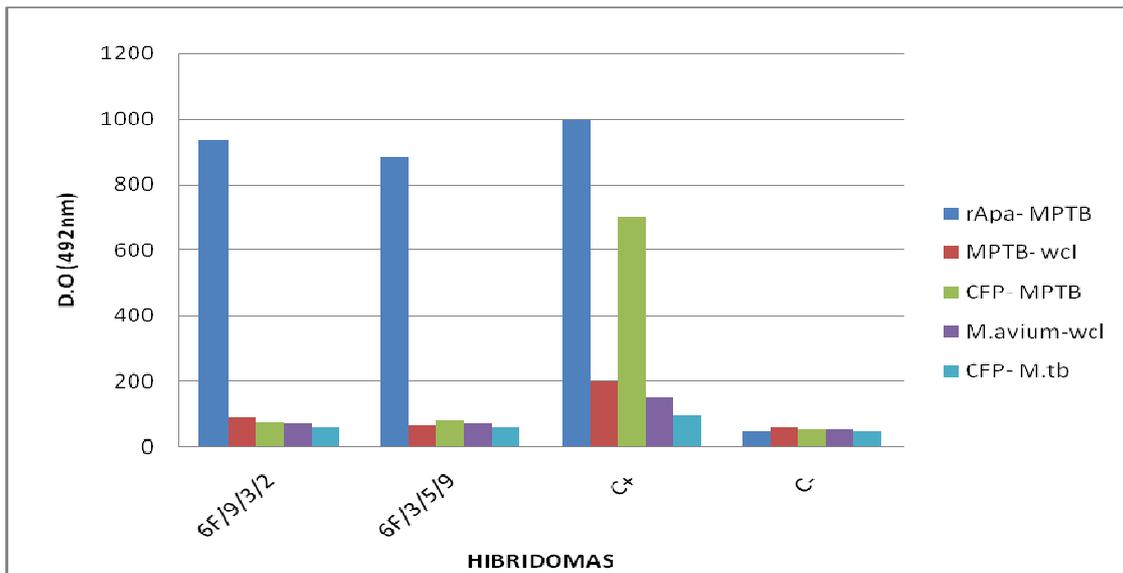


Figura 3 - Análise da especificidade dos hibridomas para diferentes antígenos micobacterianos. Os anticorpos presentes no sobrenadante da cultura dos hibridomas 6F/9/3/2 e 6F/3/5/9 foram caracterizados quanto à especificidade contra rAPA, MPTB-wcl, *M. avium*-wcl, CFP de *M. tuberculosis* e CFP de MPTB. Os antígenos foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M na concentração de 2µg/mL e colocados 50µl para cada poço. Como controle positivo foi utilizado soro imune policlonal de camundongo imunizado com rAPA. Como Controle negativo foi utilizado soro do camundongo pré – imune.

5.5 – Produção de líquido ascítico e titulação dos anticorpos do ascite contra rApa - MPTB

As células de hibridoma 6F/9/3/2, 2×10^6 células, foram injetadas intraperitonealmente para indução da produção de líquido ascítico em grupos de três camundongos da linhagem BALB/c, que foram anteriormente sensibilizados através da injeção intraperitoneal de adjuvante de Freund incompleto. Após a coleta, o líquido ascítico induzido foi testado por ELISA, para verificar o título dos anticorpos através das diluições de 1:50 até 1:5000. O líquido ascítico foi avaliado quanto à especificidade antigênica contra rApa - MPTB, MPTB-wcl, *M. avium*-wcl, e CFP-MPTB no ELISA. Foi confirmada a presença de anticorpos anti- rApa no líquido ascítico provenientes do hibridoma 6F/9/3/2, indicando níveis detectáveis de anticorpos até a última diluição utilizada (1:5000) (Figura 4). O não reconhecimento da proteína Apa nativa nos lisados brutos das micobactérias (MPTB-wcl, *M. avium*-wcl) deve-se ao fato que esta se encontra em menor quantidade quando

sensibilizamos a placa de ELISA em concentrações da proteína de 2 a 5 µg/ml. Para confirmar a capacidade de Mab de reconhecer a proteína Apa nativa no MPTB-wcl, *M. avium*-wcl e no CFP de *M. avium* decidimos utilizar outro método, *Western Blotting*.

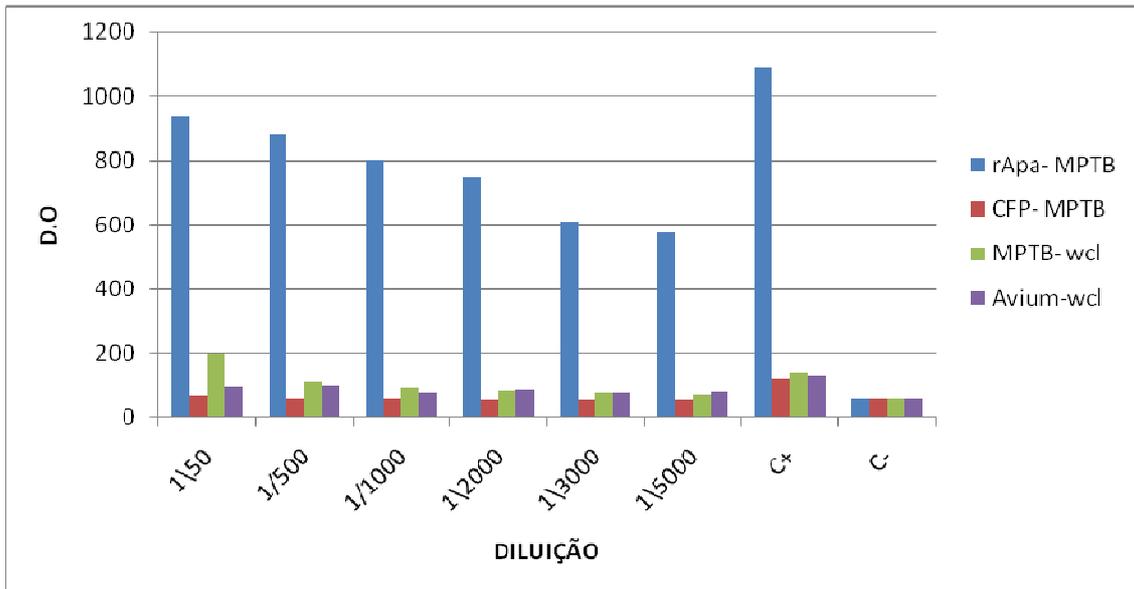


Figura 4- Titulação do ascite do hibridoma 6F/9/3/2. As células de hibridoma (2×10^6 células) foram injetadas intraperitonealmente em camundongos BALB/c sensibilizados por Freund's incomplete adjuvant. O líquido ascítico coletado durante uma semana após a injeção dos híbridos e foi testado em ELISA em diluições seriais.

5.6- Caracterização da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos através da técnica de *Western Blotting*

O sobrenadante de cultura e o líquido ascítico proveniente do hibridoma 6F/9/3/2 foram avaliados para reconhecimento de rApa MPTB (1µg/canaleta), MPTB-wcl, *M.avium*-wcl, CFP - *M.avium* (20 µg/canaleta) e Apa Mtb H37Rv (2µg/canaleta) por *Western Blotting*.

Os resultados demonstram que os anticorpos monoclonais produzidos no sobrenadante da cultura do hibridoma 6F/9/3/2 reconhecem a proteína rApa-MPTB e Apa nativa em MPTB-wcl como uma dupla de bandas de 50 e 60 kDa. Já no lisado de *M. avium* (*M.avium*-wcl) foi reconhecida uma única banda relativa à

isoforma da proteína de 50 kDa (Figura 5). Os anticorpos provenientes do ascite do hibridoma 6F/9/3/2 não reconheceram a proteína secretada CFP – *M. avium*, *M. bovis* BCG-wcl e Apa Mtb H37Rv (Figura 6). O não reconhecimento da proteína Apa de *M. bovis* e *M. tuberculosis* demonstra que os Mabs produzidos são específicos somente para Apa de micobactérias da família de *M. avium*, e não para a família de *M. tuberculosis*. O não reconhecimento da proteína Apa secretada no filtrado de cultura de *M. avium* (CFP) exige estudo adicional, sendo que os Mabs são específicos para esta proteína e a falta de reconhecimento sugere baixa concentração desta no sobrenadante. A imunoprecipitação da proteína do sobrenadante de cultura pode ser utilizada para concentrar Apa.

Mab:sobrenadante de cultura anti-APA 1:1

soro policlonal de camundongo anti-Apa

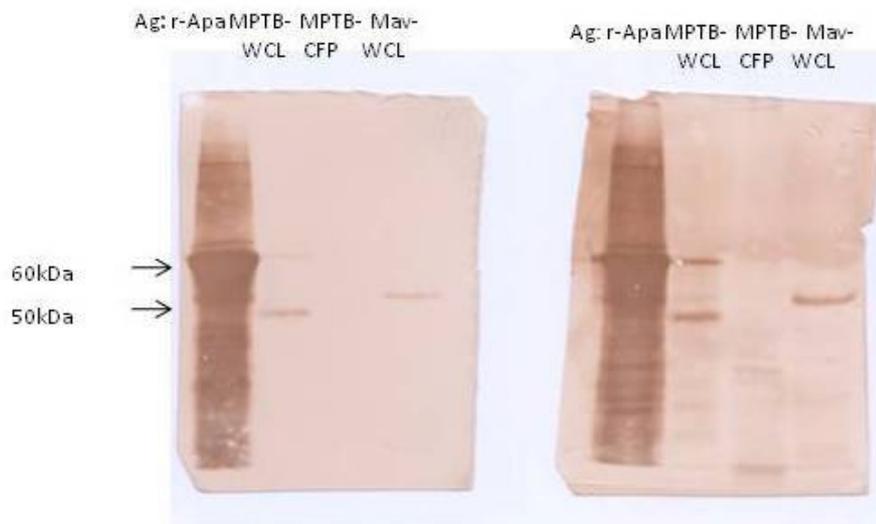


Figura 5: Caracterização da especificidade dos anticorpos anti-Apa produzidos através de *Western Blotting*. Para a corrida eletroforética em SDS-PAGE a 10% foram utilizados como antígeno a proteína rApa MPTB (1 μ g/canaleta); MPTB -wcl; CFP MPTB (20 μ g/canaleta) *M.avium*- wcl (20 μ g/canaleta). A membrana foi tratada com anticorpo monoclonal anti Apa proveniente do sobrenadante de cultura do hibridoma 6F/9/3/2 numa diluição de 1:1, e com o soro policlonal anti Apa do camundongo imune (1:2000). Como tratamento secundário foi utilizado anticorpo anti-camundongo-HRP (1:5000). A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB.

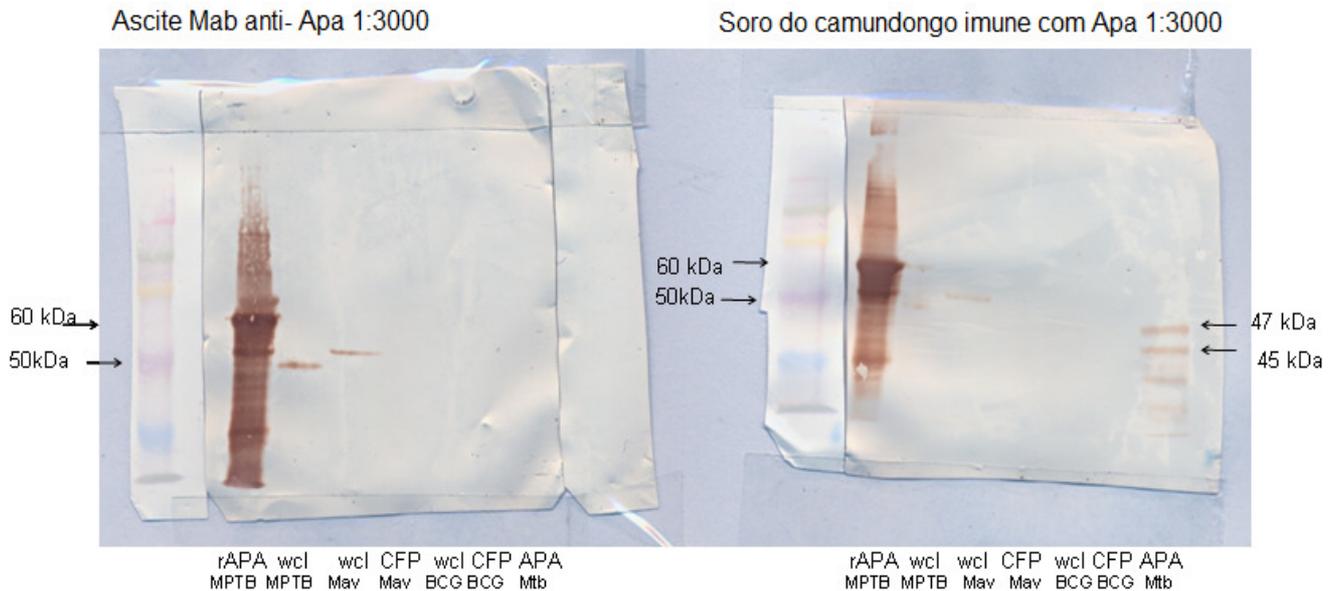


Figura 6: Caracterização da especificidade dos anticorpos anti-Apa em diferentes espécies micobacterianas através de Western Blotting.

Para a corrida eletroforética em SDS-PAGE a 10% foram utilizados como antígeno a proteína rApa MPTB (1µg/canaleta), MPTB -wcl (20 µg/canaleta), *M.avium*- wcl (20 µg/canaleta), CFP - *M.avium*(20 µg/canaleta), *M.bovis*- BCG – wcl (20 µg/canaleta), CFP - *M.bovis*- BCG (20 µg/canaleta), e Apa Mtb H37Rv (2µg/canaleta). A membrana foi tratada com anticorpo monoclonal anti Apa da ascite (1:3000) e com o soro policlonal anti Apa do camundongo imune (1:3000). Como tratamento secundário foi utilizado anticorpo anti-camundongo-HRP (1:5000). A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB.

O padrão de reconhecimento de MPTB- wcl e *M.avium*- wcl pelos Mabs foi diferente, sugerindo que a proteína Apa está expressa nestas duas subespécies de *M. avium* em forma diferente: em *M. avium* subsp. *paratuberculosis* – duas isoformas da proteína (provavelmente, devido á forma glicosilada e não- glicosilada da proteína); e em *M. avium* subsp. *avium* - uma isoforma (não-glicosilada).

O soro policlonal anti- Apa MPTB do camundongo imune ao contrário do monoclonal reconhece Apa de Mtb H37Rv, apresentando um padrão de reconhecimento da proteína de 45/47 KDa diferente da rApa MPTB (50/60 kDa). Ambos os anticorpos (policlonal de soro e monoclonal) não foram capazes de reconhecer Apa secretada no sobrenadante da cultura (CFP- *M. bovis* BCG e CFP- *M. avium*), o que confirma uma baixa concentração da proteína secretada por ambas as bactérias, que não é detectável nem em ELISA e nem em *Western blotting*.

Os dados demonstram que o antígeno rApa MPTB é útil para o diagnóstico diferencial das infecções micobacterianas, sendo que o anticorpo monoclonal produzido anti- Apa mostra-se capaz de diferenciar as micobactérias (lisadas) dos complexos de *M. avium* e *M. tuberculosis*, reconhecendo somente *M. avium*. Anteriormente, produzimos Mabs contra BCG (de Souza G, 2008) capazes de reconhecer uma proteína de 50 kDa (ainda não identificada) expressada por ambas *M. tuberculosis* e *M. avium*. A utilização dos Mabs anti-Apa, específicos exclusivamente para *M. avium*, e Mabs anti-BCG, específicos para *M. avium* e *M. tuberculosis*, permite a aplicação destes para a imunodeteção diferencial de espécies de micobactéria.

5.7. Concentração e isolamento do antígeno Apa do sobrenadante de filtrado de cultura de *M. avium* e *M. bovis* – BCG

O isolamento do antígeno Apa no sobrenadante do filtrado da cultura de *M. avium* e *M. bovis* – BCG foi feito através de imunoprecipitação, utilizando anticorpos anti-Apa MPTB na forma de ascite (figura 7A e 7B) e soro policlonal de coelho anti-Apa Mtb H37Rv (figura 8A). As amostras imunoprecipitadas foram analisadas pela técnica de *Western Blotting*.

Os resultados demonstram (figura 7A) que os anticorpos provenientes do ascite reconheceram e ligaram o antígeno Apa do CFP (isoforma de 60 kDa) de *M. avium*, mas não de *M. bovis* BCG . O soro policlonal do camundongo anti-APA reconheceu Apa de ambas as espécies de micobactéria: Apa em CFP de *M. bovis* e CFP de *M. avium* e Apa no lisado de *M. bovis* – BCG (figura 7A e 7B).

Para confirmar a marcação do reconhecimento de Apa no CFP de *M. avium* pelo anticorpo monoclonal proveniente do ascite, como mostra na figura 7B como uma banda nítida, o tratamento da membrana foi feito com anticorpo mais concentrado numa diluição de 1:2000. Foi observada a presença da banda de 60 KDa (figura 7 B). Foi confirmado também que o anticorpo monoclonal reconhece Apa na sua forma nativa em *M. avium* e não em *M. bovis* BCG.

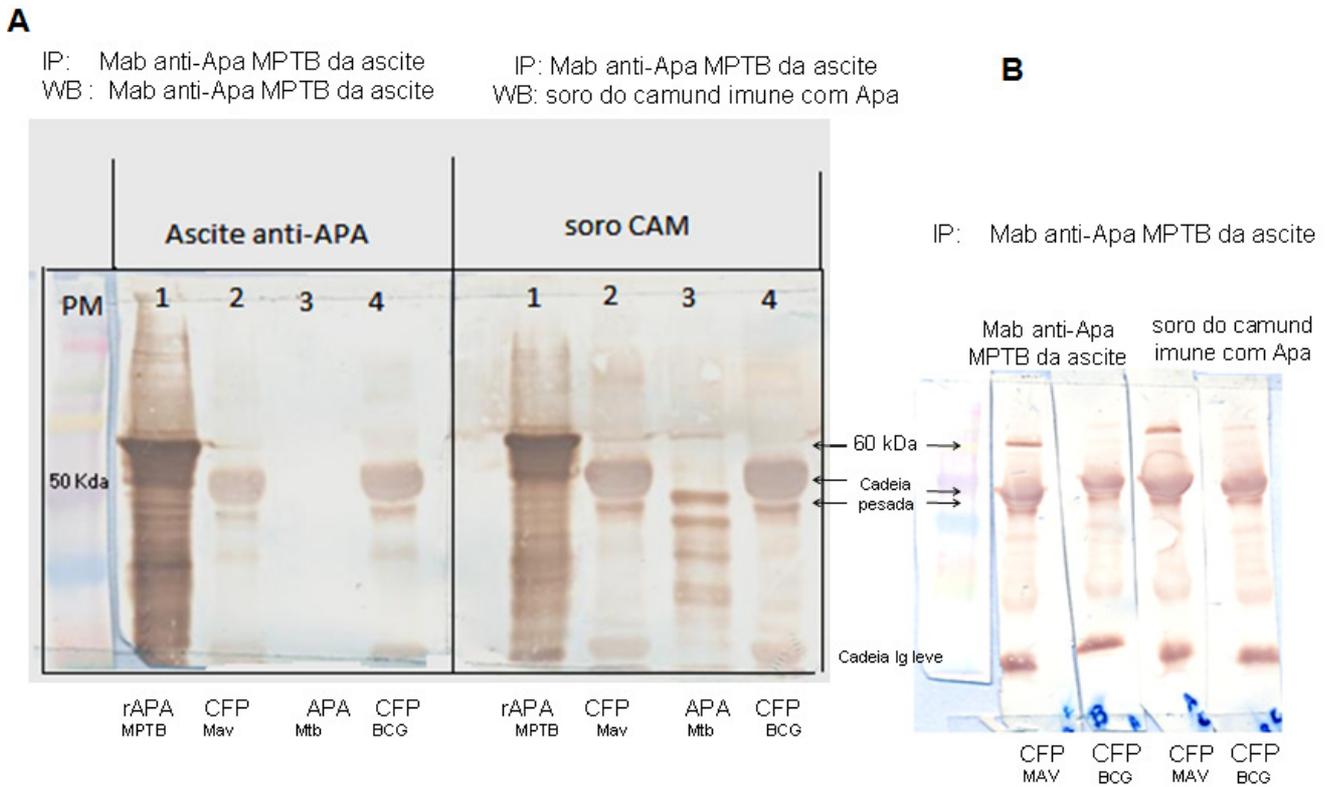


Figura 7- Caracterização da especificidade dos anticorpos anti-Apa em diferentes espécies micobacterianas através de *Western Blotting*. Em **A** para a corrida eletroforética em SDS-PAGE a 12% foram utilizados como antígeno a proteína rApa MPTB (1 μ g/canaleta), amostras do CFP – *M. avium*, Apa Mtb H37Rv (2 μ g/canaleta) e CFP *M. bovis* - BCG respectivamente, precipitadas com 6 μ l de anticorpo monoclonal 6F/9 (proveniente do líquido ascítico). A membrana foi tratada com anticorpo monoclonal anti Apa da ascite (1:3000) e com soro policlonal do camundongo imune (1:2000). Em **B** para a corrida eletroforética em SDS-PAGE a 12% foram utilizados como antígeno as amostras do CFP – *M. avium*, e as amostras do CFP *M. bovis* – BCG precipitadas com 6 μ l de anticorpo monoclonal 6F/9 (proveniente do líquido ascítico). As canaletas foram tratadas com líquido ascítico anti-APA (1:2000), e com soro policlonal do camundongo imune (1:2000). Como tratamento secundário foi utilizado anticorpo anti-camundongo-HRP (1:5000). A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB.

Durante os experimentos, os anticorpos anti-Apa MPTB obtidos nos camundongos (Mabs ou soro) foram utilizados para ambas as técnicas: imunoprecipitação e *Western Blotting*. Por este motivo, os anticorpos utilizados para imunoprecipitação aparecem na membrana resultante na forma de duas bandas (cadeia pesada da imunoglobulina – 50 kDa, e cadeia leve – 25 kDa). Como demonstramos nos experimentos anteriores (Figura 6 e 7), a proteína Apa é

representada pelas bandas de 50 e 60 kDa. A presença da cadeia pesada da Ig está mascarando a presença da Apa de 50 kDa. Para visualizar a presença desta banda, no experimento seguinte substituímos o anticorpo utilizado para imunoprecipitação pelo soro policlonal de coelho anti-Apa de Mtb H37Rv (Figura 8A). Esta figura demonstra que a proteína Apa foi precipitada pelo anticorpo policlonal de coelho anti Apa Mtb H37Rv no CFP de *M. avium*. A membrana obtida após *Western Blotting* foi tratada pelo Mab proveniente do líquido ascítico (A) e soro de camundongo (S). O resultado demonstra que o anticorpo policlonal de coelho anti-Apa de Mtb foi capaz de precipitar o antígeno Apa do CFP de *M. avium* nas isoformas da proteína de 50 kDa e 32 kDa, e sem isoforma de 60 kDa. Já o soro policlonal de camundongo anti-Apa de MPTB (figura 8B) precipita isoforma de 60kDa, e provavelmente a de 50 kDa, que aparece junto com a cadeia pesada da imunoglobulina.

Estes resultados confirmam que o hibridoma obtido produz anticorpos que reconhecem especificamente a proteína Apa na sua forma nativa, que apresenta peso molecular de 50/60 KDa, presente no sobrenadante da cultura de *M. avium*.

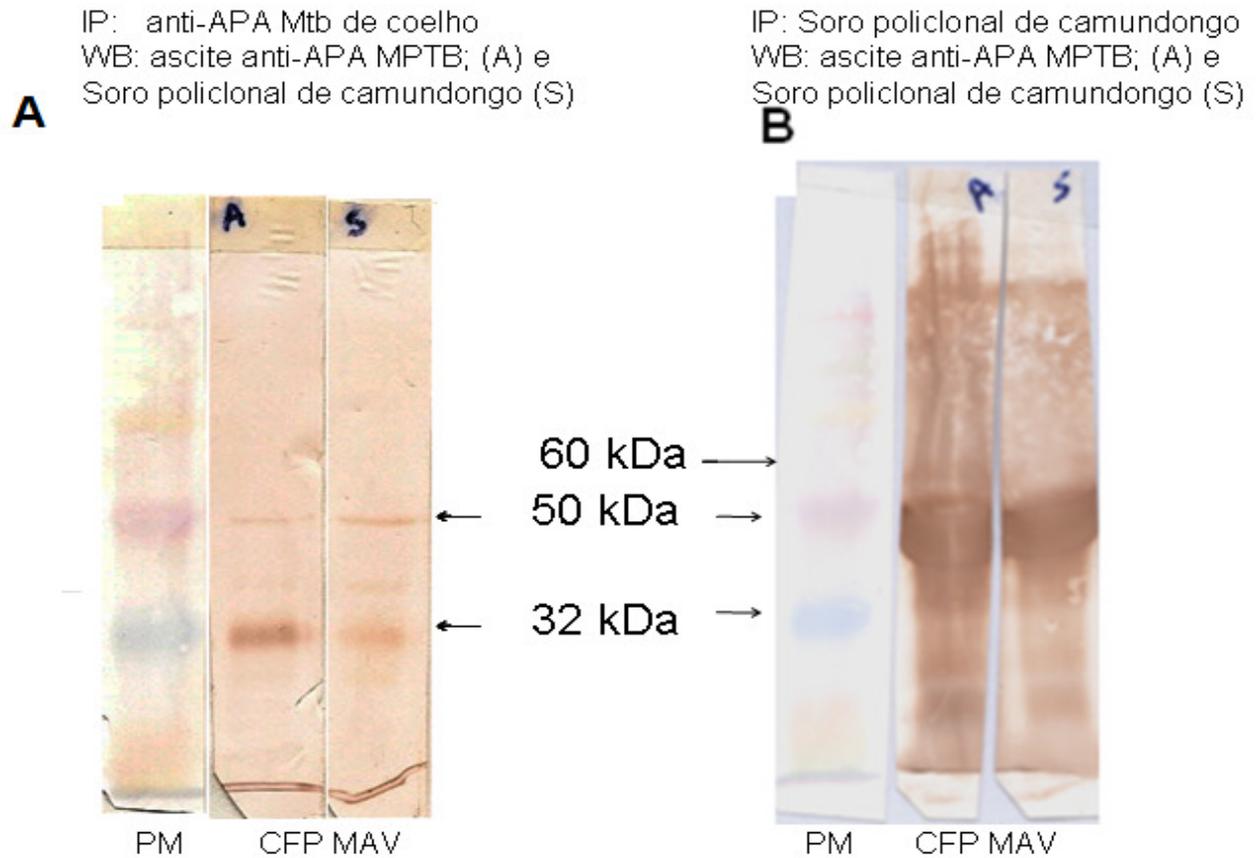


Figura 8: Isolamento do antígeno Apa do CFP de *M. avium*. Para a corrida eletroforética em SDS-PAGE a 12% foram utilizados como antígeno as amostras do CFP –*M. avium*, imunoprecipitadas com 15 μ L de anticorpo policlonal anti- APA Mtb H37Rv em **A**. Em **B**, as amostras foram precipitadas com 5 μ L de soro policlonal de camundongo anti-APA MPTB. Seguiu-se um esquema de tratamento para cada membrana de nitrocelulose obtida após a corrida utilizando-se o ascite anti-APA (A, 1:2000), e o soro CAM imune anti-APA (S, 1:1000). Como tratamento secundário foi utilizado anticorpo anti-IgG de camundongo-HRP (1:5000). A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB. PM (peso molecular), CFP (sobrenadante de filtrado de cultura).

5.8. Obtenção de novos híbridos estáveis capazes de produzir anticorpos monoclonais contra Apa na sua forma nativa úteis para o imunodiagnóstico

Como foi descrito anteriormente, foi obtido somente um híbrido estável que produz anticorpos que reconhecem a proteína Apa- MPTB em sua forma nativa e que permite diferenciar as famílias de *M. avium* de *M. tuberculosis*. Na tentativa de obter novos híbridos, foi realizada uma nova fusão na qual os camundongos imunizados com 50 μ g de rApa MPTB no dia 1^o e com 40 μ g no 21^o, tiveram as

amostras de sangue coletadas no 4º dia após a segunda imunização. O soro dos camundongos imunizados foi testado para a titulação de anticorpos anti – Apa MPTB utilizando ensaios de ELISA (nas diluições de 1:500 até 1:3000). A curva de titulação dos anticorpos anti- Apa (Figura 9) demonstra que todos os soros dos camundongos apresentaram níveis elevados de anticorpos anti- Apa. O camundongo 2 foi escolhido como o doador de esplenócitos para a realização da fusão.

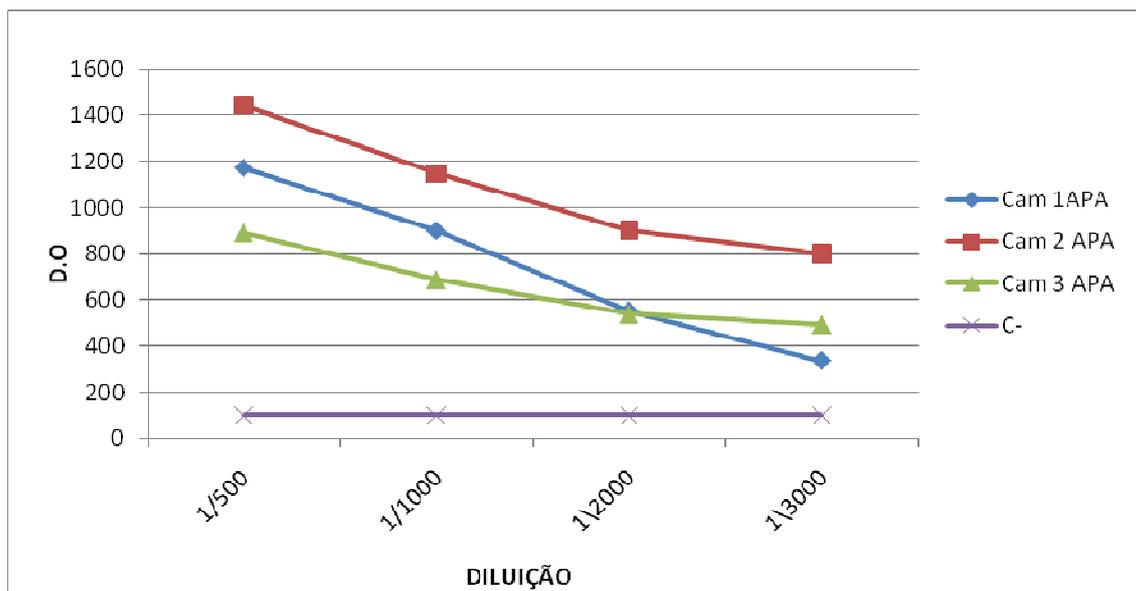


Figura 9. Obtenção de novos hibridomas anti-rApa MPTB. Titulação dos anticorpos no soro dos camundongos imunizados com antígeno rApa de *M. avium paratuberculosis* (MPTB). Os camundongos foram imunizados com 50 µg de rAPA no dia 1º e com 40µg no 21º e as amostras de sangue foram coletadas no 4º dia após sua segunda imunização e testados por ELISA. Como C- foi utilizado soro do camundongo pré – imune.

O screening das placas dos hibridomas obtidos a partir da fusão demonstrou que todos os hibridomas obtidos produziram Mabs reativos à proteína rApa- MPTB (100% de positividade). Após repetitivas sub-clonagens, foram obtidos os seguintes clones estáveis: 1E/10, 2E/7, A4/14, 3E/7 e 2B/7.

5.9- Caracterização da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos

Os sobrenadantes das culturas provenientes dos hibridomas 1E/10, 2E/7, A4/14, 3E/7 e 2B/7 foram avaliados, quanto à especificidade antigênica contra os

antígenos rApa MPTB (1µg/canaleta) e *M.avium- wcl* (20µg/canaleta), por *Western Blotting* (Figura 10).

Os resultados demonstram que todos os anticorpos monoclonais produzidos nos sobrenadantes de cultura dos novos hibridomas reconheceram em SDS-PAGE a proteína rApa- MPTB como uma dupla de bandas de 50 e 60 kDa , e uma única banda (isoforma) de 50 kDa em *M.avium- wcl*, mantendo o mesmo padrão de reconhecimento que o anticorpo monoclonal produzido anteriormente.

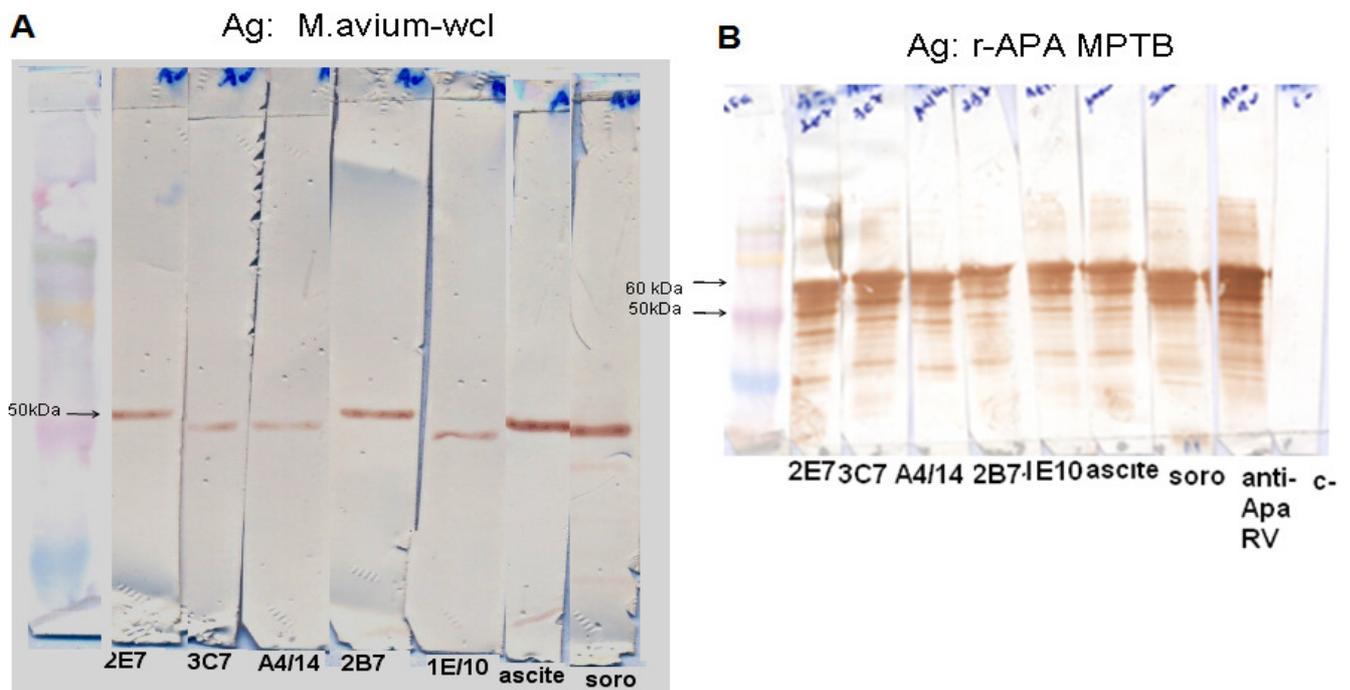


Figura 10: Para a corrida eletroforética em SDS-PAGE a 10% foram utilizados como antígeno *M.avium- wcl* (20 µg/canaleta) **A**. Em **B** foi utilizado como antígeno a proteína r-Apa MPTB (1µg/canaleta). Seguiu-se um esquema de tratamento para cada membrana de nitrocelulose obtida após a corrida utilizando-se os sobrenadantes de cultura dos hibridomas 1E/10, 2E/7, A4/14, 3E/7 e 2B/7, ascite anti-APA (1:3000), e o soro CAM imune (1:2000). Como tratamento secundário foi utilizado anticorpo anti-camundongo-HRP (1:5000). A revelação da membrana foi realizada com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB.

5.10. Determinação do isotipo dos anticorpos monoclonais

A caracterização isotípica dos anticorpos monoclonais foi determinada por meio de ensaio de ELISA, na qual foram utilizados anticorpos secundários específicos para cada isotipo testado. Todos os anticorpos monoclonais anti-Apa produzidos

eram da classe IgG2a, diferentemente de Mabs contra BCG que foram representados pela classe IgG1 (Figura 11).

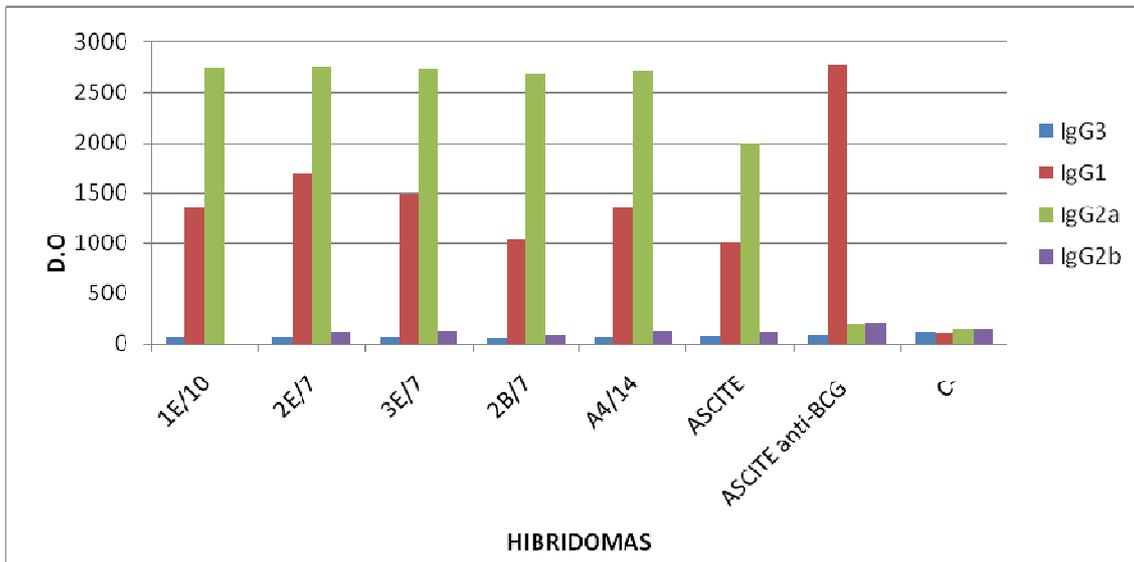


Figura 11: Determinação do Isótipo dos anticorpos monoclonais. O isótipo dos anticorpos monoclonais obtidos foi determinado por um teste de ELISA, seguido descrito anteriormente, no qual foram utilizados anticorpos secundários específicos para os diferentes isótipos de imunoglobulinas (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3).

5.11. Testes imunohistoquímicos para avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais

Com a finalidade de avaliar a capacidade dos anticorpos monoclonais produzidos no reconhecimento das micobactérias em material clínico (imunodeteção), foi realizado teste imunohistoquímico utilizando os cortes histológicos do intestino de gado bovino com tuberculose bovina, causado pelo *M. bovis*, e com a doença de Jones causada pela *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPTB).

Foi realizada a técnica de Ziehl-Neelsen para detectar o *M. bovis* nas lesões do intestino bovino diagnosticado para tuberculose (Figura 12 A) e de *M. paratuberculosis* - nas lesões associadas a paratuberculose (Figura 12B), demonstrando o nível de infecção nos cortes utilizados.

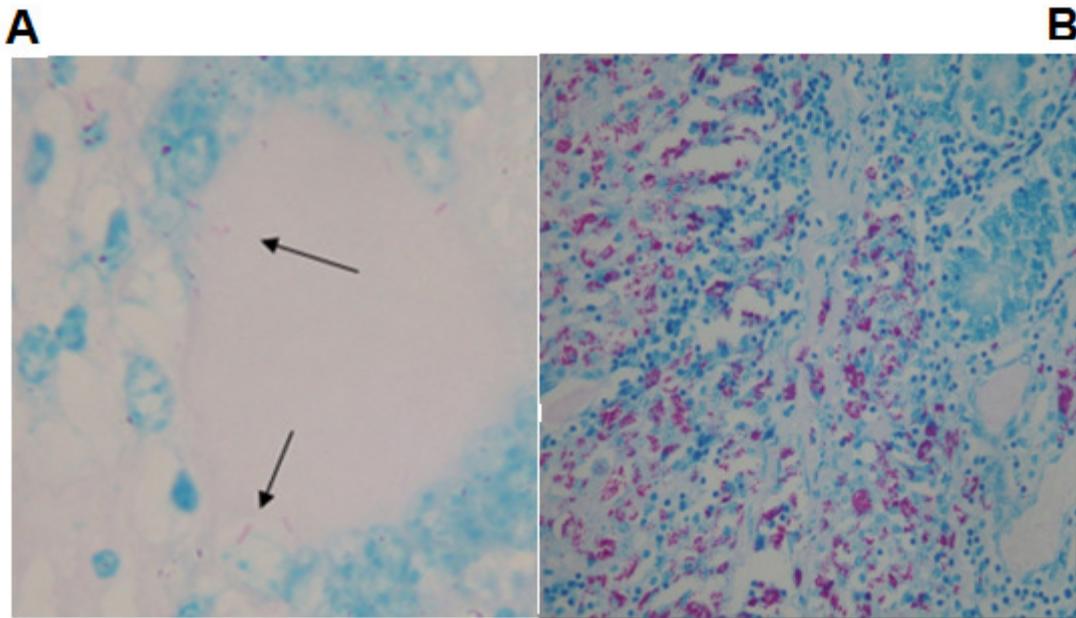


Figura 12 – Técnica de Ziehl-Neelsen para marcação das micobactérias BAAR+ na lesão do tecido bovino diagnosticado para tuberculose bovina (objetiva de 100X) (A) e para marcação das micobactérias na lesão do tecido bovino diagnosticado para paratuberculose bovina (objetiva de 40X) (B).

A presença paucibacilar de *M. bovis* e a abundância de MPTB são típicas para este tipo de lesão. No teste imunohistoquímico, como controle positivo foi utilizado o anticorpo policlonal de coelho anti Apa Mtb H37Rv (cedido do Colorado State University-USA) com uma diluição de 1:50 que demonstrou proporcionar uma eficiente marcação das micobactérias tanto para os tecidos de lesão bovina diagnosticados com tuberculose bovina (Figura 13A) quanto para os tecidos de lesão bovina diagnosticados para a paratuberculose bovina (Figura 13B). Também foi efetuado controle negativo para ambos tecidos bovinos diagnosticados para tuberculose bovina (Figura 14A) e paratuberculose bovina (Figura 14B) utilizando soro de camundongo não-imunizado.

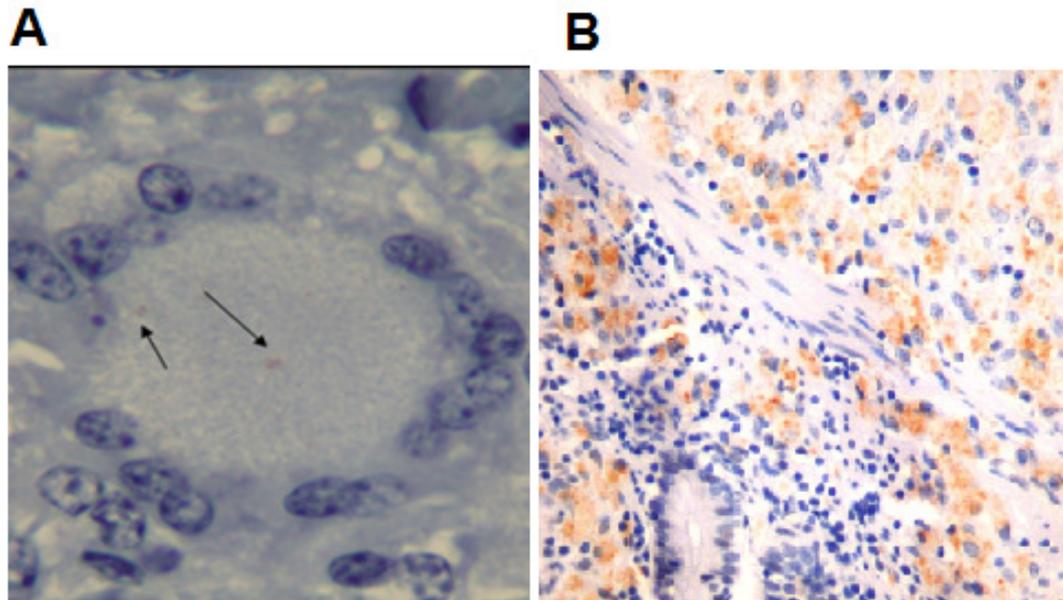


Figura 13 – Marcação de *M. bovis* na lesão tecidual bovina diagnosticada para tuberculose bovina utilizando anticorpo policlonal de coelho anti Apa Mtb H37Rv, objetiva de 100X (A) e marcação de *M. avium paratuberculosis ssp* na lesão tecidual bovina diagnosticada para paratuberculose bovina utilizando anticorpo policlonal de coelho anti Apa Mtb H37Rv, objetiva de 40X (B).

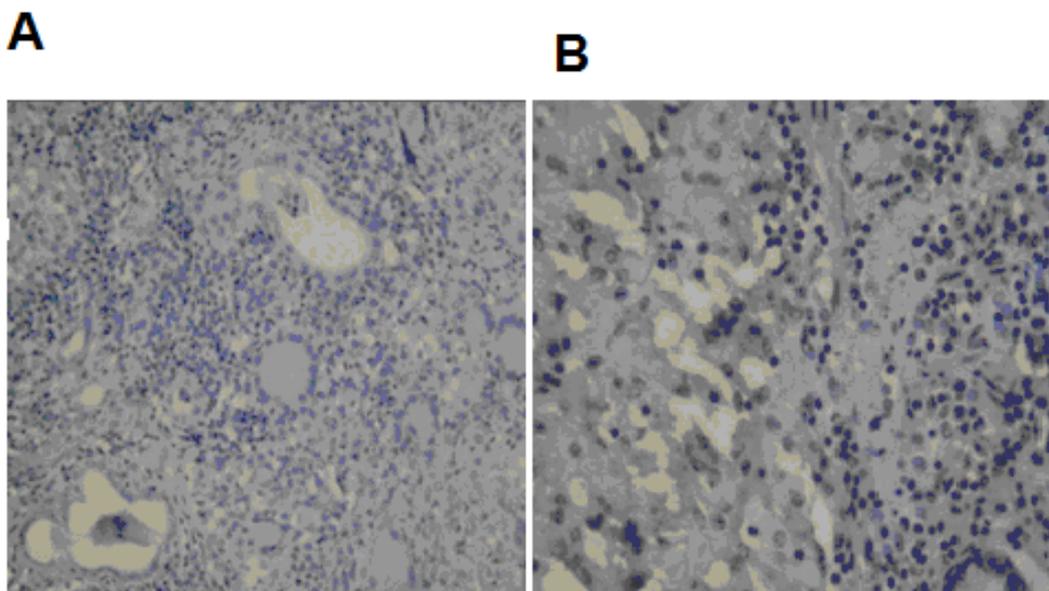


Figura 14 - Controle negativo para a lesão do tecido bovino diagnosticado para tuberculose bovina utilizando soro de camundongo não-imunizado (objetiva de 40X) (A); e controle negativo para a lesão do tecido bovino diagnosticado para paratuberculose bovina também utilizando o soro de um camundongo não-imunizado (objetiva de 40X) (B).

O anticorpo anti- Apa do sobrenadante do hibridoma A4/14 proporcionou uma marcação positiva (escassas e esparsas) nas lesões dos tecidos bovinos previamente diagnosticados para paratuberculose bovina (Figura 15), e foi negativa para a tuberculose bovina (dados não demonstrados). Apesar da marcação boa de algumas micobactérias, parece que nem todas foram marcadas, sendo que os cortes apresentam maior quantidade de micobactérias BAAR+ (Figura 12B).

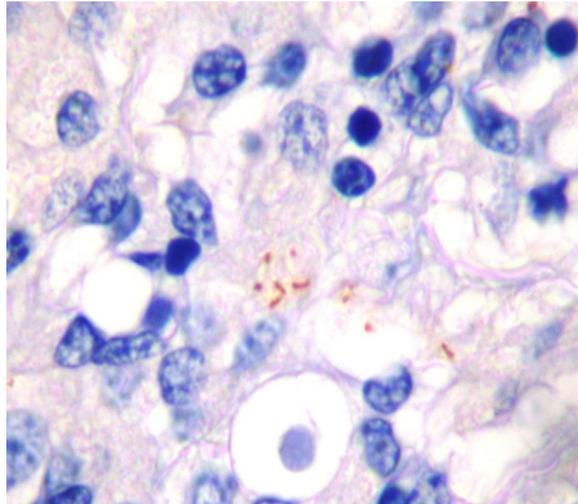


Figura 15: Marcação de *M. avium paratuberculosis* em macrófagos epitelióides de lesão intestinal do bovino diagnosticado para paratuberculose utilizando anticorpo monoclonal A4\14 (objetiva de 100 x).

Os anticorpos monoclonais obtidos anteriormente contra BCG, 3B/6/15 e 1A/1/13/6, também foram capazes de reconhecer *M. bovis* nos testes imunohistoquímicos (de Souza G., 2008), mas reconheceram também *M. avium* (dados não mostrados). Uma combinação dos Mabs anti-BCG e anti-Apa permitiria realizar um imunodiagnóstico diferencial.

5.12 - Avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais nos testes de microscopia de fluorescência

A capacidade dos anticorpos anti-Apa no reconhecimento das micobactérias intracelulares nas células infectadas foi investigada através da imunofluorescência. As células Raw 264.7, macrófagos murinos, foram previamente plaqueadas em placas de 24 poços (3×10^5 /ml) e infectadas por *M. avium* na proporção bactéria/macrófago 50:1. Após o tratamento com os anticorpos (anticorpo

proveniente do ascite do hibridoma 6F/9/3/2 e os Mabs provenientes dos sobrenadantes das culturas dos hibridomas 2E/7, 3E/7, 2B/7, 1E/10, 1A/4/14 e soro policlonal do camundongo imunizado com rApa) as lâminas foram observadas através de microscópio de fluorescência Zeiss e fotografadas utilizando o analisador de imagem Axion Vision.

O anticorpo proveniente do ascite do hibridoma 6F/9/3/2 e os Mabs provenientes dos sobrenadantes das culturas dos hibridomas 2E/7, 3E/7, 2B/7 foram testados nas lâminas com células Raw 264.7 infectados por *M. avium*, apresentando marcação intensa e bem ampla nos macrófagos infectados por *M. avium* (dados não mostrados).

Os resultados representativos da marcação das micobactérias pelos Mabs do híbrido 1A/4/14 podem ser observados na figura 16 A, enquanto a figura 16C apresenta os resultados da marcação pelos Mabs do híbrido 1E/10. As imagens na luz visível confirmam a marcação das micobactérias intracelulares mostrando reconhecimento semelhante por todos os anticorpos monoclonais testados (Figura 16 B,D,F e H).

Como controle negativo, foi utilizado tampão PBS no tratamento primário e como controle positivo, soro policlonal do camundongo imunizado com rApa (Figura 16G e Figura 16E).

Como pode ser observado o controle negativo não apresentou marcação e o controle positivo apresentou forte marcação, o que valida à execução do experimento.

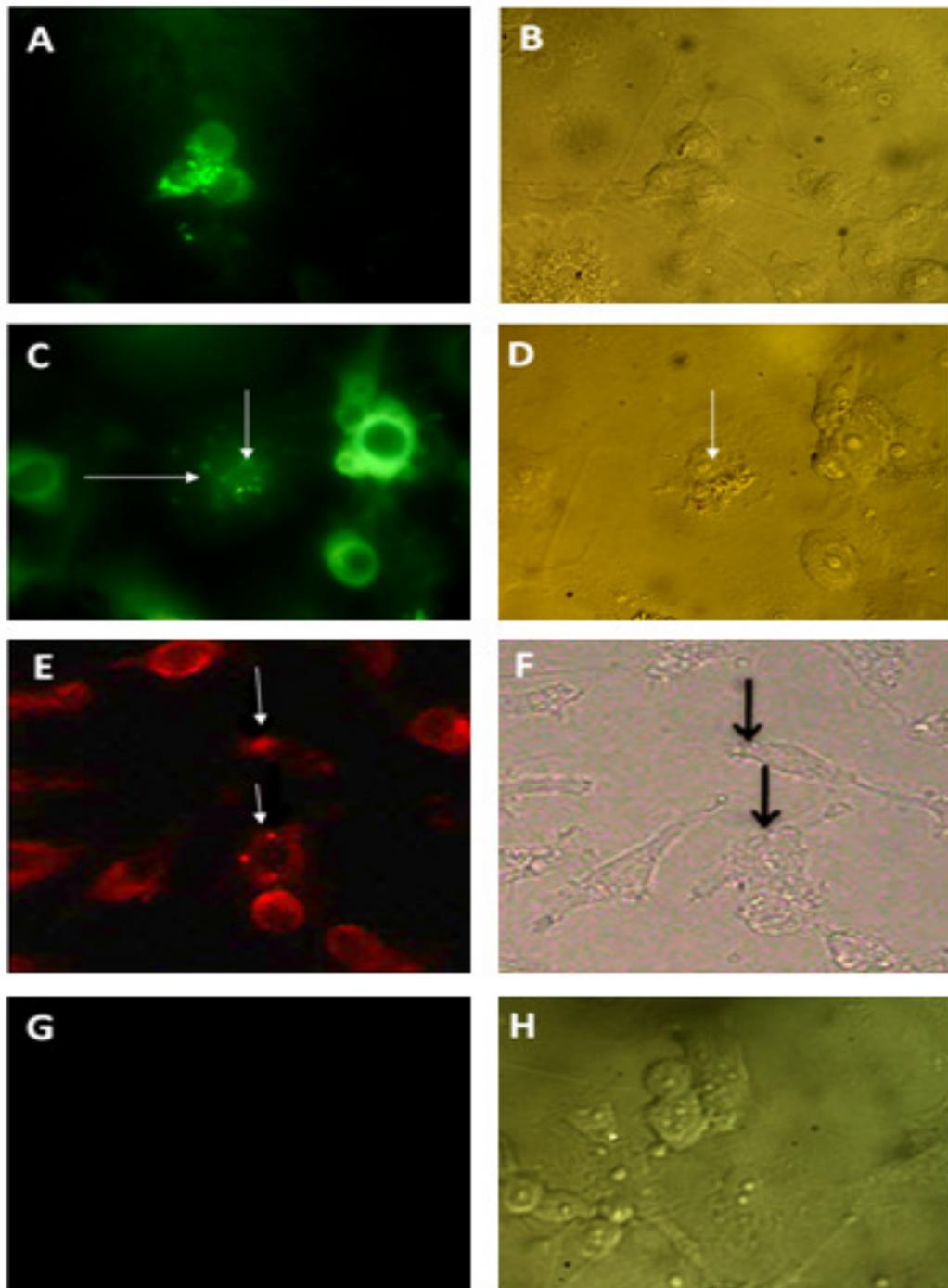


Figura 16: Análise da especificidade dos anticorpos monoclonais 1A/14, 1E/10 através da técnica de imunofluorescência. As células Raw 264.7 murinas infectadas com *M. avium* na proporção macrófago/bactéria 1:50 foram fixadas por paraformaldeído, permeabilizadas por Triton e então tratadas com anticorpo provenientes do hibridoma 1A/14 (1:1) em **A**; anticorpo provenientes do hibridoma 1E/10 (1:1) em **C**; em **E**, anticorpo do soro policlonal do camundongo imunizado com rApa (1:2000), em **G** solução de PBS foi utilizada no tratamento primário (controle negativo) . Posteriormente com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com FITC(A, C, G) (1:100) e o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo biotilado (1:1000) e 1 hora após utilizou-se a streptavidina conjugada a ficoeritrina (1: 100) (E), e correspondente na luz visível (B, D, F, H)

6. DISCUSSÃO

Uma das principais medidas para conter o avanço das infecções micobacterianas baseia-se no diagnóstico precoce. Devido à maior prevalência da tuberculose nos países em desenvolvimento, relativamente pobres, com recursos restritos para saúde pública, os testes para diagnóstico devem ser de preferência, baratos, rápidos, sem exigências de equipamentos e procedimentos sofisticados. Os testes imunológicos, baseados na ligação entre antígenos e anticorpos, estão largamente sendo utilizados devido à sua alta especificidade e baixo custo.

O objetivo deste trabalho foi a criação de ferramentas para imunodiagnóstico das doenças de importância para saúde pública como a tuberculose e a paratuberculose bovina, baseada na detecção e identificação dos antígenos micobacterianos em material clínico através da utilização de anticorpos monoclonais (Mabs). O objetivo específico importante foi a geração de um instrumento para o diagnóstico diferencial com a produção dos Mabs contra antígenos específicos para cada uma espécie de micobactéria, ou pelo menos, para famílias micobacterianas principais: *M. tuberculosis*, que inclui *M. bovis* (causadores de TB humana e bovina), e de *M. avium*, que inclui *M. avium* subsp. *avium* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, MPTB (causadora de paratuberculose bovina).

Neste trabalho, utilizamos para imunização dos camundongos um antígeno recombinante de MPTB, rApa, que nas diferentes espécies micobacterianas está expressado em isoformas diferentes. Todos os hibridomas específicos que foram gerados produziram Mabs capazes de reconhecer a proteína recombinante utilizada para imunização. Entretanto, em teste ELISA utilizado para screening dos Mabs específicos, o reconhecimento da proteína Apa nativa em lisado bruto de MPTB foi fraco, e não foi observada a ligação com Apa secretada em sobrenadante de cultura bacteriana.

Achamos que o resultado negativo pode ser devido à baixa concentração da proteína Apa no filtrado da cultura de micobactérias. Como foi descrito na literatura, o antígeno Apa (Antígeno alanina- prolina) representa menos de 2% do material liberado ou excretado durante o crescimento da *M. tuberculosis* ou *M. bovis* BCG em cultura e menos de 0,01% das proteínas presentes na bactéria (Arias-Bouda L. M. P. *et al.*, 2000). A fim de esclarecer o padrão do reconhecimento das proteínas nativas

Apa em diferentes materiais proveniente de micobactérias (micobactérias inteiras, lisado bruto de micobactéria -wcl, proteínas secretadas pelas micobactéria- CFP) utilizamos outros métodos imunológicos: *Western blotting*, imunohistoquímica e microscopia de fluorescência.

Com objetivo de obter alta concentração dos anticorpos, os Mabs foram produzidos no líquido ascítico em camundongos BALB/c injetados pelas células de hibridoma de interesse. O líquido ascítico coletado demonstrou conter alta concentração dos mAbs apresentando positividade no teste de ELISA numa diluição de até 5000 vezes.

Os dados do *Western Blotting* demonstraram que os anticorpos monoclonais, produzidos nos sobrenadantes das culturas dos hibridomas e na forma de ascite, reconhecem a proteína rApa- MPTB e MPTB -wcl como uma dupla das bandas de 50 e 60 kDa, e uma única banda de 50 kDa em *M.avium*- wcl. A diferença na expressão de Apa em *M. avium* e MPTB pode ser relacionada ao diferente nível de glicosilação da proteína obtida na etapa pós-transcricional, como foi demonstrado por Gioffre A et al, 2009 a partir do ensaio da ligação da Apa com a Concanavalina A.

Previamente, Horn et al. (1996) descreveu a cross-reatividade do antígeno Apa de *M.bovis* nos filtrado da cultura no complexo de *M.avium* e *M.tuberculosis*, utilizando anticorpos monoclonais. Este estudo mostrou que anticorpos monoclonais contra Apa de *M.bovis* apresentaram cross-reatividade com epítomos presentes na família de *M. avium*, especialmente, MPTB, mostrando um padrão de reconhecimento a em SDS-PAGE diferentes massas moleculares de 45/47 KDa no CFP de *M. bovis* e 50/60 KDa no CFP de MPTB.

O fato importante é que os nossos Mabs anti-Apa MPTB produzidos não reconhecem a proteína Apa de *M. tuberculosis*, demonstrando sua especificidade para bactérias de família *M. avium*. O soro policlonal anti- Apa MPTB do camundongo imune, diferente dos Mabs, reconheceu Apa Mtb H37Rv (proteína Apa purificada e lisado de Mtb) apresentando em *Western blotting* como a presença de duas bandas de 45 e 47 kDa. Este resultado demonstra que: 1) a proteína APA está expressada diferentemente em Mtb e *M. avium*, e 2) possuem epítomos homólogos e ortólogos nestas espécies, permitindo que anticorpos correspondentes reconheçam uma espécie ou ambas.

Diferente do esperado, nem os Mabs nem o soro policlonal produzido não reconheceram em *Western blotting* a proteína Apa secretada no sobrenadante de cultura bacteriana- CFP -*M. bovis* BCG e CFP- *M. avium*, repetindo os dados de ELISA, o que confirma baixa quantidade desta proteína no produto secretado. Entretanto, a imunodeteção da proteína secretada no material clínico pode apresentar interesse para o diagnóstico.

Na tentativa de detectar Apa secretada, realizamos isolamento da proteína na forma concentrada de CFP-*M. avium* e CFP-*M. bovis* – BCG através de imunoprecipitação, na qual foram utilizados anticorpos provenientes da ascite e anticorpo policlonal anti- Apa Mtb H37Rv de coelho. Os anticorpos monoclonais provenientes do líquido ascítico reconheceram e imunoprecipitaram o antígeno Apa do CFP de *M. avium* (50/60 KDa), confirmando baixa quantidade da proteína secretada, que pode ser concentrada e isolada através da ligação com anticorpos. O soro policlonal do camundongo imune, diferente dos Mabs exclusivamente específicos a Apa de *M. avium*, reconheceu também Apa do CFP –BCG, confirmando os dados anteriores sobre caráter de especificidade dos anticorpos produzidos.

Na caracterização isotípica dos anticorpos monoclonais demonstramos que todos os anticorpos monoclonais produzidos eram da classe IgG2a, sugerindo que a proteína Apa purificada, diferentemente da bactéria inteira, induziu durante a imunização a resposta imune celular, associada com alta nível de IFN-gamma (Abbas, 2005).

Para verificar a utilidade dos Mabs produzidos para imunodiagnóstico, foi estudada a capacidade destes na detecção das micobactérias nos cortes histológicos dos tecidos dos animais com paratuberculose e tuberculose bovina e nas culturas dos macrófagos infectados por *M. avium in vitro*. Nos testes de imunofluorescência indireta foi confirmada a marcação específica de bactérias inteiras (*M. avium*), em culturas celulares infectadas.

A técnica de imunohistoquímica confirmou a marcação das bactérias nos cortes do intestino bovino obtido dos animais diagnosticados com paratuberculose. Os Mabs anti-Apa MPTB foram capazes de reconhecer somente *M. avium*. Estudos feitos por Delgado F. *et al.*, 2009, utilizando a técnica da imunohistoquímica para a detecção de MPTB nos tecidos infectados de bovinos revelou que está serve para o diagnóstico de micobacteriose utilizando anticorpo policlonal, mas, não diferenciando as espécies de micobacterias. A obtenção de anticorpos monoclonais específico

para antígenos de MPTB seria uma ferramenta valiosa para o diagnóstico da paratuberculose bovina, o que foi demonstrado neste trabalho, já que os nossos anticorpos anti-Apa MPTB apresentaram um reconhecimento somente para MPTB e não *M. bovis*.

Anticorpos monoclonais obtidos contra BCG reconheceram ambas as espécies, *M. bovis* e *M. avium*, como foi demonstrando nos experimentos anteriores (de Souza, 2008). Estes dados demonstram a utilidade dos mAbs produzidos para o imunodiagnóstico diferencial da tuberculose e paratuberculose bovina. Ambas as doenças podem atingir o intestino do gado bovino, o diagnóstico *pós-mortem* através da imunohistoquímica, permite diferenciação da natureza da doença. Entretanto, ainda maior interesse surge o diagnóstico destas doenças nos animais vivos. Pretendemos continuar a pesquisa e aplicar os Mabs para imunodeteção de micobactérias ou Apa secretada em fezes do gado bovino infectado. Esta abordagem poderia ser útil devido á dificuldade do isolamento das coproculturas de *M. paratuberculosis* que apresenta um crescimento extremamente lento.

Nossos dados anteriores (da Souza G, 2007; Ventura,T.L.B., 2008) demonstraram que os Mabs produzidos anti-BCG foram capazes de reconhecer os antígenos de *M. tuberculosis* nos escarros BAAR+ dos pacientes com tuberculose (utilizando método dot-blotting dos escarros). Pretendemos verificar a utilização dos Mabs (anti-BCG e anti-Apa MPTB) capazes de diferenciar *M. tuberculosis* e *M. avium*, para imunodeteção específica destas duas espécies nos escarros dos pacientes com tuberculose ou infecção provocada por *M. avium*.

O antígeno Apa é um antígeno imunodominante presente durante a infecção progressiva por *M.tuberculosis* ou imunização por BCG. Estudos vêm indicando o antígeno Apa como promissor para o imunodiagnóstico, uma vez que no filtrado do sobrenadante da cultura bacteriana esta proteína encontra-se glicosilada, possuindo além de uma parte molecular principal, pequenos epítomos diferentes a ela agregados e ortólogos dentre as espécies micobacterianas nas quais estão presentes, refletindo em instrumento útil para o diagnóstico das diferentes micobactérias (Chanteau S., 2000; Horn C., 1996).

Foi demonstrado que o soro de camundongo hiperimune da proteína Apa recombinante reconhece fortemente esta proteína no sobrenadante do filtrado de cultura de *M. avium* e *M. bovis* BCG, na qual foi observada duas bandas 50/60 KDa e 45/47 KDa, respectivamente (Gioffré A. *et al.*, 2009), estando de acordo com os

nossos dados. Estes dados demonstram que ambas abordagens podem ser aplicadas para imunodiagnóstico da paratuberculose: detecção dos anticorpos específicos no soro dos animais infectados (sorodiagnóstico) e detecção de bactéria ou seu antígeno no material clínico (imunodeteção). A segunda abordagem (deteção do antígeno) poderia ser mais útil pois apresenta o resultado positivo somente em caso da doença ativa, deste que a positividade do soro pode corresponder ao contato prévio com MPTB ou *M. avium*, ou qualquer outra micobactéria, sendo que o soro policlonal não é muito específico para espécies distintas de micobactéria.

Em conclusão, os anticorpos monoclonais anti-Apa de MPTB produzidos e caracterizados neste trabalho foram capazes de diferenciar o antígeno Apa nas bactérias dos complexos de *M. tuberculosis* e *M. avium* e podem ser utilizados para o imunodiagnóstico das infecções provocadas pelo *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e para diferenciação da forma intestinal da tuberculose bovina e paratuberculose.

7. CONCLUSÃO

- Foram produzidos 6 hibridomas estáveis, devidamente preservados, que produzem anticorpos monoclonais capazes de reconhecer especificamente antígeno Apa (50 /60 kDa) de *M. avium paratuberculosis* (MPTB) e *M. avium* (Mav) e não Apa de *M. bovis* ou *M. tuberculosis*;
- Os anticorpos monoclonais produzidos em sobrenadantes de cultura dos hibridomas e na forma de ascite reconhecem (em ELISA, Western blotting) a proteína APA recombinante de MPTB, a proteína Apa no lisado bruto (WCL) de MPTB e *M.avium*; a proteína secretada no sobrenadante de cultura (CFP) de MPTB e *M.avium*, demonstrando sua utilidade no reconhecimento da proteína na sua forma nativa;
- Os anticorpos monoclonais produzidos reconhecem especificamente bacilos íntegros *M.avium* (imunofluorescência) fagocitados por macrófagos como resultado da infecção experimental *in vitro*, demonstrando ser promissor para imunodeteção destas micobactérias em material clínico ou ambiental;
- Os anticorpos monoclonais produzidos reconhecem especificamente bacilos íntegros MPTB e não *M. bovis* nos cortes histológicos das lesões intestinais do gado bovino com paratuberculose (imunohistoquímica), demonstrando sua utilidade para imunodiagnóstico desta doença e sua diferenciação com forma intestinal da Tuberculose bovina provocada por *M. bovis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN THORACIC SOCIETY., 2001. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adult and children. American Thoracic Society Guidelines, New York.
- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., 2005. Imunologia Celular e Molecular. 5ª edição. Editora Elsevier.
- ABRAHÃO, R.M.C.M., 2005. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. Archives of Veterinary Science 10: 1-17.
- ANSELL P. R., 2000. Hybridoma technology: a view from the patent arena. Immunol Today 2000; 21:357-358.
- ARIAS-BOUDA L. M. P.; NGUYEN L. N.; HO L. M.; SJOUKJE KUIJPER L. M.; JANSEN H. M.; KOLK A. H., 2000. Development of Antigen Detection Assay for Diagnosis of Tuberculosis Using Sputum Samples. J. Clin. Microbiol. v. 38, p. 2278–2283
- BAKSHI C. S.; SHAH D. H.; VERMA R.; SINGH R. K.; MALIK M., 2005. Rapid differentiation of Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. Veterinary Microbiology 109: 211–216.
- BARRERA, L., 2007. The basic of clinical bacteriology. In: Palomino, J.C, leão, S.C, Ritacco, V, editors. Tuberculosis 2007 – From basic science to patient care: www.tuberculosis-textbook.com; p.93-112.
- BEIGE, J., LOCKIES, T., 1995. Schalberg et al., Clinical evaluation of a Mycobacterium tuberculosis PCR assay. J. Clin. Microbiol. 33, pp. 90–95.
- BOEHME, C., MOLOKOVA, E., MINJA, F., GEIS, S., LOSCHER, T., MABOKO, L., KOULCHIN, V., HOELSCHER M., 2005. Detection of mycobacterial lipoarabinomannan with an antigen-capture ELISA in unprocessed urine of

Tanzanian patients with suspected tuberculosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99: 893—900

BRASIL. Secretaria Executiva. Departamento de Informática do SUS., 2004. Taxa de Incidência de Tuberculose em crianças de 3 a 15 anos, no estado de PE, em Brasília, DF, 2006a.

BRENNAN, P.J., NIKAIIDO, H., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29–63.

CAMBIASO, CL., VANVOOREN, J.P., FARBER, C.M., 1995. Immunological detection of mycobacterial Antigen in infected fluids, cells and tissues by latex agglutination. *J. Immunol. Methods* 33: 2516–2518.

CARTER, G. R., 1988. *Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária*. São Paulo: Roca, p 249.

CDC. *Questions and Answers About TB.*, 2005. Department of Health and Human Services, CDC, United States.

CHIODINI, R.J., VAN KRUIJNINGEN H.J., MERKAL, R.S., 1984. Ruimant paratuberculosis (Jhone's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet*, 74: 218-262.

COELHO, A. C., PINTO, M. L., COELHO, A. M., RODRIGUES J., 2008. Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de paratuberculose ovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 60: p.1097-1102.

COSMA, C.L., SHERMAN, D.R., RAMAKRISHNAN, L., 2003. The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria. *Annual Review Microbiology*, 57:641-676.

DAVIDSON R. S.; MARION G.; WHITE P. C. L.; HUTCHINGS M. R., 2008. Use of host population reduction to control wildlife infection: rabbits and paratuberculosis. *Epidemiol. Infect.*, p. 1- 8.

DELGADO F.; ETCHECHOURY D.; GIOFFRE´ A.; PAOLICCHI F.; BLANCO VIERA F.; MUNDO S., ROMANO M.I.; 2009. Comparison between two in situ methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in tissue samples from infected cattle

DEVINDER K.; STEFAN B.; PREMKUMAR D.; BRIGITTE G.; DELPHI C.; MICHAEL R. M.; VARALAKSHMI D. V.; DEAN C. C.; MARY J.; PATRICK J. B., 2006. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan: Role of a branching mannosyltransferase.

DINNES J.; DEEKS J; KUNST H.; GIBSON A., CUMMINS E., WAUGH N., 2007. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess*, 11(3).

DOHERTY T. M.; ANDERSEN P., 2005. Vaccines for Tuberculosis: Novel Concepts and Recent Progress. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), p. 687-702.

DUCATI R.G; RUFFINO-NETTO A; BASSO LA; SANTOS DS; 2006. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101(7): 697-714.

FERREIRA, P.S., 2005. Prevalência da Tuberculose em bovinos abatidos nas regiões Norte e Noroeste Fluminense- RJ, p 30. Monografia defendida no Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF.

FERREIRA, R., FONSECA, L., LILENBAUN, W., 2001. Detecção de anticorpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do Rio de Janeiro. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, 23(4): 166-171.

FRATAZZI C.; ARBEIT R.D.; CARINI C.; REMOLD H.G., 1997. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* Serovar-4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *The Journal of Immunology*, 158: 4320-4327.

FRIEDEN T.R.; STERLING T.R.; MUNSIFF S.S.; WATT C.J.; DYE C., 2003 Tuberculosis. *The Lancet*, v.362, p.887-899.

GIMENO, E.J., 1995. Fundamentos da Imunohistoquímica aplicada a Patologia Veterinária. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Anais, Belo Horizonte. UFMG/ CBPA, p. 17- 51.

GIOFFRE´,A., ECHEVERRI´A-VALENCIA, G., ARESE , A. , MORSELLA , C., GARBACCIO , S. , DELGADO , F., ZUMA´RRAGA , M., PAOLICCHI , F., CATALDI , A., ROMANO, M.I., 2009. Characterization of the Apa antigen from *M. avium* subsp. paratuberculosis: A conserved Mycobacterium antigen that elicits a strong humoral response in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 255:150 – 165.

GODING, J.W., 1986. Monoclonal antibodies: Principles and Practice. *Academic Press, San Diego*.

HADDAD N.; MASSELOT M.; DURAND B., 2004. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Veterinary Science* 76: 1–18

HARRIS, N.B., BARLETTA, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp Paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clinical microbiology Review*, 14(6):489-512.

HERMON-TAYLOR, J., TIZARD, M., MALIK Z., SANDERSON, J., 1990. Molecular biology of Crohn's disease micobactéria. *Bailliere's Gastroenterology*, 4:23-42.

HORN, C.; PESCHER, P.; ROMAIN, F.; MARCHAL G., 1996. Characterization of murine monoclonal antibodies specific for the 45/47 kDa antigen complex (APA) of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* and BCG. *Journal of Immunological Methods* 197: 151- 159.

HUTCHINSON, L.J., 1996. Economic impact of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 12: 373-381.

KANTOR, I.N., RITACCO, V., 1994. Bovine tuberculosis in latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Veterinary Microbiology*, 40: 5-14.

KAUFMANN, S.H.E., 2005. Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med*; 353(23):2423-26.

KAUFMANN, S. H. E., ANDERSEN, P., 1996. Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *Chem Immunol. Basel, Karger*, 70:20-59.

KÖRMENDY B., KOPÁL T., BÁLINT T., SZILÁGYI M., BÉKI L., 1989. Economic losses caused by paratuberculosis in a dairy herd: case report. *Acta Vet. Hung*, 37:45-53.

KREEGER, J.M., 1991. Ruminant paratuberculosis – a century of progress and frustrationest . *J. Vet Diagn. Inv*, 3: 373-383.

JONES, T.C., HUNT, R.D., KING, N.W., 1997 *Veterinary pathology: Diseases caused by *M.tuberculosis* complex*. World health organization, 2°ed., 23p.

LAQUEYRERIE A, MILITZER P, ROMAIN F, EIGLMEIER K, COLE S, MARCHAL G., 1995 Cloning, sequencing and expression of the *apa* gene coding for the *M tuberculosis* 45/47 kilodalton secreted Ag complex. *Infect Immun*, 4003–4010.

LARANJA DA FONSECA, L.F., OLIVAL, A.A., PEREIRA, C.C., HEINEMANN, M.B., RICHTZENHAIN, L.J., SANTOS, M.V., 2000. Identificação de anticorpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, 28(1): 51-60.

LILENBAUM, W., 2000. Estudo comparativo a campo de novos métodos de diagnósticos da tuberculose bovina. Instituto de microbiologia, p 86.

LILENBAUM, W.; MARASSI C. D.; OELEMANN W. M. R., 2007. Paratuberculosis: An update. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 580-590.

LOUNIS, N. *et al.*, 2001. Iron and Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Clin. Virol*, 20: 123- 126.

LOSINGER W.C. 2006. Economic impacts of reduced milk production associated with epidemiological risk factors for Johne's disease on dairy operations in the USA. *J. Dairy Res*, 73:33-43.

MANUAL MERCK DE VETERINÁRIA., 1997. Um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 7. Ed. São Paulo: Roca, c.p. 483-485.

MILSTEIN, C., 1988. Monoclonal antibodies. *Sc. Amer.*, 243: 56.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006. Doenças infecciosas e parasitárias – Guia de bolso. Brasília, DF, 6ªed.

MURRAY P. R. *et al.*, 2000. *Microbiologia Médica*. 3ª edição. Guanabara Koogan. Cap. 40: 266-269.

MATTHIAS, D., 1998 Infecções por Micobactérias. In: Beer, J. Doenças infecciosas em animais domésticos. 1º ed. São Paulo: Roca, p. 261- 289.

NIELSEN S. S., TOFT N., 2008. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, p. 1-19.

NORTH R.J., JUNG Y.J., 2004. Immunity to Tuberculosis. *Annual Review Immunology*, 22: 599-623.

OI, V. T., HERZENBERG, L.A., 1980. Immunoglobulin- producing hybrid cell lines. In selected Methods Immunology, 351-372.

PAOLICCHI, F.A., VAGNOZZI, A., MORSELLA, C.G., 2001. Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus*): an Immunohistochemical Study. J.Vet. Med, 48:315-320.

PAOLICCHI, F.A.; ZUMARRAGA, M.J.; GIOFREE, A.; ZAMORANO, P.; MORSELLA, C.; VERNA, A.; CATALDI, A.; ALITO, A.; ROMANO, M., 2003. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. Journal Medicine Veterinary, 50: p.20-26.

PESSANHA, L.C.D., 2003. Monografia de Conclusão do curso de Licenciatura. "Tuberculose – velha doença ataca de novo. Novas estratégias na prevenção da doença". Monografia defendida no Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF.

PIETERS J. ,2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. Microbes and Infection, 3: 3249-255.

PINTO, P.S.A., 2003. Atualização em controle da tuberculose no contexto da inspeção de carnes. Bioscience Journal, Uberlândia, 19: 115- 121.

RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., MENDEZ, M.C., LEMOS, R.A.A., 2001. Doenças dos ruminantes e equinos. 2 ed. São Paulo, 1: 351-362.

RISTOW, P. C. L. V. B.; MARASSI, C. D.; RODRIGUES, A. B. F.; CARVALHO, E. C. Q.; FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; LILENBAUM, W., 2007. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil.. The Veterinary Journal, v. 174, p. 432-434.

RIVERA, F.E.B., 1996. Levantamento sorológico utilizando-se a técnica de ELISA em rebanhos apresentando problemas reprodutivos. Enterite paratuberculose. Campo Grande, MS, p.20-22.

- ROXO, E., 2007. *M.bovis* como causa de zoonose: Revisão. *M.bovis as zoonosis: review*. Revista de Ciências Farmacêuticas, São Paulo. 18: p101-118.
- ROXO, E., 1998. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. Revista de Ciências Farmacêuticas, 18: p.101-108.
- RUGGIERO, A.P., IKUNO, A.A., FERREIRA, V.C.A., ROXO,E., 2007. Tuberculose bovina : Alternativas para o diagnóstico. Arq. Inst. Biol, São Paulo, 74: p.55-65
- RYAN K. J.; RAY C. G., 2004. *Sherris Medical Microbiology*,McGraw Hill. 4ª edição.
- SHARMA S. K.; MOHAN A., 2004. Multidrug-resistant tuberculosis. Indian Journal of Medical Research, v.120, p.354-376.
- STEHMAN, S.M., SHULAW, W.P., 1996. Paratuberculosis (Johne's disease) in sheep and goats: Recommendations for diagnosis and control. United States Animal Health Association Committee on Sheep and Goats.
- SOUZA, A.V., SOUZA, C.F.A., SOUZA, R.M., RIBEIRO, R.M.P., OLIVEIRA, A.L. 1999. A importância da tuberculose bovina como zoonose. Higiene alimentar, 13(59): 22-27.
- DA SILVA W. D.; MOTA I., 2003. *Bier Imunologia Básica Aplicada*. Guanabara Koogan, 5ª edição, 68:97.
- DE SOUZA G. S., 2007. Desenvolvimento de processos biotecnológicos para imunodiagnóstico de cepas micobacterianas. Monografia defendida no Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF.
- TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E., 2007. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* , Brasília, v. 33, p. 323-334.

TESSEMA, T.A., HAMASUR, B., BJUN, G., SVENSON,S., BJORVATN B., 2001. Diagnostic evaluation of urinary lipoarabinomannan at an Ethiopian tuberculosis centre. *Scand J Infect Dis*.33:279-84.

THORONSEN, O.F., FALK, K., 1994. Comparison of immunohistochemistry, acid – fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J. Vet. Diagn*, 6: 195-199.

TORTOLI E., 2006. The new mycobacteria: an update. Regional Reference Centre for Mycobacteria, *FEMS Immunol Med Microbiol* 48:159–178.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N., 1999. *Microbiologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 586p.

VENTURA,T.L.B.,2008.Produção de anticorpos monoclonais para o imunodiagnóstico de infecções provocadas por micobactérias. Monografia defendida no Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF.

YOUNG, L. S., C. B. INDERLIED, O. G. BERLIN, AND M. S. GOTTLIEB. 1986. Mycobacterial infection in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rev. Infect. Dis*. 8:1024–33.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO report 2007. World Health Organization, Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO report 2007. World Health Organization, Geneva.

WRAIGHT, M. D. ; MCNEIL, J.; BEGGS, D. S.; GREENALL, R. K.; HUMPHRIS, T. B.; IRWIN, R.. J.; JAGOE, S.P; JEMMESON, A.; MORGAN, W. F.; BRIGHTLING, P.; ANDERSON, G. A.; MANSELL, P. D., 2000. Compliance of Vitorian dairy farmers with current calf fearling recommendations of control of Johne’s disease. *Veterinary Microbiology*. 77: 429-442.

WU, T.T., KABAT, E.A., 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J. Exp. Med, 132: 211- 250.

Sites:

- <http://www.cve.saude.sp.gov.br/>, acessado em 22 de maio de 2009.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose –PNCEBT. www.agricultura.gov.br. Acessado em 01 de janeiro de 2010.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)