

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-MPT64
DE *Mycobacterium tuberculosis* E SEU USO PARA COMPOR
O KIT ELISA PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
INFECÇÕES por *M. avium* e *M.tuberculosis*

NAYARA VIGNERON DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

MARÇO – 2021

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-MPT64
DE *Mycobacterium tuberculosis* E SEU USO PARA COMPOR
O KIT ELISA PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
INFECÇÕES por *M. avium* e *M.tuberculosis*

NAYARA VIGNERON DE OLIVEIRA

Orientador(a): Elena Lassounskaia

Co-orientador(a): Giliane da Silva de Souza Cabral
Laboratório de Biologia do Reconhecer

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

MARÇO – 2021

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-MPT64 DE
Mycobacterium tuberculosis E SEU USO PARA COMPOR O KIT ELISA PARA
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE INFECÇÕES por *M. avium* e *M. tuberculosis*

NAYARA VIGNERON DE OLIVEIRA

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

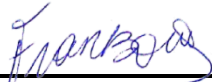
Comissão examinadora:



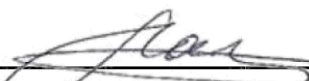
Antônio Jesus Dorighetto Cogo- UENF
Doutor em Biociências e Biotecnologia



Débora Mothé de Campos Mesquita – UENF
Doutora em Biociência e Biotecnologia – UENF

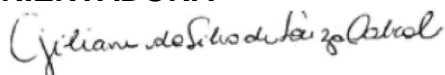


Franz Viana Borges – IFF
Doutor em Ciência Naturais



Elena Lassounskaia – UENF
Doutora em Ciência Médias - Ênfase: Imunologia/Alergologia – Rússia

ORIENTADORA



Giliane de Souza da Silva Cabral – UENF
Doutora em Biociências e Biotecnologia

CO-ORIENTADORA

Dedicatória

Aos meus familiares e amigos que acreditaram no meu potencial e estiveram ao meu lado em cada momento para que esta etapa pudesse ser concluída.

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço a todos de coração.

À Deus, em sua infinita sabedoria, agradeço por ter me guiado e amparado nas minhas escolhas. Por me permitir chegar até aqui, sendo luz nos momentos mais difíceis me ajudando a enfrentar todas as barreiras e acreditar que era capaz de ultrapassá-las.

Agradeço ao meu pai - Rômulo Alves de Oliveira, a minha mãe - Patrícia Vigneron Araújo, meu irmão - Pedro Henrique Vigneron de Oliveira e minha sobrinha/afilhada - Yasmin Farias Vigneron, que são o meu alicerce. Sou grata por sempre me incentivarem nos caminhos escolhidos e nunca me deixarem desistir nas dificuldades e me ensinando que a humildade é a base de toda conquista e todos os meus familiares que estiveram sempre ao meu lado.

A Doutora Elena Lassounskaia, minha orientadora, agradeço por ter acreditado no meu potencial me dando a oportunidade de crescer profissionalmente, mesmo fora da minha zona de conforto e por todo ensinamento compartilhado.

A Doutora Giliane de Souza da Silva Cabral, minha orientadora, que desde o início esteve ao meu lado, me ensinando e sendo minha mentora. Obrigada pela paciência, pelas chamadas e por contribuir de forma muito engrandecedora em minha carreira científica e profissional, sou realmente muito grata.

Aos colegas do Laboratório Biologia do Reconhecer (LBR): Fabrício, Fernando, Núbia, Rita, Vinícius, Camila, Guilherme, Ana Clara, Thatiana, Verônica, Sanderson, por serem tão atenciosos comigo e sempre dispostos a ajudar quando precisei. A Jucélia (LQFPP), pela paciência para ensinar o passo a passo e estar sempre presente e disposta a ajudar. Agradeço a todos os funcionários da UENF

que durante um experimento e outro, tornavam dias nublados em dias mais alegres pelos corredores e horários de almoço.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, tornando a trajetória mais leve e fácil de seguir. Em especial, os amigos que formei na UENF, agradeço a Letícia Cespom (desde o início sempre esteve comigo e foi minha guia para hoje poder estar concluindo essa etapa da minha vida), Brunna Xavier, Fernanda Soares, Enrico Cossi, Sávio Bastos, Igor Santiago, Nina Aguiar, Bárbara Barcelos, Milena Farias e Anderson Cardoso por serem tão presentes, solícitos, aconselhando, ensinando, ajudando em todos os momentos que precisei. Sou eternamente grata por terem vocês nessa trajetória comigo.

Aos professores e mentores da UENF, que tive a oportunidade de ser aluna e aprender amplamente sobre diversos assuntos, agradeço ao Prof. Arnoldo, Prof.(a) Anna, Prof. João, Prof. Eulógio, Prof. Milton, Prof.(a)Elena, Prof. Edésio, Prof. Clóvis, Prof. Renato, Prof. (a) Andrea, Prof(a) Alba. Muito obrigada!

Em especial, Luciana dos Santos Barros Manhães, minha dupla desde o início do Mestrado. Começamos juntas e desde então, passamos por cada barreira dessa forma. Sou grata por Deus ter nos colocado uma no caminho da outra, por estar ao meu lado em todos os experimentos, por quebrar a cabeça comigo e sempre disposta a ajudar. Por acreditar no meu potencial e incentivar todos os dias, por todos os conselhos, pela companhia nos açaís e nos almoços e, principalmente por vibrar as pequenas conquistas e confiar a mim a suas também. Sou muito grata por nossa amizade e companheirismo, por você ter tornado esses dois anos animado, leve e memorável. Obrigada, por tudo!

A instituição UENF, pela oportunidade de poder conhecer tantos mestres maravilhosos e por aprender com cada um deles assuntos que contribuíram para meu engrandecimento na vida profissional, acadêmica e científica.

Aos professores Antônio Cogo, Débora Mothé e Franz Borges, sou grata por aceitarem o convite para minha banca, contribuindo com seu conhecimento.

A FAPERJ/UENF, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A tuberculose (TB) continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública na maioria dos países em desenvolvimento. Além disso, as infecções causadas por micobactérias não tuberculosas (MNT) apresentam um crescimento em vários países e, também podem causar doença similar a TB. Dentre as espécies de MNT, as bactérias do complexo *Mycobacterium avium* (MAC) são mais prevalentes, e a infecção pulmonar é a forma de apresentação mais comum, mas também pode ocorrer infecção disseminada. O diagnóstico diferencial dessas infecções e a TB é essencial, já que os fármacos indicados para o tratamento da TB e MNT são diferentes. Este trabalho aponta a produção de anticorpos monoclonais como ferramenta para diferenciação das micobactérias para compor um kit imunológico indicado para diagnóstico diferencial entre as infecções de TB e MNT. O antígeno MPT64 foi escolhido como alvo de detecção de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), pois é uma proteína que é secretada apenas pelas bactérias do complexo MTB. Foram produzidos hibridomas através da fusão de células de mieloma com os esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/C imunizados com a proteína recombinante MPT64 MTB. Hibridomas específicos foram selecionados e subclonados, resultando em um hibridoma estável. Os anticorpos monoclonais foram avaliados quanto ao reconhecimento desse antígeno em sobrenadantes de culturas micobacterianas, incluindo bactérias do complexo MTB (cepas H37Rv e M299) e micobactérias não tuberculosas tais como: cepas *M. kansasii*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, por ELISA, Western blotting e por cromatografia de afinidade. Os resultados demonstram que os anticorpos monoclonais anti-MPT64 reconheceram especificamente a proteína MPT64 numa isoforma de 24 kDa somente no sobrenadante de culturas das cepas Mtb e não em culturas das MNT. Utilizando a cromatografia de afinidade, o antígeno MPT64 foi isolado apenas em sobrenadantes de cultura de cepas Mtb corroborando com os resultados do ELISA e Western blotting. Esses resultados sugerem que os novos anticorpos anti-MPT64 podem ser utilizados para discriminar entre MTB e MNT em culturas de micobactérias.

Palavras chaves: Anticorpos monoclonais, antígeno MPT64, tuberculose, infecção por *M. avium*, diagnóstico diferencial.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains one of the greatest public health problems in most of the developing countries. In addition, incidence of infections caused by non-tuberculous mycobacteria (MNT), which also can cause TB-like illness, is growing. Among the MNT species, bacteria of the *Mycobacterium avium* complex (MAC) are more prevalent, and pulmonary infection is the most common form of presentation, but disseminated infections can also occur. The differential diagnosis of these infections and TB is essential, as different drugs are indicated for the treatment of TB and NTM diseases. This work was aimed on production of monoclonal antibodies as an appropriate tool for the differentiation of mycobacterial clinical isolates to compose new immunodiagnostic kit for differentiation between TB and MNT infections. The MPT64 antigen was chosen as a detection target, because it is a protein that is secreted by pathogens of the Mtb complex and not by MNT. Hybridomas were produced by fusing myeloma cells with splenocytes obtained from the mice immunized with recombinant protein MPT64 MTB. Specific hybridomas were selected and subcloned, resulting in stable hybridomas. Monoclonal antibodies were collected from supernatants of the hybridoma cultures or from ascitic liquid obtained from mice that were inoculated with the hybridoma cells. To test the specificities of these The ability of antibodies to specifically bind the recombinant MPT64 protein was tested by in ELISA and Western Blotting. The antibodies were able to recognize MPT64 protein as a 24kDa band in samples of the Mtb culture supernatants but not in those of *M.avium* cultures. Using anti-MPT64 monoclonal antibody for affinity chromatography, the protein was isolated from supernatants of the Mtb cultures, but from those of MNT cultures, corroborating the results of ELISA and Western blotting. These results suggest that the new anti-MPT64 antibodies can be used to discriminate between Mtb and MNT in mycobacterial cultures.

Keywords: monoclonal antibodies, MPT64, tuberculosis, M. avium infection, differential diagnosis

INDICE FIGURAS

Figura 1: Caracterização da ação dos anticorpos policlonais e monoclonais.....	37
Figura 2: Titulação dos anticorpos anti-MPT64 nos soros dos camundongos imunizados pelo antígeno rMPT64 – MTB.....	39
Figura 3: Detecção da proteína MPT64 em sobrenadante de cultura de micobactérias por <i>Western blotting</i>	40
Figura 4: Perfis cromatográficos dos sobrenadantes de culturas de cepas <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e M299 (A) e cepas de micobactérias não tuberculosas (B).....	41
Figura 5: Nova titulação dos camundongos imunizados com antígeno rMPT64.....	42

INDICE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Tratamento das micobactérias não tuberculosas (MNT).....	21
Tabela 2: Rendimento da primeira/segunda/terceira subclonagem dos hibridomas específicos para rMPT64 –MTB.....	38
Quadro 1: Esquema básico de tratamento da TB no Brasil.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR – bacilos álcool-ácidos resistentes

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

HGPRT – Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

MAA- *Mycobacterium avium* subespécie *avium*

Mab – Anticorpos monoclonais

MAC – Complexo de *Mycobacterium avium*

MAP - *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*

MAS - *Mycobacterium avium* subespécie *silvaticum*

MNT – Micobactéria não tuberculosa

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*

PBS – salina fosfatada tamponada

PBST – salina fosfatada tamponada tween 20

PEG – Polietilenoglicol

PRA - PCR restriction-enzyme analysis

TB – Tuberculose

UBS - Unidade Básica de Saúde

Sumário

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	iv
INDICE FIGURAS	V
INDICE TABELAS E QUADROS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>O gênero Mycobacterium.....</i>	<i>15</i>
1.2 – <i>Complexo Mycobacterium tuberculosis e Micobactérias não tuberculosas.....</i>	<i>16</i>
1.3 <i>Tuberculose e Infecções por micobactérias não tuberculosas.....</i>	<i>17</i>
1.4- <i>Tratamentos da Tuberculose e de infecções não tuberculosas no Brasil.....</i>	<i>19</i>
1.5- <i>Métodos de diagnóstico de infecções micobacterianas.....</i>	<i>21</i>
1.6 - <i>Produção de anticorpos monoclonais e a Tecnologia de hibridoma</i>	<i>26</i>
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 – <i>Objetivo geral:.....</i>	<i>29</i>
3.2- <i>Objetivos específicos:.....</i>	<i>29</i>
4. METODOLOGIA	30
4.1. <i>Animais.....</i>	<i>30</i>
4.2 <i>Cultura de mieloma murino A2.....</i>	<i>30</i>
4.3 <i>Obtenção dos macrófagos peritoneais murinos indicados para formar a camada nutritiva (feeder layer)</i>	<i>30</i>
4.4. <i>Imunização e produção de hibridomas anti- rMPT64 MTB.....</i>	<i>31</i>
4.5. <i>Seleção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra o antígeno MPT64, utilizando Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA).....</i>	<i>32</i>
4.6 <i>Clonagem dos hibridomas.....</i>	<i>33</i>
4.7. <i>Produção de líquido ascítico.....</i>	<i>33</i>
4.8. <i>Cultivo de micobactérias em meio líquido para obtenção do sobrenadante de cultura ..</i>	<i>33</i>
4.9 <i>Deteção do antígeno MPT64 em sobrenadantes de cultura através de Western Blotting</i>	<i>34</i>

4.10. Purificação do antígeno MPT64 em sobrenadante de cultura de micobactérias por cromatografia de afinidade	35
5. RESULTADOS	37
5.1 Titulação dos anticorpos anti-MPT64 nos soros dos camundongos imunizados com antígeno rMPT64 – Mtb	37
5.2 Eficiência da fusão e seleção dos híbridos produtores de anticorpos monoclonais anti-MPT64 e rendimento das subclonagem	37
5.3 Titulação dos mAbs no líquido ascítico contra MPT64 – Mtb	38
5.4 Detecção da proteína MPT64 em sobrenadantes de cultura de micobactérias através da técnica de Western Blotting.....	39
5.5 Perfil cromatográfico do antígeno MPT64 em diferentes sobrenadantes de cultura de micobactérias.....	40
5.6 Obtenção de anticorpos monoclonais para compor kit ELISA sanduiche baseado na utilização de dois anticorpos monoclonais anti- MPT64.....	41
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO.....	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* pertence à ordem dos *Actinomycetales*, subordem *Corynebacteriaceae*, família *Mycobacteriaceae* que contempla as micobactérias. Atualmente é composta por mais de 170 espécies e 13 subespécies, porém a maioria delas não é patogênica onde podem ser encontradas no meio ambiente (FARIA *et al.*, 2015). É constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e outras denominadas de micobactérias não tuberculosas (MNT).

A parede celular das micobactérias é complexa. Assim como, as bactérias Gram-positivas, as estruturas da parede celular das micobactérias contém uma membrana citoplasmática interna coberta por peptidoglicano e não tem membrana externa (MURRAY, 2014) Entretanto, as micobactérias possuem alto conteúdo lipídico e principalmente, ácido micólicos em sua parede celular, tornando-a hidrofóbicos e com resistência a ácidos e álcool, detergentes e colorações laboratoriais comuns e a antibióticos. Os lipídios são responsáveis por 50% do peso seco das micobactérias e são ligados de forma covalente a arabinogalactanas. Ainda na parede celular, existe o componente lipoarabinomananas manosiladas (Man-LAM), lipomananas (LM) e manoglicoproteínas (KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011; KORKEGIAN *et al.*, 2014).

A coloração das micobactérias exige utilização de corantes e técnica específicos (técnica de Ziehl-Neelsen), devido a sua dificuldade de remoção do corante álcool-ácido o caracterizando como bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (SANTOS 2015). A maioria das micobactérias patogênicas tem o crescimento lento com tempo de replicação de 12-24 horas, e para que seu crescimento seja detectado em culturas em meio sólido (formação de colônias), necessita-se de um período de 2 a 4 semanas (MURRAY, 2014).

1.2 Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e Micobactérias não tuberculosas

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), que é responsável pela tuberculose humana e/ou animal, é composta pelas espécies: *Mycobacterium tuberculosis* (principal agente da tuberculose humana), *Mycobacterium bovis* (de início infecta o gado bovino e outros animais podendo contaminar o ser humano através do contato com derivados do mesmo), *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin (BCG) – cepa atenuada que é utilizada para a vacina BCG, *Mycobacterium africanum* (que faz parte do grupo heterogêneo responsável também pela tuberculose humana na África), *Mycobacterium microti* (de menor frequência e causa tuberculose em aves e humanos imunocomprometidos), *Mycobacterium canetti* e *Mycobacterium pinnipedii* (HALSTROM *et al.*, 2015, ARANAZ *et al.*, 2003).

Já as micobactérias não tuberculosas (MNT), estão amplamente distribuídas no meio ambiente, tendo sido isoladas na água, incluindo água canalizada, solo, animais, equipamentos cirúrgicos e, inclusive em soluções desinfetantes (GÓMEZ, 2009). A infecção ocorre por inalação, inoculação ou ingestão de material contaminado por micobactérias, podendo causar doenças pulmonares e infecções de feridas cirúrgicas em diferentes tecidos, porém parece não ocorrer à transmissão de pessoa a pessoa (COWMAN *et al.*, 2012) Elas podem ser identificadas com base em testes fenotípicos (tempo de crescimento, produção ou não de pigmentos, provas bioquímicas, crescimento ou não na presença de inibidores químicos e testes moleculares - PRA, PCR *Restriction Analysis* e sondas genéticas “in house” ou comerciais) (TORTOLI, 2014).

Dentre as MNT patogênicas, destacam-se as do complexo *Mycobacterium avium* (MAC), composto por *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. chimaera*, frequentemente isoladas em doença pulmonar crônica e progressiva ou na forma disseminada em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana / síndrome da imunodeficiência adquirida, HIV / SIDA (KIM *et al.*, 2017; VAN ZELLER *et al.*, 2013). Outras MNT de importância clínica são *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. szulgai* e *M. malmoeense*. As MNT são bactérias oportunistas e na

maioria das vezes causam doença em pacientes com alterações do sistema imune ou alterações estruturais anatómicas nos pulmões (VAN ZELLER *et al.*, 2013).

A morfologia das MNT difere quanto à espécie e subespécie, relacionadas ao tamanho, forma e padrão de coloração. São bacilos alongados, comprimento extenso e achatados, coco-bacilos, e a sua coloração é uniforme ou “mesclada” e algumas podem ser muito polimórficas (PNEUMOLOGIA PAULISTA, 2009). Na análise microscópica, as MNT diferem das MTB, pois sua apresentação é de forma e tamanhos variados, onde a maioria não possui a formação de corda e apresentam como bacilos isolados com número elevados nas lâminas (ANVISA, 2013).

Como a terapia das infecções por MNT depende da espécie e pode variar, requerendo uma complexa combinação de fármacos - entre eles: isoniazida, claritromicina, rifampicina, amicacina e imipenem - em um período longo de duração (pelo menos de um ano), devido a alta resistência das MNT a drogas anti-TB e antibióticos em geral, a identificação correta e ágil das micobacterioses é de extrema importância para adequar o esquema terapêutico de forma oportuna (KIM *et al.*, 2017; VAN ZELLER *et al.*, 2013) .

1.3 Tuberculose e Infecções por micobactérias não tuberculosas

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente o parênquima pulmonar, sendo seu principal agente infeccioso o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (CHEEKER, 2018). Um terço da população humana mundial está infectado por MTB, entretanto, apenas 10 a 15% dos infectados evoluem para a doença na sua forma ativa, sendo que os demais permanecem em sua forma latente (WHO 2017).

Como forma de transmissão, no geral, acontece por via aérea e sua infectividade acontece de pessoa para pessoa, sendo a partir de aerossóis que são expelidos através da tosse, fala ou espirro contendo os bacilos. Essas partículas microscópicas estão em suspensão no ar contendo os bacilos e podem ser inspiradas por uma pessoa saudável, onde ao vencer as barreiras de defesa da

árvore respiratória vão se depositar nos alvéolos pulmonares dando início no processo da doença o tornando infectado (LIMA, *et al.*, 2017).

Se for diagnosticada e tratada adequadamente, a tuberculose tem um bom prognóstico, mesmo assim continua sendo um grande problema de saúde pública segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e considerada uma emergência mundial de saúde (COSTA, 2015). Sua taxa de mortalidade em adultos continua sendo maior que todas as outras doenças infecciosas, levando a óbito por volta de 1,3 milhões de pessoas por ano no mundo (WHO, 2018).

No Brasil, foi diagnosticado em 2018 um total de 72.788 mil novos casos de tuberculose, com incidência de 34,8 casos por 100 mil habitantes. Destacamos o Estado do Rio de Janeiro com uma taxa de incidência de tuberculose com 89,9/100mil casos, ou seja, a maior do país, que correspondeu ao dobro da média nacional, concentrando a maioria dos casos em 13 municípios da Região Metropolitana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em contra partida, nos últimos anos houve um aumento significativo da incidência de doenças por micobactérias não tuberculosas (MNT) no cenário mundial, sendo atribuída a diversos fatores como: a continuação de epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), poluição de meio ambiente e as melhorias nos métodos de diagnóstico de infecções por MNT (CARNEIRO *et al.*, 2018).

Diferentemente das micobactérias do complexo de micobactérias tuberculosas, as MNT não são transmitidas de pessoa a pessoa, mas a principal via de transmissão documentada tem sido os aerossóis de águas e soluções contaminadas e transmissão por procedimentos invasivos através de contato com equipamentos médicos contaminados (PEDRO *et al.*, 2008). Dentre as infecções mais prevalentes por micobactérias não tuberculosas, podemos destacar as bactérias do complexo *Mycobacterium avium* (MAC), que é composta por 4 subespécies distintas, sendo elas: *Mycobacterium avium* subespécie *hominissuis*, *Mycobacterium avium* subespécie *avium* (MAA), *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP) e *Mycobacterium avium* subespécie *silvaticum* (MAS). Vale

ressaltar que a subespécie *hominissuis* é considerada de maior importância clínica por causar doença pulmonar crônica nos seres humanos, já a MAP é um patógeno conhecido por causar enterite granulomatosa crônica afetando principalmente os ruminantes. O MAA e o MAS são isolados principalmente de aves (YUKIKO *et al.*, 2017).

1.4- Tratamentos da Tuberculose e de infecções não tuberculosas no Brasil

O esquema terapêutico para o tratamento da tuberculose pulmonar causada por *Mycobacterium tuberculosis* no Brasil é padronizado desde 1979, porém passou por algumas alterações ao decorrer dos anos. Apresenta tratamento com duração mínima de seis meses a depender da resposta do paciente aos medicamentos (MILHEIRO, 2016).

A utilização correta dos fármacos tem eficiência de 95%, aproximadamente, porém se forem usados de forma correta, sem suspensão indevida ou abandono dos mesmos. No Brasil, por ser uma doença distinguida de difícil eliminação, possui uma taxa de 70% na cura, justamente por abandonos do tratamento e a utilização de fármacos inadequados (ARBEX *et al.*, 2010). O seu uso correto tem como objetivo a diminuição dos pacientes bacilíferos (aquele que portam o bacilo), podendo assim diminuir o número de novos casos de tuberculose (SOUZA *et.al.*, 2015).

As Unidades Básicas de Saúde (UBS) são responsáveis pela distribuição dos medicamentos para o tratamento da TB. Sabe-se que esse tratamento segue o modelo observacional, onde um profissional da saúde corretamente habilitado fornece todo apoio ao paciente de forma presente na administração da medicação. Em alguns casos, quando o paciente não puder comparecer a UBS, haverá um agente comunitário que irá até a casa do mesmo e acompanhará a tomada do medicamento, fazendo com que haja uma diminuição do abandono do tratamento e um elevado número na eficácia do mesmo. Caso o paciente não realize de forma correta o tratamento pode ocorrer o desenvolvimento de cepas resistentes (DUARTE *et al.*, 2010; CHADHA, 2009).

Vale ressaltar, que o objetivo do tratamento observacional é aumentar o resultado terapêutico e evitar a resistência bacteriana. Os fármacos são classificados em medicamentos de primeira e segunda linha. Na primeira linha de tratamento usa-se o esquema: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, já o esquema de segunda linha, usa-se: estreptomicina e a etionamida, ou de acordo com a resistência do bacilo (YEW *et al.*, 2010).

O esquema terapêutico básico da tuberculose é dividido em duas fases: a intensiva (ou de ataque) e a de manutenção. Na intensiva, seu objetivo é eliminar os bacilos com resistência natural à medicação e na fase de manutenção é eliminar os bacilos latentes ou persistentes e reduzir a possibilidade de recidiva da doença (COURA, 2013).

Para adultos e adolescentes, o esquema básico é composto por quatro fármacos na fase intensiva (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamina e Etambutol) e dois fármacos na fase de manutenção (Rifampicina e Isoniazida) (BRASIL, 2019).

QUADRO 1: Esquema básico de tratamento da TB no Brasil

DURAÇÃO	ESQUEMA
2 meses (fase intensiva) (R/H/Z/E)	Rifampicina Isoniazida Pirazinamina Etambutol
4 meses (fase manutenção) (R/H)	Rifampicina Isoniazida

Fonte: Adaptado do Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, 2019

Em contra partida, o tratamento ideal para as doenças causadas pelas micobactérias não tuberculosas ainda estão sendo estudadas, porém já existem esquemas terapêuticos contendo um macrolídeo: a claritromicina ou azitromicina, sendo os mais eficientes (CAMPOS, 2000).

O tratamento para as formas pulmonares é recomendado no tempo de 12 a 18 meses, e com cultura negativa por pelo menos 12 meses, conforme quadro abaixo:

TABELA 1 : Tratamento das micobactérias não tuberculosas(MNT)

Espécies	Tratamento sugerido	Observações
M kansasii	R + H + E por 18 meses e/ou 12 meses de cultura negativa	Formas cavitárias: associar S por 6 a 12 meses Resistência à R: CI
M avium M intracellulare M chimerae	CI + R + E por 18 meses e/ou 12 meses de cultura negativa	Formas cavitárias: associar S por 6 a 12 meses Resistência à CI: R + H + E (18 meses) + S ou Am (6 meses)
M abscessus M massiliense M boletii	CI + Am (6 a 12 meses) + Imipenem ou Cefoxetina (2 a 3 meses)	Considerar cirurgia sempre que possível. Cursos intermitentes de tratamento podem ser utilizados já que atualmente a doença pulmonar é considerada incurável
M fortuitum	CI + Le por 18 meses + Am (3 a 6 meses) e/ ou 12 meses de cultura negativa	
M chelonae	CI + Am (6 a 12 meses) + Imipenem ou Cefoxetina (2 a 3 meses)	Considerar cirurgia sempre que possível.

Am: amicacina 10 a 15mg/kg/dia (máximo 1g/dia, 5x/semana nos 2 primeiros meses e 2x/semana a partir do terceiro mês. Reduzir a dose para pacientes com mais de 60 anos); Cefoxetina: 200mg/dia; CI: claritromicina 500 mg a 1g/dia; E: etambutol 25mg/kg/dia (máximo: 1,2g); H: isoniazida 5 a 10mg/kg/dia (máximo 300mg); Imipenem: 30mg/kg/dia; Le: levofloxacino 500 a 750 mg/dia R: rifampicina 10mg/kg/dia (máximo 600mg); S: estreptomicina 10 a 15mg/kg/dia (máximo 1g/dia, 5x/semana nos 2 primeiros meses e 2x/semana a partir do terceiro mês de tratamento. Reduzir a dose para pacientes com mais de 60 anos).

Fonte: Pneumologia Paulista, 2016

1.5- Métodos de diagnóstico de infecções micobacterianas

Os principais testes do diagnóstico laboratorial de micobacterioses são: baciloscopia direta de escarro ou outro material clínico (exame microscópico direto), exame bacteriológico para isolar a cultura de micobactéria com identificação da espécie e testes bioquímicos e de sensibilidade aos antibióticos, métodos moleculares para detecção e identificação de micobactéria em material clínico, radiografia do tórax, e os testes imunológicos, como a prova cutânea de PPD (*Purified Protein Derivative*) e teste de liberação de interferon gama (IGRA). Vale ressaltar que além desses exames da TB, é fornecido o teste para HIV a todas as pessoas com TB (BRASIL, 2011).

A baciloscopia de escarro é o teste mais utilizado para o diagnóstico inicial, uma vez que se for positivo permite a confirmação da infecção micobacteriana pulmonar. O material coletado é avaliado pela coloração de Ziehl-Neelsen, mas esse método só fornece resultados positivos quando há pelo menos 5000 bacilos por mL de amostra o que totaliza somente 50 a 70% dos doentes com lesão pulmonar (WHO, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2018). A análise microscópica da lâmina corada por Ziehl-Neelsen permite confirmar a presença de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) visivelmente avermelhados. As micobactérias não tuberculosas diferem das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, pois podem se apresentar com várias formas e tamanhos diferentes, a maioria não possui formação de corda e apresentam-se como bacilos isolados e em grande quantidade na lâmina (ANVISA, 2013).

Outro método utilizado é o exame bacteriológico do escarro ou de outro material clínico, onde é mais sensível visando o cultivo e isolamento da cultura de micobactéria. O maior problema da cultura para micobactérias é o longo tempo de incubação necessário, que no caso de uso do meio sólido Löwenstein-Jensen (o padrão ouro do teste) demora liberar o resultado positivo de 20 a 40 dias. Em vista disso, não se deve esquecer que nesse processo longo, uma pessoa infectada continua transmitindo a doença para outro indivíduo suscetível (MOREIRA *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2011).

Recomendado pela Organização Mundial de Saúde em 2008, como forma de diminuir o tempo de liberação do resultado para 10-15 dias, novos testes de isolamento de micobactérias em meio líquido foram utilizados, como por exemplo, o sistema tubo indicador de crescimento bacteriano (MGIT- *mycobacteria growth indicator tube*), porém o mesmo não permite diferenciar as bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas (WHO, 2007; BONA, 2011).

Após isolamento da cultura, os testes morfológicos, bioquímicos ou moleculares são utilizados para a identificação de bactéria, o que permite finalizar o diagnóstico. Os métodos de identificação são demorados, pois exigem subcultivo da bactéria, que é de crescimento lento, no meio sólido, que consiste na observação da

morfologia, pigmentação e aspecto das colônias e as características de seu crescimento em meio de cultura. Em meio sólido MNT apresentam colônias úmidas, cremosas ou secas, com crescimento liso ou irregular, podendo ser incolor ou coloração brilhante entre laranja e o amarelo intenso. Em contraste, as micobactérias do complexo MTB apresentam sempre colônias secas e rugosas, com crescimento irregular, coloração creme, sem pigmento. Já no meio líquido, as MNT geralmente apresentam turvação do meio, enquanto o complexo MTB faz a floculação e precipitado no meio (BONA, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Salienta-se que a identificação entre as MTB e MNT de forma clínica e terapêutica são de suma importância, uma vez que grande parte dos laboratórios de micobacteriologia utilizam os testes bioquímicos convencionais como forma de identificação para as MTB, sendo os mesmos não sensíveis ao trabalho e necessitam de equipamentos de biossegurança adequados (WANG *et al.* 2007, YAMAGUCHI *et al.* 1989).

A prova do crescimento em meio com PNB, que consiste na adição do ácido p-nitrobenzóico (500 ug/mL) em meio Lowenstein-Jensen, inibe a multiplicação do complexo MTB com o crescimento apenas das MNT. A identificação de MNT ainda se baseia em uma variedade de testes fenotípicos e propriedades enzimáticas. Esses testes são trabalhosos e demorados para serem executados e podem levar vários dias para serem realizados. (ANVISA, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Uma combinação de alguns testes fenotípicos (tempo de crescimento, produção ou não de pigmentos e provas bioquímicas) e testes moleculares como PRA-PCR tem sido usados na rotina laboratorial (SECRETÁRIA ESTADUAL DA SAÚDE, 2005). Os testes bioquímicos padrão utilizados para identificação fenotípica das MNT são: tempo de crescimento em meio sólido, pigmentação, catalase positivo, hidrólise do tween 80, redução do telurito, utilização do ferro, produção de niacina, urease e redução do nitrato (SENNA *et al.*, 2011). A identificação de micobactérias através de métodos convencionais fenotípicos oferece desvantagens, pois a demora em obter resultados e a dificuldade em diferenciar as espécies provoca impacto importante na escolha do tratamento adequado para o paciente (WILDNER *et al.*, 2011; CERCA 2010).

Com o surgimento de métodos moleculares, com base no ensaio PCR, é possível identificar a bactéria em cultura ou em material clínico de forma rápida e específica. Porém, para realizá-los necessita de técnicos qualificados, que às vezes não estão disponíveis em países em desenvolvimento, como por exemplo, o Brasil. Para superar o obstáculo de necessidade de conhecimentos técnicos avançados para o diagnóstico molecular, recentemente foi desenvolvido um teste automático, o GeneXpert MTB/RIF (Cepheid), indicado para identificação de MTB no escarro do paciente e avaliação da sua susceptibilidade a rifampicina. O teste utiliza cartuchos individuais para realizar a purificação, concentração e amplificação de ácidos nucleicos em tempo real por meio da PCR de forma automatizada (LIMA *et al.*, 2017). Entretanto, o teste GeneXpert e outros testes moleculares, são caros para usar rotineiramente em programas de controles da tuberculose em suas áreas de alta prevalência em países subdesenvolvidos (BOEHME *et al.*, 2010). Foram encontrados outros testes para identificação de ácido micólico de micobactérias isoladas de forma precisa e rápida, baseados no uso de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), porém necessita de dispositivos de alto valor para execução (PUBLIC HEALTH SERVICE CDC, 1996).

O PRA-hsp65 (*Polimerase Chain Reaction Restriction Analysis of the gene heat shock protein 65*) é o método molecular usado para identificar as espécies de MNT, através da comparação de padrões de fragmentos gênicos por restrição enzimática de gene alvo (GRILLO, 2012 ; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Os testes imunológicos indicados para a identificação das micobactérias foram desenvolvidos como uma alternativa rápida e barata para os métodos moleculares. Os testes imunológicos, baseados na reação antígeno-anticorpo, podem ser utilizados para fins diagnósticos quando aplicados para a detecção dos antígenos específicos, que são diferentemente expressos ou produzidos pelas diferentes espécies de micobactéria. Entretanto, a identificação destes antígenos não é uma tarefa fácil, sendo que a maioria dos antígenos é compartilhada pelas diferentes espécies de micobactérias (antígenos ortólogos ou similares), o que pode causar reatividade cruzada (*cross-reactivity*) em testes imunológicos (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Alguns dos antígenos deste grupo já foram identificados e utilizados para desenvolvimento dos métodos de imunodiagnóstico. O antígeno MPT64 (Rv1980c) é uma proteína de 24kDa que é secretada pelos patógenos do complexo MTB. Este antígeno foi detectado no meio de cultura de MTB, porém não foi encontrado nas culturas de MNT, mostrando que pode servir como alvo para identificação de MTB no meio de culturas de micobactérias isoladas dos pacientes, sendo confirmado por clonagem e sequenciamento do filtrado de cultura H37Rv (ORIKIRIZA *et al.*, 2017; GENNARO, 2000).

Partindo desse pressuposto, foram desenvolvidos testes Imunocromatográficos em diferentes países com a finalidade de fornecer detecção oportuna de *M. tuberculosis* por meio do seu antígeno MPT64 imediatamente após o isolamento da micobacteria em cultura, como por exemplo: *Capila TB* (TAUNS, Izunokuni, Japão), *SD BIOLINA TB Ag MPT64 rapid* (Standard Diagnostics, Inc., Coréia) e o *BD MGIT™ TBc identification test* (Becton, Dickinson and Company, EUA). Esses testes são rápidos (legível em 15 minutos), fácil de usar e não requer processamento ou instrumentação adicional. Vale ressaltar que o mesmo identifica MTB em meio líquido (por ex: MGIT) e não necessita de subcultivo no meio sólido. Para detecção do MTB, foi demonstrado que o teste apresenta alta sensibilidade e especificidade (maior que 99%), entretanto, não detecta *M. avium* e não discrimina os tipos de MNT (MAURYA *et al.*, 2012).

Recentemente, um antígeno que pode ser utilizado como alvo para a discriminação entre micobactérias foi identificado pelo nosso grupo de pesquisa (SOUZA *et al.*, 2011, 2018). A proteína APA (*alanine-proline antigen*) é uma das proteínas secretadas, que é diferentemente expressa em bactérias do complexo *M. tuberculosis* e *M. avium*. Em trabalhos anteriores, nosso grupo produziu anticorpos monoclonais que reconhecem seletivamente o APA do *M. avium*, incluindo subespécies *M. avium paratuberculosis* e *hominissuis*, e não reconhecem o APA de *M. tuberculosis*, demonstrando sua utilidade para o diagnóstico diferencial. Foi produzido um kit ELISA *sandwich* anti-APA indicado para diagnóstico da Paratuberculose bovina em fezes bovinas (patente submetida em 2015 BR10 20150051425) (SOUZA *et al.*, 2018). Recentemente, demonstramos que os

anticorpos anti-APA que compõe o kit PTB - Detect podem ser úteis na identificação do *M. avium* em culturas bacterianas isoladas de pacientes.

1.6 - Produção de anticorpos monoclonais e a Tecnologia de hibridoma

Em 1984, os imunologistas Georges Jean Franz Köhler e César Milstein ganharam o prêmio Nobel de medicina pelo desenvolvimento da tecnologia de hibridomas, originando células híbridas com a capacidade de secretar anticorpos monoclonais provindos dos roedores em quantidade ilimitada (LENZ, 2004; SANTOS, 2018).

A tecnologia é baseada na fusão de linfócitos B, obtidos de animais imunizados por um antígeno de interesse, e de células tumorais de mieloma, com capacidade de se manter e replicar em cultura, para produzir as células híbridas (hibridomas) produtores de anticorpos monoclonais de interesse por tempo indeterminado, sendo que também são células tumorais (SANTOS *et al.*, 2018).

Os mielomas utilizados na geração dos hibridomas não secretam imunoglobulinas e, crescem em meio de cultura comumente utilizada, 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).

Diferentemente dos anticorpos policlonais presentes no soro dos animais imunizados, que incluem uma variedade dos anticorpos gerados contra diferentes epítopos do antígeno utilizado para a imunização, os anticorpos monoclonais são homogêneos e exibem alta especificidade para um único epítipo antigênico (OI & HERZENBERG, 1980; MILSTEIN, 1981; GODING, 1996).

A seleção dos híbridos ocorre dentro de duas semanas, os clones de hibridomas crescem e tornam-se visíveis e o sobrenadante de cultura vai 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 de 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 (SILVA *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas da humanidade, causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), que deve ser diferenciada das infecções causadas pelas outras micobactérias patogênicas, como micobactérias não tuberculosas (MNT). O diagnóstico diferencial da doença pulmonar por MTB e *M.avium* é de extrema importância sendo que o tratamento dessas infecções são diferentes, devido à resistência de *M.avium* aos fármacos anti-TB de primeira linha. No intuito de melhorar os testes imunológicos utilizados para identificação de micobactérias isoladas dos pacientes, nós propomos desenvolver novo teste imunológico (ELISA sanduiche) baseado na detecção de dois diferentes antígenos, sendo que um destes antígenos (MPT64) é secretado pelas micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* e outro antígeno (APA) pelas micobactérias do complexo *M. avium*.

Nesse contexto, a utilização de anticorpos monoclonais anti-APA já produzidos por nosso grupo e a produção de anticorpos monoclonais anti-MPT64 para desenvolvimento de novos testes indicados para identificação e diferenciação de *M. avium* e *M. tuberculosis* em sobrenadantes de culturas isoladas dos pacientes, pode contribuir para o diagnóstico diferencial da tuberculose e infecção por *M. avium*.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral:

Produzir anticorpos monoclonais frente antígenos MPT64 de *M. tuberculosis* para compor novo kit ELISA sanduiche indicado para o diagnóstico diferencial de infecções de *M. avium* e *M. tuberculosis*

3.2- Objetivos específicos:

1. Produzir e caracterizar hibridomas capazes de produzir anticorpos monoclonais (mAbs) específicos contra antígeno MPT64 de *M. tuberculosis*;
2. Selecionar os hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais específicos que sejam uteis para detecção de MPT64 em sobrenadantes de cultura de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* isoladas dos pacientes com doença pulmonar;
3. Purificar o antígeno MPT64 em diferentes sobrenadantes de cultura por cromatografia de afinidade

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Utilizou-se sete camundongos BALB/c criados e mantidos em micro-isoladores no Biotério de Camundongos da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Os animais foram mantidos com livre acesso para água e comida e utilizados de acordo com as exigências éticas e recomendações internacionais, com protocolos aprovados pela Comissão de Ética em Animais de Laboratório UENF (protocolo 350).

4.2 Cultura de mieloma murino NS0

As células de mieloma murino NS0, negativas na expressão de enzima *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, HGRPT, foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm³ (Corning), utilizado meio nutricional *Dulbecco's Modified Eagles Medium* com suplemento F-12 (DMEM-F12, GIBCO, BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, BRL, EUA), 20µg/ml de antibiótico gentamicina e 0,5 mM de 2β- mercaptoetanol, a 37°C em estufa com 5% de CO₂, com troca de meio a cada três dias.

4.3 Obtenção dos macrófagos peritoneais murinos indicados para formar a camada nutritiva (*feeder layer*)

Os macrófagos foram obtidos através de lavagem da cavidade peritoneal de 2 camundongos BALB/c de 7 semanas de idade com meio DMEM-F12. Foram injetados 5mL de meio no peritônio de cada um dos camundongos, e deixados por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, o líquido foi colhido, centrifugado a 300g por 5min., o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 10 mL de meio DMEM-F12 contendo 10% de soro fetal bovino. A suspensão celular foi distribuída em placas de 96 poços (100µL/poço) e incubadas a 37°C na estufa em

uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24h. Os macrófagos peritoneais foram utilizados como *feeder layer* (camada nutritiva) para crescimento e clonagem de hibridomas .

4.4. Imunização e produção de hibridomas anti- rMPT64 MTB

Um grupo de três camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados intraperitonealmente em dois períodos contendo intervalo de 21 dias com o antígeno recombinante MPT64 de *Mycobacterium tuberculosis* (rMPT64- Mtb), obtida do *BEI RESOURCE* (NR-49435), contendo 40 µg em 0.5ml de PBS (pH 7.2) por injeção. Os antígenos foram emulsificados em *Freund's incomplete adjuvante* e utilizados para a primeira inoculação nos camundongos. Após isso, foi injetada a dose de reforço: 30 µg de proteína em tampão fosfato-salino (PBS), por via intraperitoneal.

Quatro dias após a segunda inoculação foi feita a coleta de sangue e realizado teste de ELISA para quantificar o título dos anticorpos. Após 21° dia a partir de data da última inoculação do antígeno, foi realizado um *booster* (três injeções do antígeno em dias consecutivos) com 20 µg da proteína em PBS por via intraperitoneal. No dia seguinte, os camundongos foram eutanasiados e o baço foi utilizado para obtenção das células imunes.

As células provenientes do baço dos camundongos imunizados foram obtidas por lavagem peritoneal com 10 ml do meio DMEM-F12, utilizando agulha e seringa. Para obtenção de hibridomas a partir dos esplenócitos obtidos foi utilizada a metodologia descrita por Kohler e Milsten (1975). Os esplenócitos foram fundidos com células de mieloma NS0, utilizando-se agente de fusão (PEG) 4000 (Gibco BRL, EUA).

Após processo de fusão, é necessário eliminar as células que não se fundiram ou que se fundiram incorretamente, transferindo-as para uma solução contendo o HAT (Hipoxantina, Timidina e o antimetabólito Aminopterina). As células foram ressuspensas em meio DMEM – F12 (Gibco BRL, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 20µg/ml de gentamicina (Gibco BRL, EUA), 50µM de β - mercaptoetanol e agente seletivo HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina) 50X

(Sigma Chemical Co,EUA). A suspensão celular foi semeada em 4 placas de 96 poços (Corning, EUA), que continham previamente uma monocamada de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c de acordo como descrito no item 4.3. As células fundidas foram distribuídas em placas de cultura de modo a obter 1-2 células em cada poço (2×10^2 células /placa).

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C. As placas foram observadas diariamente utilizando um microscópio invertido para monitorar o crescimento de colônias celulares e excluir contaminações. Quando as colônias de hibridomas atingiram aproximadamente 300 células, os sobrenadantes de cultura em poços onde foi observado crescimento somente de uma colônia foram analisados através do teste de ELISA para a detecção de anticorpos anti- MPT64 (conforme descrito no item 4.7). Os poços com colônias de hibridomas produtoras de anticorpos específicos foram selecionados, as células foram coletadas e utilizadas para subclonagem (conforme descrito no item 4.5).

4.5. Seleção dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra o antígeno MPT64, utilizando Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA)

As placas de ELISA de 96 poços (*Polysorp, Nunc International, Rochester, NY*) foram sensibilizadas com proteína rMPT64- Mtb, 2µg/mL diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.7 (Na₂CO₃ 0.015 M; NaHCO₃ 0.035 M) e incubada por 18 h a 4°C. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST 0.05%) e bloqueados com meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (SFB), por 60 minutos em temperatura ambiente. Foi adicionado 60 µL por poço da placa de sobrenadante das culturas de hibridomas e as placas foram incubadas por 60 minutos em estufa a 37°C. Passado o tempo de incubação, a placa foi lavada com salina fosfatada tamponada tween 20 (PBST) 0,05% por duas vezes. Posteriormente, as placas foram incubadas com anticorpo secundário de camundongo anti-Ig total de camundongo conjugado à peroxidase (*Southern Biotechnologies Associates*) diluído 1:2000 em PBST 0.05% e incubado por 60 minutos em estufa a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes em PBST 0.05%. A reação foi revelada com 60 µl da solução OPD (o-

fenilenodiamina –2HCl, ácido cítrico 20mM, fosfato de sódio 40mM) e H₂O₂ – 0.0015% e interrompida adicionando 50 µl de H₂SO₄ por poço. A leitura da placa por espectrofotometria foi realizada a 492 nm.

4.6 Clonagem dos hibridomas

Os hibridomas positivos em ELISA (produtores dos anticorpos anti-MPT64) foram clonados utilizando metodologia de diluição limitante. As células obtidas de cada poço positivo foram quantificadas em câmara de Neubauer, 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 x 10⁴ células/poço). Cada clone foi subclonado pelo menos duas vezes. Após clonagem e crescimento dos clones foi realizada a coleta dos sobrenadantes para obtenção dos anticorpos. As células de cada hibridoma foram coletadas separadamente e alíquotas de 1 mL foram congeladas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido.

4.7. Produção de líquido ascítico

Após 7 dias da injeção intraperitoneal de 0,5ml de Pristane (Sigma Chemical Co EUA), os camundongos BALB/C receberam por via intraperitoneal 2x10⁶ células do hibridoma para induzir ascite na cavidade peritoneal como resultado do processo cancerígeno. A coleta do líquido ascítico foi realizada aproximadamente no 10^o dia após a injeção das células. O líquido foi submetido a centrifugação a 1000g por 5min e os respectivos sobrenadantes foram testados por ELISA para quantificação dos anticorpos monoclonais e mantidos a 4°C.

4.8. Cultivo de micobactérias em meio líquido para obtenção do sobrenadante de cultura

Foram utilizadas cepas bacterianas da coleção de micobactérias do LBR/UENF, congeladas e armazenadas no freezer – 70°C. Neste trabalho, foram utilizadas cepas de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC), *M. kansasii* 12478 (INCQS 00134, Fiocruz), *M. avium* subsp *hominissuis* 104 (cedida pela Dr^a Sylvia Leão, UNIFESP) e isolados clínicos de *M. tuberculosis* (cepa M299, isolada de paciente com TB em Moçambique e cedida pelo Dr Philip Suffys, Instituto Oswaldo Cruz/RJ) e cepa *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, isolada de um bovino com paratuberculose por nosso grupo.

As culturas micobacterianas foram descongeladas e ressuspendidas em 10 mL do meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de ADC (suplemento albumina, dextrose, catalase- – Becton Dickinson) e 0,05% glicerol (para MNTs) ou 0,05% Tween 80 (para Mtb). A suspensão de bactérias em meio foi agitada, utilizando um vórtex, sonicada em banho de ultrassom por 1 minuto para dispersão dos grumos (em caso de bactérias do complexo Mtb) e incubada sob agitação diária 37°C, até atingir uma densidade ótica (D.O.) de 5 unidades de escala McFarland (utilizando tubo padrão McFarland), que correspondem aproximadamente a concentração de 5×10^8 bactérias/mL.

A padronização da concentração micobacteriana em culturas de diferentes espécies foi determinada por quantificação da D.O. de cultura, utilizando espectrofotômetro a 600 nm e verificação do número de CFUs de bactéria crescidas no meio sólido 7H10 acrescido pelo suplemento OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase-- Becton Dickinson). O sobrenadante de cultura crescida no meio líquido, que atingiu densidade 5×10^8 bactérias/mL, foi coletado e alíquotas de 1 ml e congeladas a -20° C até o processamento.

4.9 Detecção do antígeno MPT64 em sobrenadantes de cultura através de Western Blotting

Os sobrenadantes de culturas de cepas de referência e isolados clínicos de pacientes com doença pulmonar (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis*, M299 e H37Rv) foram submetidos a eletroforese SDS-

PAGE e *Western blotting* utilizando protocolos convencionais ao ensaio de Western Blotting. Os sobrenadantes de culturas foram aplicados em tampão de amostra desnaturante (Tris HCl 1,0M, pH:6.8, SDS10%, 2 mercaptoethanol, azul de bromophenol 1%, H₂O_{dd}) fervido por 5 minutos e submetidas a SDS- PAGE a 12%. As proteínas foram eletrotransferidas para uma matriz de nitrocelulose com poros de 0,45µm (*Amersham Life Sciences*), de acordo com Towbin e colaboradores (1979), utilizando o equipamento de transferência líquida BioRad em tampão de transferência Tris-Glicina (25mM Tris, 192 mM glicina e 20% de metanol) por 1hr e 40 min em constantes 10 volts.

Após a transferência das proteínas, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora (1% de gelatina em PBS T) durante 1hora a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi incubada com MAb anti-MPT64- Mtb - líquido ascítico (diluição 1:500) e/ou soro do camundongo imunizado (diluição 1:500) por 1h, e lavadas 3 vezes com PBS 0,1% Tween durante 5 minutos. Após lavagem, foi acrescentado o anticorpo secundário de camundongo anti-Ig total de camundongo conjugado à peroxidase (*Southern Biotechnologies Associates*) diluído 1:5000, por 1h a temperatura ambiente. A revelação da membrana foi feita 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).

4.10. Purificação do antígeno MPT64 em sobrenadante de cultura de micobactérias por cromatografia de afinidade

O isolamento e purificação do antígeno MPT64 foi realizado através da purificação em coluna de afinidade. Utilizamos como matriz de acoplamento *NHS-activated SepharoseTM 4 Fast Flow, Ge Healthcare* que recebeu 15 mg/ml de imunoglobulina previamente dializados em tampão de acoplamento (1M NaHCO₃, pH 8.3, 5MNaCl). A sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (2g) foi embebida em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 9,0 durante 16 horas, a 4 °C. Posteriormente, os sobrenadantes foram adicionados à matriz e deixada sob agitação lenta por 4 horas, a temperatura ambiente. A suspensão foi

mantida a 4 °C, por 16 horas, para aumento da eficiência de ligação. Posteriormente, a resina esteve agitada levemente com bicarbonato de sódio 100 mM, glicina 100 mM, pH 9,0, por 3 horas, a temperatura ambiente e em seguida filtrada e lavada com ácido acético 100 mM, pH 3,0 e novamente filtrada. Após cada separação cromatográfica foi analisada as frações para determinar quais delas contém a proteína de interesse, além do grau de pureza dessas frações.

Para determinar a pureza e medir a quantidade de proteínas totais foi utilizado Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) - um gel desnaturante que separa as proteínas em função de seu tamanho. As frações finais positivas pela presença da proteína foram combinadas e dialisadas por 3 dias consecutivos em água destilada por agitação em 4°C, sendo trocada duas vezes ao dia,prévio ao seu armazenamento.

5. RESULTADOS

5.1 Titulação dos anticorpos anti-MPT64 nos soros dos camundongos imunizados com antígeno rMPT64 – MTB

Para produzir os híbridos produtores de anticorpos anti-MPT64 os camundongos foram imunizados com rMPT64 e tiveram o sangue coletado para titulação de anticorpos anti- rMPT64. O soro do camundongo 1 apresentou maior título de anticorpo quando comparado com o camundongo 2 e 3, como demonstra a curva de titulação de anticorpos anti –MPT64 (Figura 1). O camundongo 1 foi escolhido como o doador de esplenócitos para a realização da fusão.

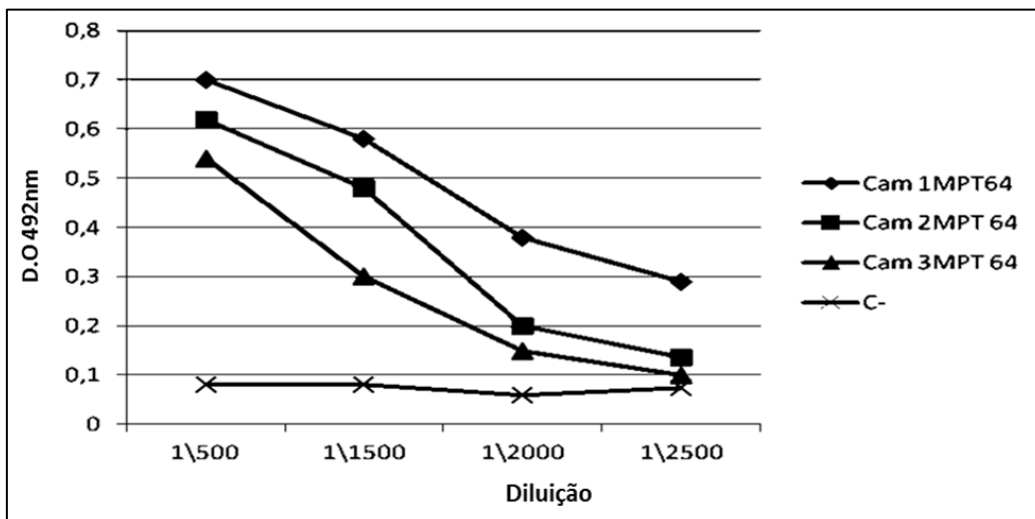


Figura 1: Titulação dos camundongos imunizados com antígeno rMPT64. Titulação dos anticorpos no soro dos camundongos imunizados com antígeno rMPT64 de *Mycobacterium tuberculosis*. Os camundongos foram imunizados com 40µg de rMPT64 no dia 1º e com 40µg no 21º e as amostras de sangue foram coletadas no 7º dia após sua segunda imunização e testadas por ELISA. Como Controle negativo foi utilizado soro do camundongo pré – imune

5.2 Eficiência da fusão e seleção dos híbridos produtores de anticorpos monoclonais anti-MPT64 e rendimento das subclonagem

Foram utilizadas as células esplênicas do camundongo 1 e fusionadas com as células de mieloma NS0 para produção dos híbridos. Após a fusão, um total de 50 poços plaqueados apresentou crescimento. Estes foram submetidos ao teste de ELISA para a presença (no sobrenadante das culturas) de anticorpos contra

antígeno MPT64- Mtb, e apenas 1 híbrido (6C/9) foi positivo para este antígeno, sendo este selecionado para a subclonagem. O hibridoma selecionado (6C/9) foi submetido a 3 subclonagens apresentando eficiência de 39% na primeira clonagem, 50% na segunda e 66% na terceira subclonagem (tabela 2). Foi realizada a expansão desse híbrido e as células foram injetadas em camundongos para a produção de líquido ascítico.

Tabela 2 - Rendimento da primeira/segunda/terceira subclonagem dos hibridomas específicos para rMPT64 – MTB

Nº de poços avaliados por clone/ nº ELISA positivo		
1ª clonagem	2ª clonagem	3ª clonagem
38/15 (poços)	28/10 (poços)	15/10 (poços)
39%	35%	66%

5.3 Titulação dos mAbs no líquido ascítico contra MPT64 – MTB

Foram injetados intraperitonealmente as células de hibridoma 6C/9, 2×10^6 /camundongo, para a indução da produção de líquido ascítico no grupo de três camundongos da linhagem BALB/C antes sensibilizados através da injeção intraperitoneal de Adjuvante incompleto de Freund. O líquido ascítico induzido foi coletado e submetido ao teste por ELISA. O título dos anticorpos foi 1:1500, e essa diluição foi utilizada nos testes subsequentes (Figura 2).

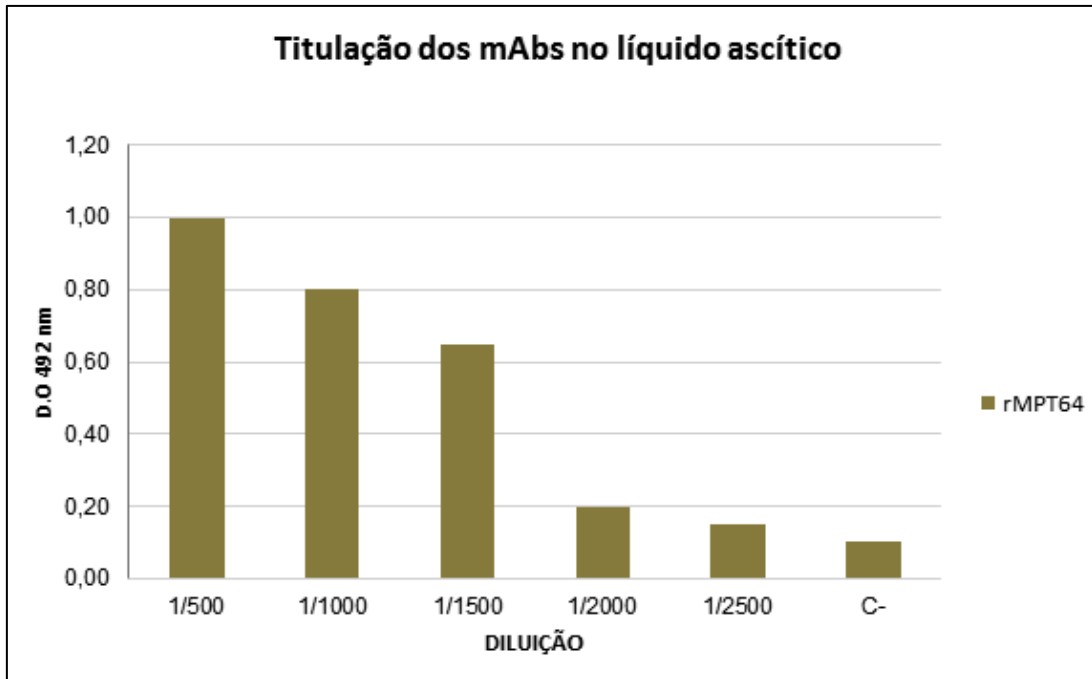


Figura 2- Titulação dos anticorpos no líquido ascítico induzido nos camundongos pelo hibridoma 6C/9. As células de hibridoma (2×10^6 células) foram injetadas intraperitonealmente em camundongos BALB/c sensibilizados por Freund's incomplete adjuvant. O líquido ascítico foi coletado durante uma semana após a injeção das células híbridas e foi testado em diluições seriadas por ensaio de ELISA.

5.4 Detecção da proteína MPT64 em sobrenadantes de cultura de micobactérias através da técnica de *Western Blotting*

Para detecção da proteína MPT64, diferentes sobrenadantes de cultura de micobactérias (cepas *M. tuberculosis* H37Rv, M299, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*) foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE e *Western blotting* utilizando protocolos convencionais. A membrana foi tratada com anticorpo policlonal (soro do camundongo imunizado) (Figura 3A) e com anticorpo monoclonal anti-MPT64 6C/9 (Figura 3B).

A figura 3 demonstra tanto os anticorpos monoclonais quanto o soro policlonal anti MPT64 reconheceram especificamente o antígeno MPT64 numa isoforma de 24 kDa somente em sobrenadante de cultura de micobactérias do complexo de MTB (H37Rv e M299) e não no sobrenadante de cultura de micobactérias não tuberculosas (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*).

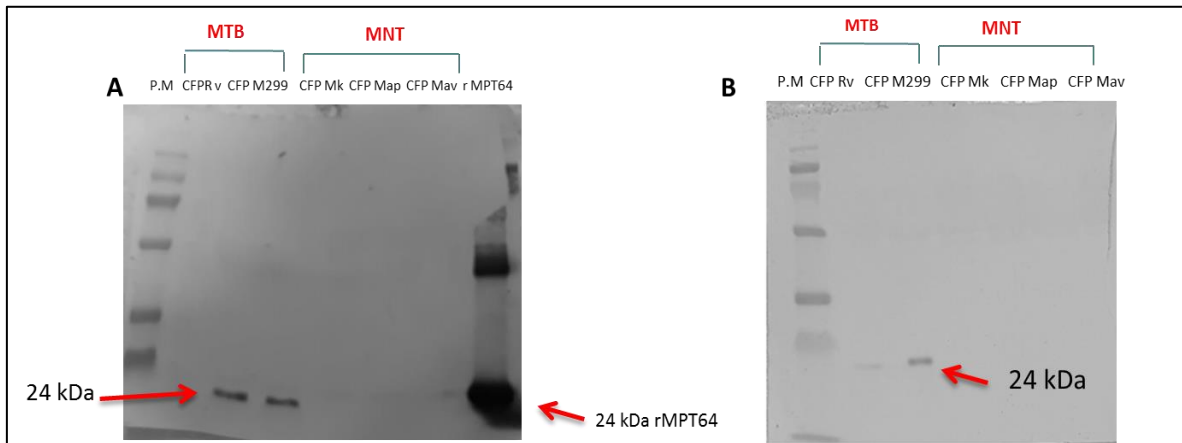


Figura 3: Detecção da proteína MPT64 em sobrenadante de cultura de micobactérias por Western blotting. A membrana foi tratada com o anticorpo policlonal (A) e com o anticorpo monoclonal anti-MPT64 (B). CFP Rv – Sobrenadante de cultura de cepa *M. tuberculosis* H37Rv. CFP M299- Sobrenadante de cultura de isolado clínico de *M. tuberculosis* M299. CFP Mk- Sobrenadante de cultura de cepa *M. kansasii* 12478; CFP Map – Sobrenadante de cultura de cepa *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolada de vaca com PTB; CFP Mav- Sobrenadante de cultura de cepa *M. avium* subsp. *hominissuis* 104; rMPT64 – Proteína MPT64 recombinante.

5.5 Perfil cromatográfico do antígeno MPT64 em diferentes sobrenadantes de cultura de micobactérias

Os sobrenadantes de culturas das micobactérias foram submetidos ao isolamento do antígeno MPT64 através da purificação por cromatografia de afinidade, onde foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-MPT64 dialisado em tampão de acoplamento (1M NaHCO₃, pH 8.3, 5M NaCl) e imobilizados numa coluna de gel *NHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow, Ge Healthcare*. O antígeno MPT64 foi isolado somente nos sobrenadantes de cultura das cepas *M. tuberculosis* (cepas M299 e H37Rv), uma vez que, foram observados picos de absorvância nas amostras que continham o antígeno para se ligar ao anticorpo acoplado na coluna de afinidade (Figura 4A).

A pureza das frações colhidas foi avaliada por SDS-PAGE e Western blotting. Não foram detectados picos de absorvância nos sobrenadantes de cultura das cepas *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* (cepa 104) e *M. kansasii* (cepa 12478) (Figura 4B). Como controle negativo, utilizamos o meio de cultura de 7H9 puro, sendo submetido ao mesmo método (Figura 4C). Para detectar as frações proteicas, as leituras de absorvância foram feitas a 220nm.

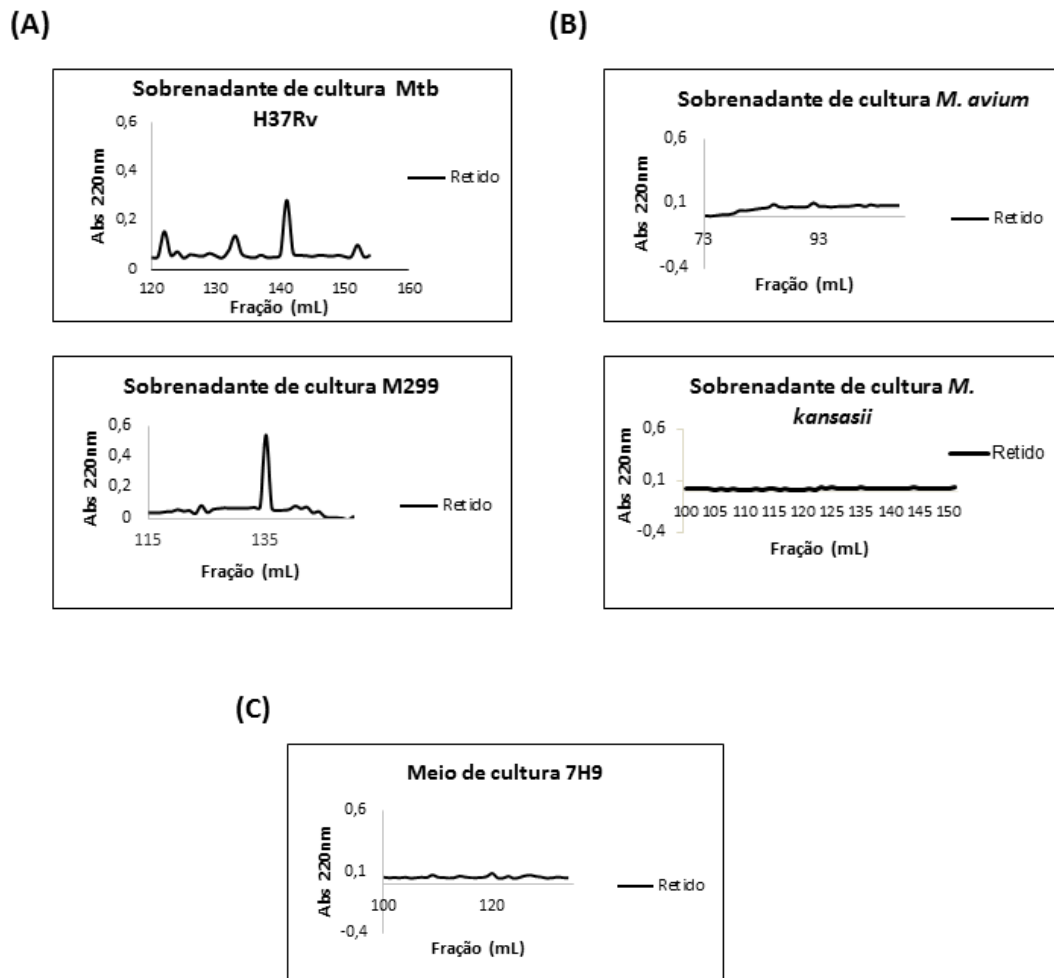


Figura 4. Perfis cromatográficos dos sobrenadantes de culturas de cepas *M. tuberculosis* H37Rv e M299 (A) e cepas de micobactérias não tuberculosas (B). Picos cromatográficos do antígeno MPT64 isolados pela cromatografia de afinidade foram observados somente nas culturas de *M. tuberculosis*. Meio de cultura de micobactérias (meio 7H9) foi utilizado como controle negativo (C).

5.6 Obtenção de anticorpos monoclonais para compor kit ELISA sanduiche baseado na utilização de dois anticorpos monoclonais anti- MPT64

Como foi descrito anteriormente, foi obtido somente um hibridoma estável que produz anticorpos que reconhecem o antígeno MPT64. Entretanto, nosso objetivo foi produção do kit ELISA sanduiche baseado na utilização de dois anticorpos monoclonais anti- MPT64. Para produzir mais hibridomas, iniciamos novo ciclo de imunização dos camundongos. Dois camundongos BALB/C foram imunizados

através da inoculação intraperitoneal com 60 µg da proteína recombinante rMPT64 MTB no dia 1º e com 50 µg no dia 21º, e no 28º dia tiveram as amostras de sangue coletadas e submetidas ao teste de titulação de anticorpos anti – MPT64 utilizando ELISA nas diluições de 1:100 até 1:2500. Para controle negativo, foram usadas amostras de soro obtidas antes da imunização, e o soro do camundongo não imunizado (camundongo C3).

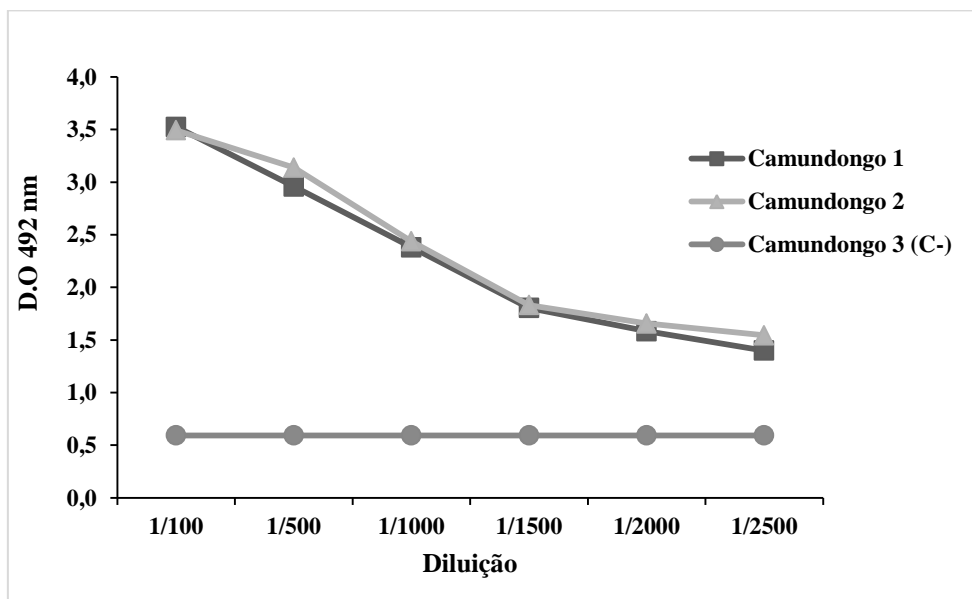


Figura 5: Nova titulação dos camundongos imunizados com antígeno rMPT64. Titulação dos anticorpos no soro dos camundongos imunizados com antígeno rMPT64 de *Mycobacterium tuberculosis*. Os camundongos foram imunizados com 60µg de rMPT64 no dia 1º e com 50µg no 21º e as amostras de sangue foram coletadas no 7º dia após sua segunda imunização e testados por ELISA. Como Controle negativo foi utilizado soro do camundongo pré – imune.

Os resultados apresentados na figura 5 demonstram que dois camundongos após a imunização apresentaram anticorpos anti-MPT64 em alto título. Devido à pandemia de COVID-19 que causou fechamento dos laboratórios da UENF a partir de 03.2020, o trabalho de produção de novos hibridomas foi interrompido.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos mais rápidos de diagnóstico, seguros e sensíveis tornou-se um desafio e um obstáculo ao controle de infecções micobacterianas, quer seja sob o ponto de vista de diagnóstico quer seja do ponto de vista de controle epidemiológico.

A caracterização bioquímica, imunológica e molecular do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) levou à identificação de vários antígenos que podem ser úteis no desenvolvimento de métodos de diagnóstico melhorados para discriminar entre o complexo MTB e MNT. Vários antígenos produzidos por MTB têm sido alvo para o desenvolvimento de testes para diagnóstico da tuberculose dentre eles: MPT64, MPT32, ESAT-6, CFP-10 e CFP-21 (KALRA *et al.*, 2010, MEHTA *et al.*, 2012, SINGHT *et al.*, 2003).

Este trabalho teve como objetivo produzir anticorpos monoclonais frente antígenos MPT64 de *M. tuberculosis* para compor novo kit ELISA sanduiche indicado para o diagnóstico diferencial de infecções de *M. avium* e *M. tuberculosis*, baseado na utilização dos anticorpos monoclonais anti-MPT64-Mtb (a produzir) e anti-APA de *M. avium* (produzidos anteriormente no LBR). O objetivo específico desse trabalho foi eleger os hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais específicos que sejam uteis para detecção de MPT64 em sobrenadantes de cultura de *M. tuberculosis* isoladas dos pacientes com tuberculose.

Para produção dos anticorpos monoclonais foi utilizada a tecnologia de hibridomas a partir de camundongos imunizados com o antígeno recombinante de Mtb (rMPT64). Hibridomas específicos gerados foram capazes de produzir anticorpos monoclonais específicos contra a proteína rMPT64. Após, série de subclonagem realizadas para garantir a monoclonalidade do anticorpo, somente um hibridoma estável, 6C/9, mostrou-se capaz de produzir anticorpos monoclonais anti-MPT64.

Para obter altas concentrações na produção dos anticorpos monoclonais, o hibridoma 6C/9 foi utilizado para induzir um processo cancerígeno associado ao acúmulo do fluido ascítico na cavidade peritoneal dos camundongos, resultando uma concentração elevada de anticorpos em comparação aos sobrenadantes de culturas (SILVA *et al.*, 2003). Assim, os mAbs foram produzidos dessa forma e após a coleta do líquido ascítico, o título dos anticorpos foi definido pelo ELISA de 1:1500.

Para verificar possibilidade de utilização do Mab produzido para detecção da proteína MPT64 em sobrenadantes de culturas de diferentes espécies de micobactérias, sendo de *M.tuberculosis*, *M.avium* e *M. kansasii*, utilizamos a técnica de *Western Blotting*. O Mab 6C/9 reconheceu a isoforma da proteína rMPT64 com uma banda de 24kDa somente nas culturas de cepas de MTB e não nas culturas de *M.avium* ou *M. kansasii*.

Como método de isolamento do antígeno MPT64 dos sobrenadantes de culturas de micobactérias foi utilizada cromatografia por afinidade sendo utilizado o nosso anticorpo monoclonal anti-MPT64 produzido. O teste revelou um pico de absorvância nas amostras dos sobrenadantes de cultura de *M. tuberculosis* que continha o antígeno MPT64 e ausência de picos nas amostras de culturas de *M. avium* e *M. kansasii* que não continham o antígeno, confirmando a eficiência do anticorpo produzido na captura do antígeno MPT64 quando ele está presente no sobrenadante de cultura.

Estes resultados demonstram que o Mab produzido é útil para diferenciar cepas MTB de espécies MNT mais prevalentes entre pacientes com doença pulmonar (micobactérias de complexo *M. avium* ou *M. kansasii*), através de detecção e captura do antígeno secretado pelas cepas Mtb em culturas de bactérias isoladas.

Mediante o exposto, os anticorpos monoclonais anti-MPT64 que foram produzidos nesse trabalho podem ser utilizados como uma ótima ferramenta para compor o kit de ELISA para diagnóstico diferencial das infecções por *M.tuberculosis* e *M.avium*.

Estudo realizado por Ji *et al.*, (2014), usando anticorpos monoclonais anti-MPT64 desenvolveu ELISA sanduíche quantitativo altamente sensível para detectar proteína MPT64 secretada pelo *M. tuberculosis*. Este ELISA pode medir a quantidade da proteína MPT64 secretada em sobrenadante de cultura da micobactéria. Já Liu *et al.*(2012) desenvolveram ELISA anti-MPT64 utilizando um par de anticorpos policlonais, e seu limite de detecção mostrou-se inferior ao estudo desenvolvido por Ji *et al.*(2014). Uma possível explicação para isso é que os anticorpos monoclonais anti-MPT64 usados para o ELISA sanduíche tem uma afinidade maior que os anticorpos policlonais.

Com base nesses estudos nossa perspectiva é produzir um par de anticorpos monoclonais, um como anticorpo de captura e outro como anticorpo de detecção, sendo mais apropriado na produção de um kit de diagnóstico ELISA sanduíche. Por enquanto, nós conseguimos produzir um anticorpo monoclonal (um hibridoma anti-MPT64). Entretanto, o trabalho de geração de outro hibridoma está em andamento e será finalizada.

7. CONCLUSÃO

- ✓ Foi produzido um hibridoma estável, devidamente conservado, produtor de anticorpos monoclonais sendo capazes de reconhecer especificamente o antígeno MPT64 (24kDa) em sobrenadante de cultura de *M. tuberculosis* (Mtb) e não de *M. avium* ou *M. kansasii* em testes imunológicos (ELISA, Western blotting e cromatografia de afinidade);
- ✓ O anticorpo monoclonal anti-MPT64 reconheceu a proteína MPT64 no sobrenadante de cultura de cepa laboratorial de *M. tuberculosis* (H37Rv), quanto o isolado clínico obtido de paciente com TB;
- ✓ O anticorpo monoclonal produzido pode ser utilizado na cromatografia por afinidade para isolamento e purificação do antígeno MPT64 do sobrenadante de cultura MTB;
- ✓ O anticorpo monoclonal anti-MPT64 produzido neste trabalho (Mab 6C/9) pode ser utilizado como o anticorpo de detecção num kit ELISA sanduiche para identificação de MTB em culturas isoladas dos pacientes com doença pulmonar. Em combinação com os anticorpos anti-APA de *M. avium*, que foram produzidos anteriormente, os anticorpos anti-MPT64 podem compor novo kit ELISA sanduiche para diferenciação entre a Mtb e *M. avium* nas culturas de bactérias isoladas dos pacientes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. *et al.* **Imunologia celular e molecular**. 9ª ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara koogan; 2019. 576 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção à assistência a saúde. módulo 7: detecção e identificação de micobactérias de importância clínica. Brasília, DF, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção à assistência a saúde. Módulo 7: Detecção e identificação de micobactérias de importância clínica. Brasília, DF, 2013.

ARANAZ A, *et al.*, Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprea* Aranaz, 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae*. **Int J Syst Evol Microbiol** 53: 1785-9. 2003.

ARBEX, M. A. *et al.*, Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 1: fármacos de primeira linha. **J. bras. pneumol.**, São Paulo , v. 36, n. 5, p. 626-640, Oct. 2010 .

AROSA, F. A. e CARDOSO, E. M. **Técnicas de Imunologia**. In: Arosa, F. A. *et al.* (Eds). *Fundamentos de Imunologia*. Edição 2. Lisboa, LIDEL, 2012. pp. 565-597.

BANDER, N. H. (1987). Monoclonal antibodies in urologic oncology. **Cancer**, 60, 1987 pp.658-667. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19870801\)60:3+%3C658::AID-CNCR2820601536%3E3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19870801)60:3+%3C658::AID-CNCR2820601536%3E3.0.CO;2-T)

BOEHME, C. C., *et al.* Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. **The new England journal of medicine**, New England, v.363, p.1005-1015, September/2010. DOI: 10.1056/NEJMoa0907847

BONA M. G. M. *et al.*, Análise de restrição enzimática do gene hsp65 de isolados clínicos de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar em Teresina, *Jornal brasileiro de pneumologia*, Piauí. v. 37, n.5, p. 628-635, set-out/2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132011000500010>

BRASIL. Departamento de vigilância epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília, 2011.

CAMPOS, H. S. Manejo da doença micobacteriana não tuberculosa. Rio de Janeiro. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 8 n. 2, 2000.

CARNEIRO, M. DOS S., *et al.* Doença pulmonar por micobactérias não tuberculosas em uma região de alta incidência de tuberculose no Brasil, **Revista brasileira de pneumologia**, Porto Alegre, v.44, n.2, p. 106-111, março/2018.

CERCA P.A.R. **Identificação de micobactérias não tuberculosas através de métodos moleculares não comerciais**. 2010. 121p. Tese (Mestrado em ciências biomédicas)- Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

CHADHA VK. Progress towards millennium development goals for TB control in seven Asian countries. **Indian J Tuberc.** 2009 Jan;56(1):30–43.

CHEEVER, H.*et al.*, **Brunner e Suddarth: tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 13ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

COELHO, J. T. A. **Anticorpos monoclonais**. 2014.p.91 Tese (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

COSTA, G. V. CALHEIROS DE O. *et al.* Prevalência de tuberculose pulmonar e sintomas respiratórios em um hospital psiquiátrico de referência em Alagoas. **Revista brasileira promoção saúde**, Fortaleza, v.28. n.4, p.521-528, out-dez. 2015.

COWMAN, S., WILSON, R., LOEBINGE, M.R. (2012). Opportunistic mycobacterial diseases. *Infection*. 40 (supple 6), 346-348.

DUARTE R, *et al* . Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. **Revista Portuguesa de Pneumologia**.
Vol XVI N.º 4 Julho/Agosto 2010

GAGNEUX S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Nature reviews / microbiology**, v.16, 2018.

GASPAR, J. A. *et al.* Isolamento e identificação das micobactérias em águas tratadas provenientes do sistema de abastecimento de Araraquara, **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v.23, n.1, p.147-155, 2012.

FARIA S., JOAO I., JORDÃO L., General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. *Journal of Pathogens*, v. 2015, ID809014, 10 p.

GENNARO M. L: Diagnóstico Imunológico da Tuberculose. **J Infect Dis. Proceedings of International Symposium on Tuberculosis Vaccine Development and Evaluation**. 2000, 30 (3): 243-246.).

GODING, J.W. **Monoclonal antibodies: principles and practice.**, 3ed. San Diego: Academic press, 1996.

GOES, M. A. *et al.* A utilização dos anticorpos monoclonais no tratamento e no diagnóstico de doenças. 2017. Disponível em: <https://servicos.unitoledo.br/repositorio/bitstream/7574/129/1/Mirela%20e%20Jhenifer.pdf>

GOMES, M. J.P. Gênero *Mycobacterium* spp. **FAVET-UFRGS**, Rio Grande do Sul, 2013.

GÓMEZ, N.A. Micobacterias no tuberculosas: una infección emergente? **Na. Pediatr.** 71 . 2009. (supple 3), 185-188.

HALSTROM S. *et al.* Review: environmental mycobacteria as a cause of human infection, **Int. J. Mycobacteriol**, Austrália,. v.4, n.2, p.81-91, apr/2015. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2015.03.002

JI M, *et al.*, Development of a Quantitative Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting the MPT64 Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. **Yonsei Med J.** 2014 May;55(3):746-752. <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.3.746>

KIM S.Y., *et al.* Distribution and clinical significance of *Mycobacterium avium* complex species isolated from respiratory specimens. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** v.88, n.2, p.17-88, mar 2017. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2017.02.017

KLEINNIJENHUIS J, *et al.*, Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. ***Clin. Dev. Immunol.*** ID 405310: 1-12, 2011

KORKEGIAN A, *et al.*, Mutations in the essential arabinosyltransferase EmbC lead to alterations in Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. ***J. Biol. Chem.*** 2014.

KUMAR, VG, Urs, TA & RANGANATH, RR MPT 64 Antigen detecção para a confirmação rápida de isolados de *M. tuberculosis*. ***BMC Res Notes*** 4, 79 (2011). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-79>

LASSOUNSKAIA, E. ; SOUZA, G. S. . kit de imunodiagnóstico da paratuberculose através de fezes de ruminantes e processo de tratamento das amostras fecais. 2015,Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150051425. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 30/01/2015; Depósito PCT: 30/01/2015.

LENZ, G. **Métodos imunológicos**; biofísica, 2004.

LIMA A. F, SANTOS A. F. S. Tuberculose Pulmonar e a formação do Granuloma: Uma Revisão da Literatura. ***Ciências Biológicas e de Saúde***, 2017. V.4, n.2, 111-124.

LIMA T. M. de *et al.* Teste rápido molecular genexpert mtb/rif para diagnóstico da tuberculose. ***Revista pan-amazônica de saúde***, São Paulo, v.8, n.2, p.1-12, jun/2017. DOI: 10.5123/S2176-62232017000200008

LIMA, A. S. **Fatores e espécies de micobactérias não tuberculosas associadas aos casos de micobacterioses pulmonar e extrapulmonar no estado de Pernambuco**. 2013. Tese (Doutorado acadêmico em saúde pública) - centro de pesquisas aggeu magalhães, fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

LIU, Z., ZHU, C., YANG, H. *et al.* Clinical Value of ELISA-MPT64 for the Diagnosis of Tuberculous Pleurisy. ***Curr Microbiol*** 65, 313–318 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0157-9>

KALRA M., KHULLER G. K., GROVER A., BEHERA D., WANCHU A., VERMA I. **Utility of a combination of RD1 and RD2 antigens as a diagnostic marker for**

tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 66 (2) (2010), pp. 153-161.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.09.005>

MARQUES, C. H. **Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica.** 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

MAURYA A. K., *et al.* Evaluation of an immunochromatographic test for discrimination between *mycobacterium tuberculosis* complex & non tuberculous mycobacteria in clinical isolates from extra-pulmonary tuberculosis. **The Indian Journal of Medical Research**, v.135, n.6, p. 901-906, jun/2012. PMID:PMC3410218

MILHEIRO F. D. R. A Tuberculose Desde os Seus Primórdios em Portugal e no Mundo. **Faculdade de medicina universidade do porto**, 2016.

MILSTEIN, C. (1988). **monoclonal antibodies.** *sc. amer.*, p.243: 56.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretária de vigilância em saúde. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias.** Brasília DF, 2008. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculosis_e.pdf

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de vigilância em saúde: **manual de recomendações para o controle da tuberculose no brasil.** Brasília: ministério da saúde; 2019. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf

MOREIRA, A. da S. R., *et al*, Performance comparison between the mycobacteria growth indicator tube system and löwenstein-jensen medium in the routine detection of mycobacterium tuberculosis at public health care facilities in rio de janeiro, brazil: preliminar results of a pragmatic clinical trial. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Rio de Janeiro, v.39, n.3, p-365-367, may-jun/2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132013000300014>

MURRAY P.R. *et al.* **Microbiologia médica.** 3° ed. Guanabara koogan. 2014.

NISHIUCHI Y. *et al.* Fontes de infecção de um patógeno micobacteriano não tuberculoso comum, complexo *mycobacterium avium*. **Frontier in Medicine**, Japan, v.4, n.27.mar/2017. DOI:10.3389/fmed.2017.00027

OI, V. T., HERZENBERG, L.A. (1980) **immunoglobulin- producing hybrid cell lines. in selected methods immunology**, 351-372. h.w. freeman, new york.

ORIKIRIZA P, *et al.* Evaluation of the sd bioline tb ag mpt64 test for identification of *mycobacterium tuberculosis* complex from liquid cultures in southwestern Uganda, **African Journal of laboratory medicine**, Uganda, v.6, n.2, p.383,mar/ 2017. DOI: 10.4102/ajlm.v6i2.383

ANDERSEN P. , *et al.*, **Proteins released from Mycobacterium tuberculosis during growth Infect Immun.**, 59 (6) (1991), pp. 1905-1910

MEHTA P. K., KALRA M., KHULLER G. K., BEHERA D, VERMA I **Development of an ultrasensitive polymerase chain reaction-amplified immunoassay based on mycobacterial RD antigens: Implications for the serodiagnosis of tuberculosis** *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 72 (2) (2012), pp. 166-174 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.10.010>

PEDRO, H.S.P., *et al.*, Nontuberculous mycobacteria isolated in São José do Rio Preto, Brazil Between 1996 and 2005. **J. Bras. Pneumol.**34 2008. (supl 11), 950-95.

PNEUMOLOGIA PAULISTA. **Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia.** Tuberculose e outras micobacterioses, v. 22. São Paulo, 2009.

PNEUMOLOGIA PAULISTA. **Uma publicação da Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia.** *Pneumologia*, v. 29. São Paulo, 2016.

RIVAS S. B., *et al.*, 2005. The cellular immune response in pulmonary tuberculosis. **Invest Clin** 46 (4): 391-412.

ROLLA, V. Tuberculose. In: INSTITUTO DE PESQUISA CLINICA EVANDRO CHAGAS, 2013, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** Rio de Janeiro: IPEC/FIOCRUZ, 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/tuberculose>.

SANTOS, M. dos, *et.al*, Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development, **Brazilian journal of pharmaceutical sciences**, São Paulo, v.54(special), nov/2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001007>

SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: **centro de vigilância epidemiológica**; 2005. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/tuberculose/doc/tb11_3mntsb.pdf

SENNA S.G. *et al*. Identification of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical sterile sites in patients at a university hospital in the city of rio de janeiro, Brazil. **j bras Pneumol.**, v.37, n.4, p.521, jun/2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132011000400015>

SILVA W. D. da; MOTA I. **Bier Imunologia básica e aplicada**.5ªed. Rio de Janeiro: guanabara koogan, jan/2003. SOUZA E.P., *et al.*,. Prevenção e controle da tuberculose: revisão integrativa da literatura. **Rev Cuid** 2015; 6(2): 1094-102

SOUZA G.S. *et al*. Apa antigen of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as a target for species-specific immunodetection of the bacteria in infected tissues of cattle with paratuberculosis. **Veterinary Immunoly and immunopatholy**, v.143, n1-2, p.75-82, sep/2011 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.026>

SOUZA G.S., *et al*. Identification of the apa protein secreted by mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as a novel fecal biomarker for johne's disease in cattle. **Pathogens and disease**, v.76, n.6, aug/ 2018. DOI: [10.1093/femspd/fty063](https://doi.org/10.1093/femspd/fty063)

TORTOLI E., Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus Mycobacterium. **Clinical Microbiology Reviews**, Milan, v.27, n.4, p.727-752, oct/2014. DOI: [10.1128/CMR.00035-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14)

VAN ZELLER M., *et al*. Nontuberculous mycobacteria - presentation,diagnosis and response to treatment. **Rev. Port. Pneumol**, Porto, v.19, n.1, pp.49-50, fev/2013. DOI: [10.1016/j.rppneu.2012.04.005](https://doi.org/10.1016/j.rppneu.2012.04.005)

WANG Z, *et al.*, a estrutura da solução do antígeno MPT64 de *Mycobacterium tuberculosis* define uma nova família de proteínas Beta-Grasp. **J Mol Biol.** 2007, 366 (2): 375-381. [10.1016/j.jmb.2006.11.039](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.039)

WILDNER, L. M. *et al.* Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. Revista de patologia tropical, Florianópolis, v.40, n.3, p.207-230, jun/2011. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/63/o/2011_40_3_207_229.pdf

World health organization (who), Disponível em: <http://www.who.int> (acessado em junho 2019)

World health organization. use of liquid tb culture and drug susceptibility testing (dst) in low and medium income settings. **geneva: world health organization; 2007**

YAMAGUCHI R, *et al.*, Clonagem e caracterização do gene para a proteína imunogênica MPB64 de *Mycobacterium bovis* BCG. **Infect Immun.** 1989, 57 (1): 283-288).

YEW W.W., LANGE C. Treatment of tuberculosis: update 2010. **European respiratory journal.**2010