

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
MEDICINA VETERINÁRIA

Eduarda Laís Munari

**FERRAMENTAS PARA A CONSTRUÇÃO DE UM ENSAIO SOROLÓGICO
UTILIZANDO A PROTEÍNA sMTL-13 DO *Mycobacterium tuberculosis***

Curitibanos

2021

Eduarda Laís Munari

**FERRAMENTAS PARA A CONSTRUÇÃO DE UM ENSAIO SOROLÓGICO
UTILIZANDO A PROTEÍNA sMTL-13 DO *Mycobacterium tuberculosis***

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Medicina Veterinária do Centro de Ciências
Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito para a obtenção do título de Médica Veterinária.
Orientador: Prof. DSc. Álvaro Menin

Curitibanos

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Laís Munari, Eduarda
FERRAMENTAS PARA A CONSTRUÇÃO DE UM ENSAIO SOROLÓGICO
UTILIZANDO A PROTEÍNA sMTL-13 DO Mycobacterium
tuberculosis / Eduarda Laís Munari ; orientador, Álvaro
Menin, 2021.
53 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária,
Curitibanos, 2021.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. I. Menin, Álvaro . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

Eduarda Laís Munari

**FERRAMENTAS PARA A CONSTRUÇÃO DE UM ENSAIO SOROLÓGICO
UTILIZANDO A PROTEÍNA sMTL-13 DO *Mycobacterium tuberculosis***

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária

Curitiba, 18 de maio de 2021.

Prof. Malcon Andrei Martínez-Pereira, DSc.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Álvaro Menin, DSc
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Aline Félix Schneider Bedin
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr^a. Carolina Reck
Avaliadora
VERTÁ, Instituto de Pesquisa e Diagnóstico

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas de bom coração que contribuíram para a minha formação, em especial ao Cadu e Sodom que despertaram em mim a vontade de seguir nesta profissão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela vida maravilhosa, pelos familiares, pelos amigos e por todas as dificuldades que enfrentei até chegar aqui. Segundamente gostaria de agradecer a minha família por todas as oportunidades e incentivos, em especial a minha mãe e ao meu padrasto que não mediram esforços para me incentivarem a correr sempre atrás dos meus objetivos, obrigada por nunca duvidarem de mim e da minha capacidade. Vocês mais do que ninguém, acreditaram em mim e no meu potencial.

Ao meu companheiro de longa data, o Bruno, que esteve ao meu lado durante a graduação inteira. Mesmo com a distância desses últimos dois anos, você sempre esteve presente dando apoio e me fazendo rir. Obrigada por tudo! Principalmente por cuidar tão bem de mim e dos nossos cães (Cadu e Sodom), que agora devem estar morrendo de saudades de nós dois.

Aos professores da Universidade Federal de Santa Catarina por todo o conhecimento compartilhado e tempo de qualidade investidos em nós alunos de graduação, serei eternamente grata por tanto. Em especial a professora Evelyn Winter que me orientou por dois anos na iniciação científica e hoje é responsável pela minha tendência a pesquisar, fazer experimentos, estudar técnicas e a organização, obrigada de coração. Ao professor Álvaro Menin que topou me orientar nessa fase final e me mostrou o Laboratório de Imunobiologia (LIDI), do qual eu sou extremamente apaixonada. Obrigada professor! Por ter imaginado para mim o melhor futuro que eu poderia ter. Vou levar os seus ensinamentos e falas sempre no meu coração.

Ao pessoal do LIDI: Yonne, Aline, Fabi, Juliano, Sérgio, Natana, Nika, Bianca, Carol, Mendes, Greicy, Luci, Dina e o Filho. Aos professores André Báfica e Daniel Mansur. Não consigo descrever o quanto sou grata por tudo que me ensinaram, por todas as conversas e puxões de orelha. Vocês são incríveis, admiro todos! Nunca vi tanto sentido como agora na frase dita por Isaac Newton “Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Agradeço em especial a Ruth, minha musa inspiradora, rainha do Nilo, diva de todos os oceanos. Foi o ser humano mais incrível que conheci nesse tempo inteiro de estágio, sinto que a nossa ligação ultrapassa essa vida. Com toda a paciência do mundo, me ensinou tudo do zero e apostou em mim todas as fichas. Pode ter certeza que para sempre vou ser uma “Ruthiêti” que volta o volume das pipetas, que lava a louça que sujou, deixa tudo organizado e que expressa e purifica uma proteína como ninguém. Já sinto falta de você antes mesmo de partir.

As minhas melhores amigas, Gi e Fer, duas mulheres maravilhosas que completaram a minha vida. Vou guardar vocês para sempre dentro do meu coração. Eu poderia escrever aqui

um TCC inteiro falando só como não amar vocês. Obrigada por todo companheirismo e brigas! Sentirei falta dos nossos sofrimentos, desabafos, apuros e brincadeiras, sem vocês com toda certeza esse caminho não teria tanto sentido. Já imagino o futuro de vocês e sei que serão incríveis profissionais.

Ao eterno Clube do Pi, composto nada mais nada menos que Jean, Arthur, Alex e Vini (além de mim, da Fer e Gi). Vocês são chatos, teimosos, preguiçosos, mas eu sinto um amor imenso por vocês. Mesmo que agora vocês ignorem mais que antes, mas sou muito grata pela nossa amizade. Da faculdade para vida, independente do lugar que cada um esteja.

A minha *roommate* Maria Cláudia (Mah), que me fez rir todos os dias com suas histórias, dancinhas e comidas gostosas cheias de tempero (segundo ela é para dar um *tasty*). Obrigada por me fazer tão feliz!

A todas as outras pessoas que eu não mencionei, aos amigos que fiz a curto prazo e as amizades que acabei perdendo ao longo da graduação. Tenho certeza que levarei um pouco de vocês dentro do meu coração.

E por último e não menos importante Cadu e Sodom, dos quais são responsáveis pela minha mudança súbita de profissão, obrigada por despertarem em mim a vontade de ser uma futura Médica Veterinária.

“É necessário sair da ilha para ver a ilha, não nos vemos se não saímos de nós”.

(SARAMAGO, 1998).

RESUMO

A tuberculose bovina (bTB) é uma importante enfermidade infectocontagiosa causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium bovis*. Em vários países, inclusive no Brasil, os programas de controle da bTB se baseiam na resposta de um teste intradérmico, que tem como característica avaliar uma resposta de hipersensibilidade tardia após a inoculação de um antígeno micobacteriano (PPD). No entanto, os mesmos são considerados limitados quanto a sua especificidade e sensibilidade. Diante disso, é sabido que o diagnóstico intradérmico sozinho não é uma ferramenta segura para detectar todos os animais positivos no rebanho bovino, sendo necessário outros ensaios auxiliares para o controle e erradicação da bTB. Neste sentido, buscou-se avaliar ferramentas para a construção de um ensaio de ELISA, utilizando uma proteína altamente antigênica de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) que possui aproximadamente 100% de identidade com *Mycobacterium bovis*. A lectina de 13 kDa secretada por *Mtb* (sMTL-13) em estudos anteriores demonstrou ser um importante antígeno para a utilização em testes diagnósticos por induzir respostas imunes celulares e humorais. Com base nisso, avaliou-se a concentração de amostras da proteína sMTL-13, bem como a especificidade de anticorpos anti-HIS e anti-sMTL-13 purificado para a detecção da proteína através do ensaio de *Immunoblotting*. Além disso, realizou-se a imunização de camundongos com a finalidade de obter os soros pré-imune e imune. Todas essas etapas em conjunto servirão como elementos para a padronização de um teste de ELISA. Esse teste diagnóstico nacional com alta especificidade, sensibilidade e alta capacidade de testagem, futuramente poderá complementar a tuberculinização no programa de erradicação da bTB.

Palavras-chave: BAAR. ELISA. Lectina.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (bTB) is an important infectious disease caused by the intracellular bacteria *Mycobacterium bovis*. In several countries, including Brazil, bTB control programs are based on the response of an intradermal test, which has the characteristic of evaluating a delayed hypersensitivity response after the inoculation of a mycobacterial antigen (PPD). However, they are considered limited in terms of their specificity and sensitivity. Therefore, it is known that intradermal diagnosis alone is not a safe tool to detect all positive animals in the bovine herd, requiring other auxiliary tests for the control and eradication of bTB. In this sense, we sought to evaluate tools for the construction of an ELISA assay, using a highly antigenic protein from *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that has approximately 100% identity with *Mycobacterium bovis*. The 13 kDa lectin secreted by *Mtb* (sMTL-13) in previous studies has been shown to be an important antigen for use in diagnostic tests for inducing cellular and humoral immune responses. Based on this, the concentration of samples of the sMTL-13 protein was evaluated, as well as the specificity of purified anti-HIS and anti-sMTL-13 antibodies for the detection of the protein through the Immunoblotting assay. In addition, mice were immunized in order to obtain pre-immune and immune sera. All of these steps together will serve as elements for the standardization of an ELISA test. This national diagnostic test with high specificity, sensitivity and high testing capacity, in the future may complement tuberculinization in the bTB eradication program.

Keywords: BAAR. ELISA. Lectin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global da tuberculose bovina de janeiro de 2017 a junho de 2018.....	18
Figura 2. Número de casos de Tuberculose Bovina notificado por Unidade Federativa (UF) de 2014 a 2018.	19
Figura 3. Ilustração da estrutura e constituintes celulares do granuloma tuberculoso.	21
Figura 4. Coloração de Ziehl-Neelsen evidenciando a presença de bacilos álcool-ácidos-resistentes (BAAR).....	24
Figura 5. Colônias bacterianas do agente <i>Mycobacterium bovis</i>	25
Figura 6. Desenho Experimental.	35
Figura 7. Representação esquemática do protocolo de imunização.	38
Figura 8. Curva-padrão (BSA)	39
Figura 9. Análise da proteína liofilizada ressuspensa com salina por <i>Western Blot</i>	41
Figura 10. Marcação proteína com anticorpo anti-sMTL13 purificado.	42
Figura 11. Análise do soro pré-imune por <i>Western Blot</i>	43
Figura 12. Avaliação do soro imune 14º dia e 21º dia.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Interpretação do Teste Cervical Simples em bovinos.....	28
Tabela 2. Interpretação do Teste Cervical Comparativo em bovinos.....	28
Tabela 3. Potenciais causas de resultados falso-negativos no teste tuberculínico em rebanhos bovinos	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ag 85 – Complexo Antígeno 85
- BAAR – Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
- BCA – Ácido Bicinconínico
- BME – Mercaptoetanol
- BSA – Albumina do Soro Bovino
- bTB – Tuberculose Bovina
- BVD – Diarreia Viral Bovina
- CCB – Centro de Ciências Biológicas
- CFP – Proteínas de Filtrado de Cultura
- CFP10 – Proteína de filtrado de cultura de 10 kDa
- Cu – Cobre
- DCs – Células Dendríticas
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DNTPs – Deoxinucleotídeos
- ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- ESAT-6 – Antígeno de secreção primária de 6 kDa
- HCl - Ácido Clorídrico
- HRP - Enzima Peroxidase de Rábano Silvestre
- HSP – Proteína de Choque Térmico de 65 kDa
- IFN- γ – Interferon-gama
- IgG – Imunoglobulina G
- IL – Interleucinas
- kDa – Quilodalton
- LIDI – Laboratório de Imunobiologia
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I e II
- MIP – Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
- MNT – Micobactérias não tuberculosas
- MPB 83 – Proteína de *M. bovis* de 26 kDa
- MPB70 – Proteína de *M. bovis* de 24 kDa

MR – Receptor de Manose

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

MTBC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

NK – Células NK (do inglês *Natural Killers*)

OIE – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal

PPD – Proteína Purificada Derivada

R² – Coeficiente de Determinação

RD7 – Região de Diferenciação 7

RNA – Ácido Ribonucleico

RT – Reagente de Trabalho

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio

sMTL-13 – Lectina secretada de *Mycobacterium tuberculosis* de 13 kDa

SP – Peptídeo Sinal

TA – Temperatura Ambiente

TBS - Solução Salina Tamponada com Tris

TBST - Solução Salina Tamponada com Tris e Tween 20 a 0,1%

TCC – Teste Cervical Comparativo

TCH – Hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico

TCS – Teste Cervical Simples

Th1 – Resposta T helper 1

Th2 – Resposta T helper 2

TLR – Receptores do tipo *Toll* (do inglês *Toll-like receptor*)

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TPC – Teste da Prega Caudal

USDA – Departamento de Agricultura dos EUA

WB – *Western Blot*

ZN – Ziehl-Neelsen

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	TUBERCULOSE BOVINA	Erro! Indicador não definido.
2.1	ETIOLOGIA.....	17
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.3	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	20
2.4	IMUNIDADE	22
2.5	DIAGNÓSTICO	23
2.5.1	Diagnóstico Direto	23
2.5.1.1	<i>Exame Microscópico</i>	<i>23</i>
2.5.1.2	<i>Cultura.....</i>	<i>24</i>
2.5.1.3	<i>Diagnóstico Molecular</i>	<i>26</i>
2.5.2	Diagnóstico Indireto	27
2.5.2.1	<i>Teste Intradérmico.....</i>	<i>27</i>
2.5.2.2	<i>Ensaio Interferon-Gamma.....</i>	<i>30</i>
2.5.2.3	<i>ELISA.....</i>	<i>31</i>
2.6	CONTROLE E TRATAMENTO	32
2.7	PROTEÍNA sMTL-13	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	DESENHO EXPERIMENTAL	Erro! Indicador não definido.
5	MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
5.1	COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS.....	36
5.2	LOCAL DO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO.....	36
5.3	AMOSTRAS	Erro! Indicador não definido.
5.4	QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA sMTL-13	36

5.5	<i>WESTERN BLOT</i>	36
5.5.1	Eletoforese em gel de poliacrilamida	37
5.5.2	Transferência eletroforética	37
5.5.3	<i>Immunoblotting</i>	37
5.6	IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS E CONSTRUÇÃO DO POOL DE AMOSTRAS	38
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1	CONCENTRAÇÃO PROTEÍNA SMTL-13.....	39
6.2	ANTIGENICIDADE	40
6.3	AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS SOROS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOT</i>	42
7	PERSPECTIVAS	44
8	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (bTB) é uma doença infectocontagiosa, zoonótica, causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium bovis*, cujo hospedeiro primário é o bovino (OIE, 2018). Esta enfermidade constitui um grave problema de saúde pública e acarreta prejuízos econômicos para a bovinocultura no Brasil. Com o objetivo de assegurar a sanidade da população e do rebanho, são realizados todos os anos cerca de dois milhões de exames para o diagnóstico da tuberculose (BRASIL, 2020).

O teste padrão para a detecção da bTB foi instaurado em 2001, através do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Conforme o PNCEBT, o controle e a erradicação da tuberculose são baseados na aplicação intradérmica da tuberculina e subsequente abate dos animais positivos, visando reduzir a prevalência e a incidência desta enfermidade (BRASIL, 2006). Entretanto, 20 anos após a implantação do PNCEBT, nenhum estado brasileiro foi declarado livre de tuberculose bovina. (BRASIL, 2020).

A persistência da doença se deve em parte à falta de uma compreensão da resposta imune ao patógeno *M. bovis* e a ineficácia do teste padrão (WHELAN *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2017). Pois o mesmo tem demonstrado sensibilidade (27-74%) e especificidade (72-88%) variáveis, das quais podem ser resultado de diversas questões, tais como energias, reações cruzadas, doses da tuberculina, preparações da PPD (*Purified Protein Derivative*), local de aplicação e esquemas de interpretação (MONAGHAN *et al.*, 1994; LYASHCHENKO *et al.*, 2017; GOOD; DUIGNAN, 2011).

Diante disso, é sabido que o diagnóstico intradérmico sozinho não é uma ferramenta segura para detectar todos os animais positivos no rebanho, sendo necessário outros ensaios auxiliares para o controle e erradicação da bTB. Logo, diversos estudos apontam que a utilização de antígenos e ensaios sorológicos, são eficientes por possuírem uma sensibilidade e/ou especificidades superior em comparação a técnica oficial de diagnóstico (CASAL *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019; WATERS *et al.*, 2011; WHELAN *et al.*, 2011).

Dentre esses ensaios sorológicos, o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tem sido empregado para o diagnóstico da tuberculose bovina, pois trata-se de um teste que mede de forma específica a ligação entre anticorpos e antígenos através de valores numéricos. Permitindo uma conclusão diagnóstica mais objetiva quando comparada a reação de hipersensibilidade (AYDIN, 2015; SOUZA, 2013). Além disso, o mesmo ensaio viabiliza o

manejo com os animais, dada a facilidade da coleta da amostra e do procedimento de testagem (LYASHCHENKO *et al.*, 2017).

Diante da necessidade de novas ferramentas para o diagnóstico da bTB, avaliou-se a imunogenicidade de uma proteína denominada sMTL-13 (Lectina secretada de *M. tuberculosis* de 13 kDa), codificada pelo gene Rv1419 de *Mycobacterium tuberculosis* e apresenta homólogos conservados na cepa vacinal de *M. bovis* BCG (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Logo, esses dados sugerem a existência de um novo antígeno com potencial de uso em testes diagnósticos, tanto para a área animal quanto para a humana, do qual poderá ser empregado como um ensaio de vigilância de movimento, fronteira ou abate, bem como um teste suplementar ao teste cutâneo da tuberculina. Para isso, foram necessários empregar as técnicas de quantificação de proteínas bem como a avaliação da imunogenicidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O gênero *Mycobacterium* (pertence à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales e família Mycobacteriaceae) compreende mais de 170 espécies de micobactérias, que foram tradicionalmente divididas em: complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), Micobactérias Não Tuberculosas ou atípicas (MNT) e *Mycobacterium leprae* (bactéria causadora de Hanseníase, doença exclusiva de humanos) (GAGNEUX, 2018; BERNITZ *et al.*, 2021).

As MNTs são organismos tipicamente ambientais, sendo encontrados na água e solo, e podem infectar humanos e animais causando quadros pulmonares, cutâneos, ósseos e articulares. A grande maioria das micobactérias atípicas não são patogênicas, mas quase todas podem se comportar como oportunistas e, portanto, responsáveis pela doença na presença de condições predisponentes (TORTOLI, 2009). Dentre as espécies de importância, destaca-se o *Mycobacterium avium*, responsável por provocar reações inespecíficas à tuberculinização, dificultando o diagnóstico da tuberculose bovina (BRASIL, 2006).

O complexo MTBC é composto por um grupo de micobactérias geneticamente relacionadas (> 99% de identidade de sequência de nucleotídeos), que causam tuberculose em uma variedade de mamíferos (GAGNEUX, 2018). As espécies que integram este grupo são: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* e *M. microti* (RIOJAS *et al.*, 2018). Dentre elas, *M. bovis* é uma das principais espécies estudadas, por se tratar de um agente de grande importância para a saúde pública e pecuária, pois atinge uma variedade de hospedeiros como bovinos, humanos e outros mamíferos.

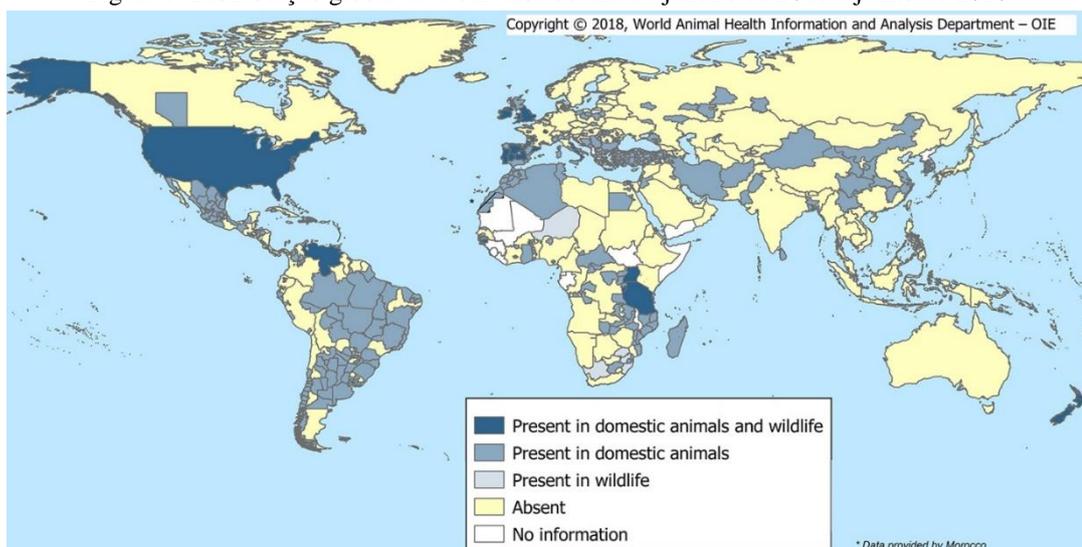
Mycobacterium bovis é uma bactéria intracelular facultativa, imóvel, com metabolismo aeróbico, não capsulado, não esporulado, não flagelado e não produtores de toxinas. Morfologicamente, caracterizam-se por apresentar formato de bastonete, medindo de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento. O patógeno pode ser isolado em meios sólidos de cultura, tais como *Lowenstein-Jensen*, *Stonebrink*, *Coletos Ossein*, *Ogawa Kudoh* e *Middlebrook 7H10* ou *7H11*. As culturas devem ser incubadas por um período de 8 a 12 semanas, a 37° C para a visualização das colônias bacterianas, que se apresentam com aspecto rugoso, bordas irregulares, com coloração esbranquiçada a amarelo-claro (BARLETTA; STEFFEN, 2017; OIE, 2018).

Em relação ao seu aspecto citoquímico, *M. bovis* e todas as outras bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* spp., apresentam uma estrutura de superfície celular incomum, caracterizada pela presença dominante de ácidos micólicos e uma ampla gama de lipídios. Este envelope lipídico ceroso, confere uma hidrofobicidade extrema, sendo capaz de reter corantes a base de carbolfucsina (fucsina misturada a fenol), mesmo após a lavagem com uma solução álcool-ácida. Esta propriedade associada à morfologia bacilar é o motivo pelo qual as micobactérias são denominadas de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (FUJIMOTO, 2010).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A infecção por *M. bovis* está disseminada em rebanhos bovinos em todo o mundo. De acordo com informações do banco de dados da Organização Mundial da Saúde (OIE), de janeiro de 2017 a junho de 2018, dos 188 países e territórios que relataram sua situação sanitária à OIE, 82 países (44%) foram afetados pela tuberculose bovina, o que demonstra uma distribuição generalizada da doença. Além disso, Dentro dessa porcentagem, 2,4% relataram bTB apenas em animais selvagens e 62,2% somente em animais domésticos (Figura 1) (MURAI *et al.*, 2019).

Figura 1. Distribuição global da tuberculose bovina de janeiro de 2017 a junho de 2018

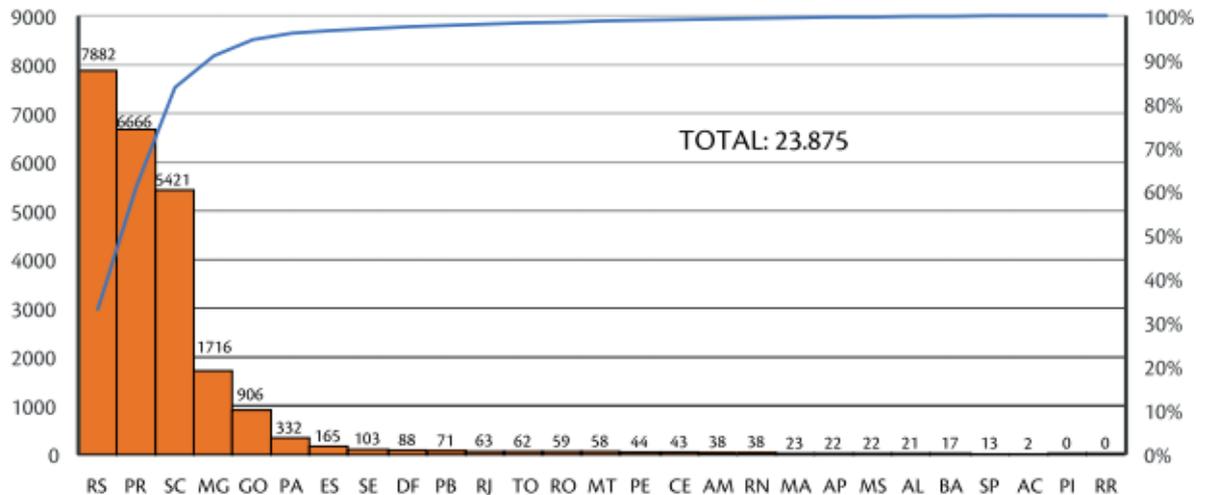


Fonte: MURAI *et al.*, (2019).

No Brasil, segundo um estudo epidemiológico de casos confirmados de tuberculose bovina no período de 1999 a 2017, foram notificados mais de 60 mil casos de bTB em todo

território nacional, com exceção de dois estados (OLIVEIRA, 2019). Outro levantamento publicado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), demonstrou que entre os anos de 2014 a 2018, a maioria das notificações de animais positivos concentravam-se na região Sul do País (85%) (Figura 2), corroborando com o estudo publicado por Oliveira (2019) (BRASIL, 2020; OLIVEIRA, 2019).

Figura 2. Número de casos de Tuberculose Bovina notificado por Unidade Federativa (UF) de 2014 a 2018.



Fonte: BRASIL (2020).

Estes dados sugerem que a tuberculose bovina é uma zoonose presente em todo território nacional, necessitando da implementação de medidas relevantes para prevenir e controlar a bTB, além de evitar a sua transmissão entre animais e humanos (OLIVEIRA, 2019; MURAI *et al.*, 2019).

A persistência da doença pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles: contato com animais selvagens, frequência de excreção, via de infecção, dose infecciosa, período de transmissibilidade e suscetibilidade do hospedeiro (GOOD; DUIGNAN, 2011). Somada a problemática que envolve a aquisição de animais assintomáticos, dos quais são responsáveis por favorecer a transmissão ou manutenção do agente infeccioso nos rebanhos bovinos, dificultando o controle da bTB (MENIN *et al.*, 2013).

A excreção respiratória e a inalação são aceitas como a principal via de transmissão da infecção em todas as espécies (GOOD; DUIGNAN, 2011; MENIN *et al.*, 2013). Esta forma de contaminação torna-se mais acentuada em rebanhos com alta densidade populacional como visto em criações intensivas e semi-intensivas (SOUZA, 2013). Estudos demonstram que uma

única unidade formadora de colônia (CFU) já é o suficiente para causar o quadro patológico em bovinos, facilitando a disseminação do bacilo entre os animais (DEAN *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a ingestão de alimentos contaminados contendo *M. bovis* pode ser considerada a segunda via mais comum de infecção. Outras vias de infecção, menos comuns, também são relatadas, tais como: oral, congênita, secreções (vaginal, uterina e sêmen) (GOOD; DUIGNAN, 2011).

Outro fator que implica na persistência de bTB na criação bovina é o contato com espécies selvagens. Diversos países já reportaram o isolamento de *M. bovis* em gambás (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia, em veados-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) em Michigan (EUA), búfalos asiáticos (*Bubalus bubalis*) na Austrália e em texugos (*Meles meles*) na Grã-Bretanha e na Irlanda (CORNER, 2006). No Brasil, poucos são os estudos envolvendo a ocorrência de micobactérias em animais selvagens. Albertti (2014) detectou em porcos monteiro (*Sus srofa*), veado campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) e quati (*Nasua nasua*) (ALBERTTI, 2014).

Em relação a transmissão zoonótica, a mesma pode ocorrer indiretamente pelo consumo de leite e produtos lácteos não pasteurizados ou diretamente pelo contato próximo a animais infectados (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010). Em países industrializados, onde realiza-se a pasteurização do leite, a tuberculose bovina não representa mais um risco para a população. No entanto, entre os trabalhadores da indústria pecuária e moradores do campo, o consumo de alimentos não inspecionados e a exposição a animais infectados ou suas carcaças, ainda são considerados riscos para a transmissão de bTB ao homem (LA RUA-DOMENECH, 2006).

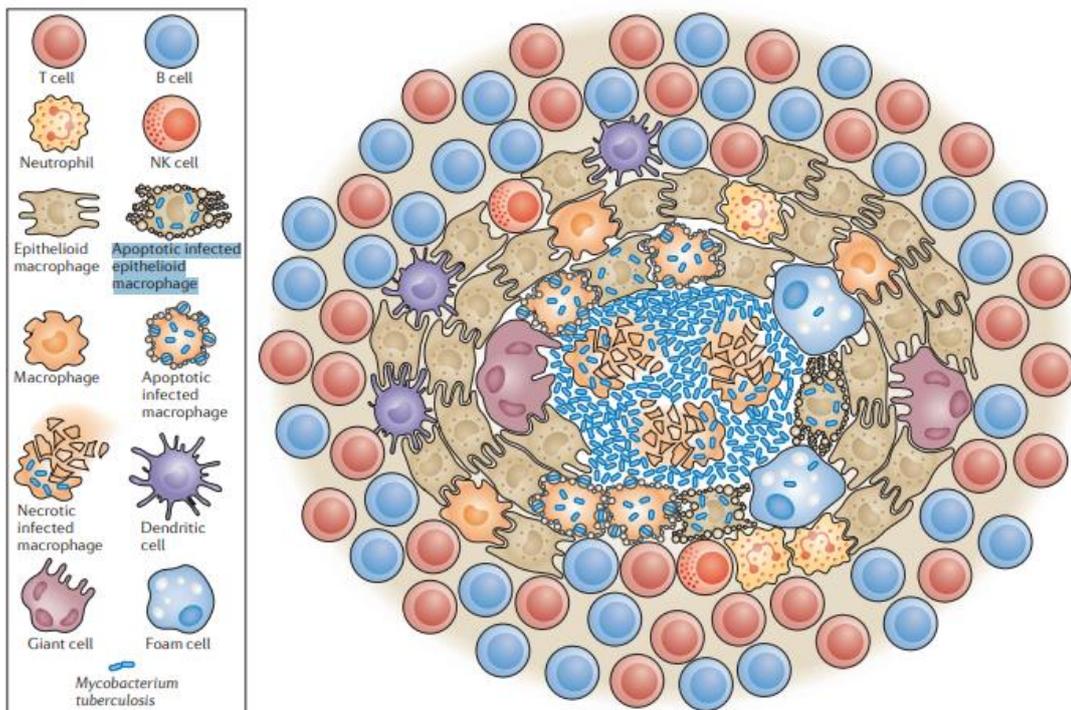
2.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

As espécies pertencentes ao complexo MTBC infectam o seu hospedeiro mamífero principalmente nos pulmões. Nesse órgão as micobactérias penetram na mucosa e em seguida são fagocitadas por macrófagos alveolares. Como mecanismo de defesa, estes microrganismos secretam alguns fatores de virulência, capazes de neutralizar a capacidade microbicida dos macrófagos. Alguns desses mecanismos são: resistência frente aos compostos tóxicos do hospedeiro, interrupção da progressão do fagossomo e prevenção da apoptose (FORRELLAD *et al.*, 2013; NEILL; BRYSON; POLLOCK *et al.*, 2001).

A fagocitose causa uma reação inflamatória localizada e o recrutamento de células mononucleares (principalmente monócitos) dos vasos sanguíneos vizinhos. Este evento normalmente é contido nos pulmões através da formação de granulomas, onde os macrófagos ativados e outras células imunológicas circundam o local da infecção para limitar o dano ao tecido e restringir a disseminação micobacteriana (BARLETTA; STEFFEN, 2017). Em alguns casos, as micobactérias podem permanecer latentes no interior do granuloma, sem manifestação clínica. No entanto, mediante a qualquer condição imunodepressora, as bactérias podem se tornar ativas, replicar e acometer outros órgãos (FORRELLAD *et al.*, 2013).

Granulomas são agregados de células imunes, que se formam de maneira organizada em resposta a um estímulo infeccioso ou não (RAMAKRISHNAN, 2012). Esta estrutura é composta por macrófagos maduros, que apresentam a porção citoplasmática aumentada e maior número de organelas, que tornam as células mais fagocíticas e microbicidas. Os macrófagos podem ainda fundir-se em células gigantes multinucleadas (célula de Langhans), se diferenciar em células espumosas ou se transformar-se em células epitelióides. Muitos outros tipos de células também povoam o granuloma, como neutrófilos, células dendríticas (DCs), células NK, células B e T (Figura 3) (RAMAKRISHNAN, 2012; EHLERS; SCHAIBLE, 2013).

Figura 3. Ilustração da estrutura e constituintes celulares do granuloma tuberculoso.



Fonte: Ramakrishnan (2012).

Estas estruturas podem encontrar-se nos pulmões, fígado, baço, linfonodos e nas superfícies das cavidades corporais. Macroscopicamente, apresentam uma coloração amarelada, com aspecto caseoso ou purulento, recoberto por uma cápsula fibrosa, em forma de nódulo com diâmetro de três centímetros (OIE, 2018). Alguns granulomas podem formar um processo cicatricial ou ainda se calcificar (SANTOS; LIMA, 2017).

Segundo dados publicados por Menin e colaboradores (2013), o processo de encapsulamento é considerado um fator importante para a patogênese da bTB, pois animais com maior quantidade de tecido conjuntivo ao redor do granuloma, apresentam uma menor carga bacteriana. Logo, este mecanismo pode atuar como um elemento fundamental no processo de contenção da infecção e disseminação de *M. bovis* (MENIN *et al.*, 2013).

Em relação a sintomatologia clínica, a tuberculose bovina é uma doença de curso crônico que pode manifestar sintomas ou não. De acordo com Menin e colaboradores (2013), a maioria dos animais são assintomáticos mesmo com lesões graves e disseminadas sugestivas de bTB no exame *post mortem*. Essa constatação consolidou-se a partir de um estudo realizado em uma coorte de 247 bovinos infectados naturalmente pelo agente *M. bovis*, onde cerca de 92% dessa população não demonstravam sintomas, mas apresentavam patologia pulmonar grave e disseminação bacteriana (MENIN *et al.*, 2013).

2.4 IMUNIDADE

A interação do *M. bovis* com as células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como células dendríticas e macrófagos derivados de monócitos, e a entrada do bacilo nas células fagocíticas pode ser influenciada por vários receptores de superfície, entre eles podemos citar os receptores *Toll-like* (p. ex., TLR1/TLR2/TLR3/TLR6/TLR9) e manose (MR). Outras células, como as NK (*Natural killers*) e neutrófilos, também estão associadas na resposta inicial ao desafio micobacteriano (BARLETTA; STEFFEN, 2017; POLLOCK *et al.*, 2001).

A partir disso, ocorre um processo de sinalização e produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-17, IL-6 e IL-12 e também quimiocinas. Concomitantemente, há a apresentação de antígenos micobacterianos por intermédio do MHC-II (*Major Histocompatibility Complex*) às células T CD4⁺ auxiliaadoras e através do MHC-I ocorre a ativação de células T CD8⁺. Na presença dessas citocinas, principalmente IL-12, ocorre a indução a expressão de IFN- γ e expansão de células Th1 (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNKE, 2007; BARLETTA; STEFFEN, 2017).

Uma vez ativadas, as células Th1 secretam IL-2 e IFN- γ , as quais são responsáveis por desencadear a diferenciação de células T CD8⁺ em células T citotóxicas. No entanto, de acordo com a condição imune do hospedeiro, pode não ocorrer a diferenciação de células CD4⁺ em células Th1. Assim, os macrófagos infectados podem secretar IL-10 e IL-4, ao invés de IL-12, ocasionando a maturação de células CD4⁺ pela via Th2. O padrão de resposta do tipo Th2 caracteriza-se pela produção e secreção de mediadores anti-inflamatórios (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13), que estão relacionados ao estímulo e maturação das células B em células secretoras de anticorpos (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNKE, 2007; BARLETTA; STEFFEN, 2017).

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser realizado através de métodos diretos e indiretos. O diagnóstico direto tem como princípio a identificação do agente etiológico em amostras biológicas. Em contrapartida, os testes indiretos avaliam a resposta imunológica do hospedeiro frente ao *M. bovis*, que pode ser humoral (produção de anticorpos) ou celular (mediado por linfócitos e macrófagos) (PACHECO *et al.*, 2009).

2.5.1 Diagnóstico Direto

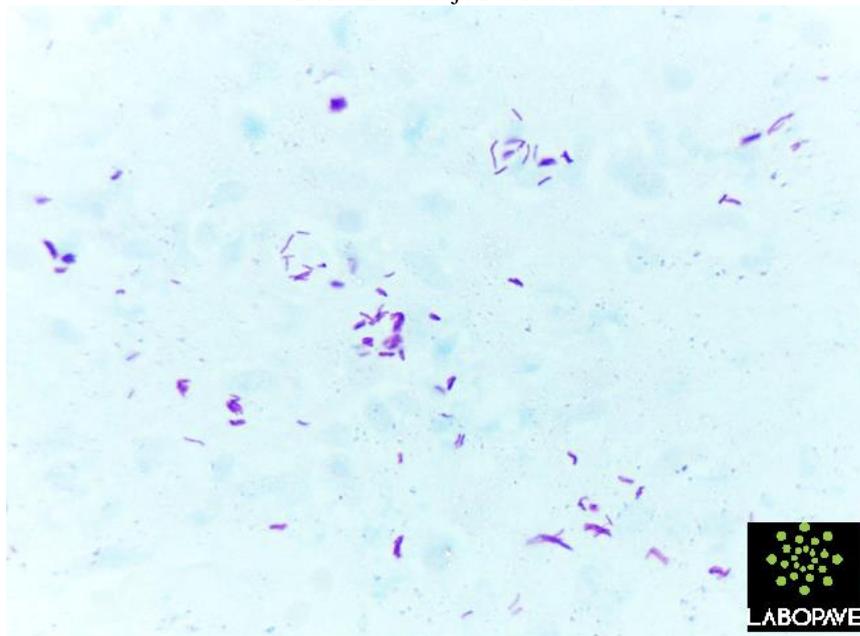
2.5.1.1 Exame Microscópico

O agente causador da tuberculose bovina pode ser observado microscopicamente através de amostras clínicas e teciduais, usando a coloração especial de Ziehl-Neelsen (ZN). A técnica ZN foi desenvolvida no final do século 19 por Franz Ziehl e melhorada por Friedrich Neelsen. Esse método é utilizado em bactérias que não se coram facilmente pela coloração de Gram, como as bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (OIE, 2018; LABORCLIN, 2018).

A necessidade de outros corantes para o diagnóstico da tuberculose, ocorre devido ao alto teor de lipídeos na parede celular das micobactérias, dos quais são responsáveis por diminuir a permeabilidade celular. Devido a essa característica, a coloração ZN é aplicada, pois ao corar o material com carbolfucsina através do aquecimento e descorar com álcool, somente os bacilos álcool-ácidos-resistente irão permanecer com a cor vermelha durante a análise da amostra (Figura 4) (LABORCLIN, 2018; BRENNAN, 2003).

Embora a baciloscopia seja uma técnica rápida, barata e simples quando comparado a outras metodologias, a mesma apresenta várias desvantagens. A coloração Ziehl-Neelsen não é específica, pois bactérias pertencentes ao complexo MNT e organismos não micobacterianos, como espécies do gênero *Nocardia* sp., podem corar-se por ZN, resultando em um diagnóstico falso positivo. Além disso, este método apresenta uma sensibilidade variável (20-80%) e só pode revelar a presença de BAAR quando as concentrações excedem 10^4 bactérias por mililitro (DZODANU *et al.*, 2019; MEDEIROS *et al.*, 2010; BERNITZ *et al.* 2021). Diante destes problemas, a análise microscópica tanto de esfregaço quanto histológica é empregado apenas para diagnóstico presuntivo de infecção por micobactérias.

Figura 4. Coloração de Ziehl-Neelsen evidenciando a presença de bacilos álcool-ácidos-resistentes (BAAR). Amostra enviada ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina com lesões sugestivas de tuberculose bovina. Na coloração de ZN foi possível observar a presença de bacilos álcool-ácidos-resistentes. Objetiva 100x.



Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária (2018).

2.5.1.2 Cultura

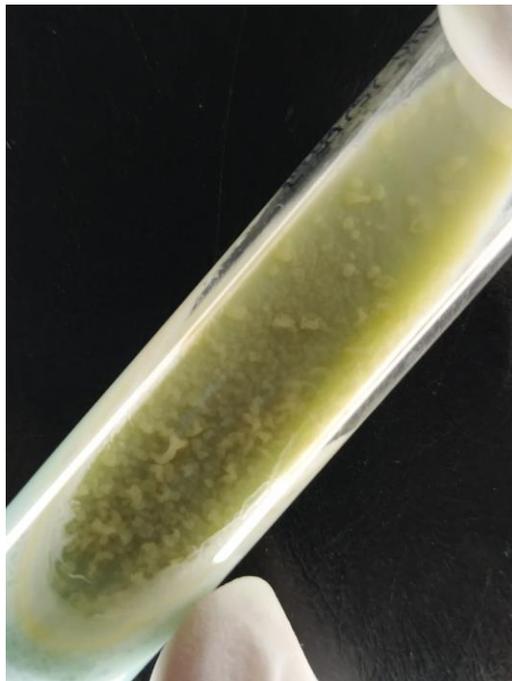
O diagnóstico bacteriológico através da cultura é considerado padrão ouro para a detecção de *M. bovis* (MENESES, 2012). Para obter o isolamento do agente infeccioso, as amostras de escarro, leite ou lesões teciduais sugestivas necessitam de uma descontaminação prévia, adicionando hidróxido de sódio (1 a 5%), ácido sulfúrico, ácido oxálico ou compostos de amônio quaternário (MEDEIROS *et al.*, 2010; OIE, 2018). O pré-tratamento é necessário

para erradicar contaminantes, pois estes interferem na viabilidade das micobactérias (SALFINGER; PFYFFER, 1994).

O crescimento de *M. bovis* pode levar de 3 a 6 semanas em meio sólido a base de piruvato, como o *Stonebrink-Lesslie*. Também pode ser utilizado o meio de cultura *Löwenstein-Jensen*, que contém glicerol como fonte de energia, no entanto, não é a forma mais indicada para o isolamento, uma vez que o agente causador da bTB tem dificuldade em metabolizar glicerol. Meios de cultura à base de ágar enriquecidos com soro ou sangue, tais como *Middlebrook 7H10* ou *7H11* e o meio tuberculose ágar sangue (B83), também são indicados para o cultivo (OIE, 2018; CORNER; GORMLEY; PFEIFFER, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2010).

A partir das condições adequadas (temperatura igual a 37°C), tempo necessário, meio ideal e descontaminantes, podem surgir colônias bacterianas rugosas e de cor esbranquiçada (amarelo-claro) (Figura 5). Embora os padrões de crescimento característicos e morfologia colonial possam fornecer um diagnóstico presuntivo de *M. bovis*, todos os isolados precisam ser confirmados através de metodologias adicionais (OIE, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2010). Logo, é necessário distinguir este microrganismo dos outros membros do complexo *M. tuberculosis*, bem como das micobactérias ditas atípicas.

Figura 5. Colônias bacterianas do agente *Mycobacterium bovis*.



Fonte: arquivo pessoal (2021).

Após o crescimento em meio sólido, as colônias podem ser submetidas a coloração especial pelo método Ziehl-Neelsen, ou ainda, provas bioquímicas para a distinção e caracterização das micobactérias (SALES, 2012). Existem vários testes bioquímicos empregados no diagnóstico do agente causador da bTB, entre eles, os mais úteis são hidrazida 2-tiofeno carboxílica (TCH) e isoniazida, uma vez que *M. bovis* é sensível a estes compostos (OIE, 2018; CORNER; GORMLEY; PFEIFFER, 2012; BRASIL, 2008).

Embora o método direto de diagnóstico, baseado no isolamento do agente infeccioso, seja considerado “padrão-ouro” de detecção, o mesmo apresenta-se falho. Muitas vezes a dificuldade de obtenção de amostras representativas *in vivo* torna pouco viável sua utilização na rotina laboratorial, pois a obtenção do lavado bronco-alveolar em bovinos é muito complicada (MEDEIROS *et al.*, 2010). Além disso, Corner, Gormley e Pfeiffer (2012) demonstraram que a etapa de descontaminação aumentou o tempo mínimo de incubação necessário para detectar culturas positivas, devido ao efeito tóxico dos produtos utilizados. O crescimento lento e o tempo adicional para identificação bioquímica (3 a 4 semanas) também são consideradas limitações deste método (MEDEIROS *et al.*, 2010; CORNER; GORMLEY; PFEIFFER, 2012).

2.5.1.3 Diagnóstico Molecular

Outra técnica de detecção direta de *M. bovis* consiste na amplificação do DNA micobacteriano ou fragmentos alvo de RNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MEDEIROS *et al.*, 2010). Para que a reação ocorra, é necessário adicionar desoxinucleotídeos (dNTPs) do DNA, *primers*, DNA polimerase, DNA molde, tampões, cofatores e água ultrapura como diluente. O DNA que servirá de molde pode ser obtido de diferentes amostras clínicas, como de escarro, sangue, leite, *swabs* nasais e outros tecidos viáveis (MEDEIROS *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

Apesar da PCR fornecer resultados confiáveis, enquanto diminui significativamente o tempo de confirmação do agente infeccioso, ainda é possível identificar algumas limitações do seu uso. Os problemas mais relatados quanto a técnica, envolvem as etapas de extrações de DNA genômico, disponibilidade de oligonucleotídeos com alta especificidade e a contaminação cruzada (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2010).

A escolha correta dos *primers* também é considerada um ponto crítico para o sucesso da reação de PCR. Muitos oligonucleotídeos são empregados na discriminação do gênero

Micobacterium spp. de outras bactérias, no entanto, há uma certa escassez de iniciadores espécie-específicos que reconheçam as sequências de DNA de *M. bovis* (RUGGIERO *et al.*, 2007). Alguns *primers* já foram usados para amplificar as sequências de inserção IS6110 e IS108, bem como genes que codificam as proteínas MPB70 (24 kDa), antígeno B (38 kDa) e HSP (65 kDa) para identificar o agente causador da bTB (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015). Em um outro estudo desenvolvidos por Etchechoury e colaboradores (2010), foi possível observar que determinada sequência de DNA chamada de RD7, presente em *M. tuberculosis* e ausente em *M. bovis*, pode ser uma ferramenta útil para a diferenciação dessas duas espécies. No entanto, a mesma encontra-se em *M. microti*, *M. africanum* e *M. pinnipedii*, o que torna o teste pouco específico (ETCHECHOURY *et al.*, 2010). Dessa forma, a técnica de PCR sozinha não é um método seguro de diagnóstico, mas pode ser empregado como um teste auxiliar.

2.5.2 Diagnóstico Indireto

2.5.2.1 Teste Intradérmico

O diagnóstico padrão da tuberculose bovina é realizado por meio de testes tuberculínicos, dos quais avaliam uma resposta de hipersensibilidade tardia, após a injeção intradérmica de uma proteína purificada derivada (PPD) (RODRIGUES *et al.*, 2017). As tuberculinas atualmente disponíveis são produtos de cultivos bacterianos em meio sintético, que passam por tratamento térmico e filtração, para obter uma solução livre de micobactérias (LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006).

Os antígenos utilizados para a detecção de bTB são: PPD bovino, que corresponde a proteína purificada derivada da cepa AN5 de *M. bovis*, utilizado no teste cervical simples (TCS) e no teste da prega caudal (TPC); e o PPD aviário, proveniente de *M. avium* cepa D4, que juntamente ao PPD bovino é empregado no teste cervical comparativo (TCC) (BRASIL, 2006; TIZARD, 2014).

O Teste Cervical Simples consiste na inoculação intradérmica da PPD bovina na região cervical do animal. Sua interpretação é baseada na diferença da espessura da dobra da pele, antes e 72 horas após a aplicação da proteína (Tabela 1). Da mesma forma, o Teste da Prega Caudal também avalia a resposta imune frente a um único antígeno, do qual é aplicado na base da cauda. Qualquer aumento de espessura no TPC, classificará o animal como reagente. O TCS

e o TPC são utilizados em rebanhos de leite e corte, respectivamente, como prova de triagem e rastreamento da bTB (BRASIL, 2006).

Em casos positivos ou inconclusivos nos testes TCS e TPC, os animais devem ser submetidos ao Teste Cervical Comparativo após um intervalo de 60 a 90 dias. Os locais de aplicação dos antígenos micobacterianos são mensurados antes e após a aplicação das PPDs, sendo o seu resultado interpretado de acordo com a tabela 2. O TCC é considerado mais específico quando comparado aos testes simples, pois permite distinguir a infecção causada por *M. bovis* das micobactérias não tuberculosas (BRASIL, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2010).

Tabela 1. Interpretação do Teste Cervical Simples em bovinos

Características da Reação				
*ΔB (mm)	Sensibilidade	Consistência	Outras Alterações	Interpretação
0 a 1,9	-	-	-	Negativo
2,0 a 3,9	Pouca Dor	Endurecida	Delimitada	Inconclusivo
2,0 a 3,9	Muita Dor	Macia	Exsudato, Necrose	Positivo
$\geq 4,0$	-	-	-	Positivo

* ΔB : Diferença de espessura da dobra da pele antes e após 72 horas da aplicação da tuberculina PPD bovina.
Adaptado de: Brasil (2006).

Tabela 2. Interpretação do Teste Cervical Comparativo em bovinos

	$\Delta B - * \Delta A$ (mm)	Interpretação
$\Delta B < 2,0$	-	Negativo
$\Delta B < \Delta A$	< 0	Negativo
$\Delta B \geq \Delta A$	0,0 a 1,9	Negativo
$\Delta B > \Delta A$	2,0 a 3,9	Inconclusivo
$\Delta B > \Delta A$	\geq	Positivo

* ΔA : Diferença de espessura da dobra da pele antes e após 72 horas da aplicação da tuberculina PPD aviária.
Adaptado de: Brasil, 2006.

De maneira geral, quando ocorre a inoculação intradérmica de pequenas quantidades de PPD, a resposta imune do hospedeiro é mediada por linfócitos T (Th1), que reconhecem os peptídeos apresentados na superfície celular de macrófagos através do MHC. A partir disso, os linfócitos Th1 liberam citocinas que atuam sobre o endotélio vascular, recrutando células do sistema imune para o local de aplicação do antígeno. O resultado final desse processo é a

formação de um edema local, devido a presença de células, fluídos e proteínas (TIZARD, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2006).

Com base no que foi exposto, animais quando não submetidos previamente aos antígenos não desenvolvem uma resposta inflamatória significativa. Em contrapartida, caso a PPD seja injetada em bovinos cujo sistema imunológico já interagiu com *M. bovis*, ou qualquer antígeno das micobactérias MNT, eles desencadearão um inchaço local que atinge sua maior intensidade 72 h após a injeção, regredindo posteriormente (LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006).

Assim como todos os ensaios de diagnóstica da bTB, o teste tuberculínico também apresenta desvantagens. Apesar do amplo uso deste método, os relatórios de sensibilidade e especificidade variam devido a diversas fatores, entre eles os relacionados aos animais, à tuberculina utilizada e as condições envolvidas na administração, interpretação e registros dos resultados (Tabela 3) (LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006). Portanto, estas condições sugerem que o teste intradérmico sozinho pode não ser capaz de detectar todos os animais infectados com *M. bovis*, levando a resultados falso-negativos.

Tabela 3. Potenciais causas de resultados falso-negativos no teste tuberculínico em rebanhos bovinos.

1. Fatores associados ao animal:

- Testagens sucessivas (dessensibilização a tuberculina bovina)
- Teste realizado concomitante a infecção (período não reativo)
- Anergia
- Coinfecção ou pré-exposição a micobactérias pertencentes ao complexo MNT
- Infecção simultânea com vírus que deprimem o sistema imunológico, p. ex. BVD (Vírus da Diarreia Bovina)
- Medicamentos (corticosteroides)
- Situações estressantes (nutricional, transporte e parto)

2. Fatores associados à proteína tuberculina:

- Produto vencido
- Armazenamento incorreto (exposto à luz e ao calor por longos períodos)
- Erros de fabricação

3. Demais fatores:

- Pequenas quantidades da tuberculina bovina injetada
- Aplicação no local incorreto (subcutâneo ao invés de intradérmico)
- Inverter aplicação da tuberculina bovina e tuberculina aviária
- Leitura dos resultados muito cedo ou muito tarde (72h ± 4-6 horas após aplicação)
- Erro na identificação dos animais positivos e negativos

Adaptado de: LA RUA-DOMENECH *et al.*, (2006).

2.5.2.2 Ensaio Interferon-Gamma

O ensaio de Interferon-Gamma (IFN- γ) é um teste de sangue *in vitro* desenvolvido na Austrália no final dos anos 80 para o diagnóstico da bTB em bovinos. A metodologia proposta pelo teste consiste em incubar as alíquotas heparinizadas de sangue com PPD bovina e/ou PPD aviária. Posteriormente, o plasma é separado e quantificado por ELISA sanduíche (LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006; OIE, 2018). O princípio básico do exame é a detecção da resposta celular do hospedeiro contra a infecção por *M. bovis* (LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006).

O IFN- γ é uma citocina liberada predominantemente por linfócitos T após estimulação antigênica, sendo um biomarcador importante nas respostas às micobactérias tuberculosas. Assim sendo, uma vez que os animais foram infectados por *M. bovis*, os mesmos produzem linfócitos T de memória que respondem à estimulação *in vitro* ao PPD, produzindo grandes quantidade de IFN- γ . Justificando a sua utilização como ferramenta para diagnóstico (LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006).

Em um estudo desenvolvido por Wood e Jones (2001), o Bovigam® (teste comercial empregado para a dosagem de IFN- γ) quando testado em bovinos na Austrália, Brasil, Irlanda, Itália, Nova Zelândia, Romênia, Espanha e EUA, demonstrou uma alta sensibilidade e especificidade que variou entre 80% a 100% (WOOD; JONES, 2001). De maneira semelhante, Cagiola e colaboradores (2004) mostraram que a especificidade do teste IFN- γ é de aproximadamente 97%, sendo esse dado superior ao fornecido pela tuberculinização (CAGIOLA *et al.*, 2004).

Em comparação ao teste tuberculínico, a mensuração de IFN- γ apresenta inúmeras vantagens, entre elas: a capacidade de identificar os animais em um estágio anterior da infecção do que a prova cutânea, e permite a diferenciação das respostas à infecção com micobactérias patogênicas daquelas resultantes da exposição a micobactérias ambientais. Além disso, reduz os problemas práticos associados as instalações precárias, equipamentos antigos, erro do operador, a possibilidade de fraude (LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2010).

Contrariamente, torna-se desvantajoso pois apresenta custo elevado, exige mão de obra e equipamentos específicos (LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006). Também é necessário o rápido processamento das amostras coletadas, uma vez que o atraso implica na redução da sensibilidade do teste (GORMLEY *et al.*, 2004). Somado a isso, a avaliação do IFN- γ pode ser afetado por condições como o tratamento com corticoides e o parto (WOOD; JONES, 2001;

LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006). Logo, sugere-se o uso do ensaio de IFN- γ como diagnóstico complementar ao teste tuberculínico, para identificar animais positivos perdidos pela metodologia padrão.

2.5.2.3 ELISA

Animais quando infectados por *M. bovis* desenvolvem primariamente uma resposta imune mediada por células, essa resposta permite que ensaios como IFN- γ e intradérmico sejam os mais adequados para o diagnóstico da bTB. No entanto, a medida que a doença progride, há um aumento da imunidade humoral que cursa com o aumento de anticorpos circulantes, essa característica permite que testes imunoenzimáticos sejam aplicados para detecção de antígenos micobacterianos no plasma (POLLOCK *et al.*, 2001).

De maneira geral, o ensaio de imunoabsorção enzimática ou ELISA, consiste em ligar uma proteína ou uma série de antígenos proteicos ao fundo de uma placa de poliestireno. O soro coletado de animais com suspeita de infecção por *M. bovis* é diluído e adicionado aos poços previamente sensibilizados, formando o um complexo antígeno-anticorpo específico. Essa reação pode ser mensurada usando uma ou mais etapas subsequentes (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015; SELVA; MELO; ZANINI, 2020).

Para diagnosticar bovinos infectados, os antígenos usualmente empregados são a PPD e antígenos purificados simples ou associados de *M. bovis*, como por exemplo Ag85, MPB70 e MPB83 (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015). A proteína MPB70 é um dos principais antígenos secretados por *M. bovis* e corresponde a 10% de todas as proteínas secretadas em meios de cultura. MPB83 apresenta-se altamente homóloga ao antígeno MPB70, tem sido utilizada como uma molécula promissora no sorodiagnóstico de bTB, pois desencadeia uma resposta imune humoral marcante (MEDEIROS *et al.*, 2010). Outras proteínas promissoras são ESAT-6 e CPF-10, pois são antígenos encontrados em *M. bovis* e ausente no complexo MNT (WATERS *et al.*, 2006).

Vários estudos sorológicos surgiram para aplicação potencial do diagnóstico de bTB em bovinos. Entre eles, Whelan e colaboradores (2011), demonstraram que ao utilizar um ensaio de ELISA multi-antigênico (ESAT-6, MPB70, MPB83, CFP-10, α crystallin-2 e Rv3616c) em 60 bovinos submetidos ao TCC, 53 (88,3%) foram positivos para o ELISA multiplex. Além disso, o mesmo ensaio demonstrou altos valores de sensibilidade (93%) e

especificidade (98%), do qual pode ser atribuído a combinação de antígenos em um único poço (WHELAN *et al.*, 2011).

Quando ensaios de IFN- γ e TCS foram comparados a três técnicas de detecção de anticorpos para o diagnóstico da tuberculose bovina, os testes de ELISA demonstraram-se mais sensíveis (valor-p <0,05). Além disso, quando interpretado paralelamente as metodologias baseadas na detecção de uma resposta celular, a sensibilidade atingiu um valor de 98%, sugerindo que o uso de ambos os testes pode ser considerado uma alternativa no controle de surtos de bTB em ambientes de alta prevalência (CASAL *et al.*, 2017).

Waters e Colaboradores (2011) desenvolveram um ensaio imunoenzimático comercial para os antígenos MPB83 e MPB70 (IDEXX *M. bovis* ELISA). Esse teste demonstrou sensibilidade e especificidade de 63% e 98%, respectivamente, no entanto a sensibilidade aumentava à medida que a doença progredia. O ELISA também detectou animais infectados perdidos no teste cutâneo de tuberculina de rotina, e o anticorpo foi detectado em amostras de leite de rebanhos leiteiros infectados com *M. bovis*. Devido a esses resultados promissores, o IDEXX foi aprovado pelo Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) para uso em programas de controle da tuberculose bovina, associado a tuberculinização (WATERS *et al.*, 2011).

Os mesmos antígenos propostos pelo ensaio IDEXX (MPB83 e MPB70) juntamente com o ESAT-6, foram estudados por Souza e colaboradores (2019) após sua expressão e purificação. A quimera recombinante de MPB83/MPB70/ESAT-6 foi aplicada em um ensaio de ELISA para o diagnóstico de bTB em animais naturalmente infectados por *M. bovis*. Os resultados do experimento quando utilizados a cultura como padrão ouro, demonstraram uma sensibilidade e especificidade de 79,5% e 75,5%, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2019).

Diante disso, a utilização de proteínas produzidas através de ferramentas biotecnológicas, ampliarão a cobertura do diagnóstico da tuberculose bovina em rebanhos de gado de corte e leite, permitindo o isolamento e abate de animais positivos. Além disso, testes como ELISA permitem praticidade em relação ao manejo dos animais, visitas a propriedade e possibilidade de reteste com um único material coletado, sem alterar o status imunológico do rebanho (MEDEIROS *et al.*, 2010).

2.6 CONTROLE E TRATAMENTO

Não existe tratamento, sendo o abate de animais positivos a única forma de eliminar o agente infeccioso dos rebanhos bovinos. O controle e erradicação da tuberculose bovina é realizada através do programa PNCEBT, do qual visa reduzir a prevalência e incidência da *M. bovis* por meio do descarte de animais positivos ao teste da tuberculina. A inspeção contínua de carnes, leite e produtos lácteos também são metas a serem seguidas pelo programa de controle e erradicação, uma vez que essa é uma das principais formas de humanos adquirirem a doença (BRASIL, 2006).

2.7 PROTEÍNA SMTL-13

Estudos desenvolvidos por Nogueira e colaboradores (2010) identificaram uma proteína hipotética codificada pelo gene Rv1419, denominada lectina de 13 kDa secretada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (SMTL-13). Lectinas são proteínas com capacidade de ligar-se especificamente a carboidratos, através dessa interação, participam de diversos mecanismos celulares como adesão, apoptose e agregação. Logo, tornam-se alvo de estudo para melhor compreender as interações patógeno-hospedeiro (NOGUEIRA, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2010; MORALES, 2014; SOUZA, 2012).

A SMTL-13 trata-se de uma molécula presente no sobrenadante de cultura de *Mtb* da cepa virulenta H37Rv de laboratório, responsável por induzir um aumento na produção de IFN- γ e IgG em pacientes com tuberculose ativa (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Em adição, através de análises em banco de dados, foi possível observar que o gene Rv1419 apresenta homólogos conservados em uma cepa clínica de *M. tuberculosis* (CDC1551), bem como na cepa vacinal *M. bovis* BCG e *M. bovis* AF2122/97. Ao contrário do que foi observado em espécies como *M. marinum* e *M. ulcerans*, que apresentaram 78% de identidade (NOGUEIRA *et al.*, 2010; MORALES, 2014; SOUZA, 2012).

Devido ao alto potencial antigênico na indução de respostas imunes celulares (IFN- γ) e humorais (IgG/soro), somado a presença em outras espécies de micobactérias, como *M. bovis*, sugere-se a utilização da proteína como um antígeno candidato à construção de um teste diagnóstico. Por esse motivo, objetivou-se com esse trabalho, testar ferramentas para a construção de um teste sorológico de ELISA para diagnóstico de bTB em rebanhos bovinos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo verificar ferramentas necessárias para a construção de um teste diagnóstico futuramente.

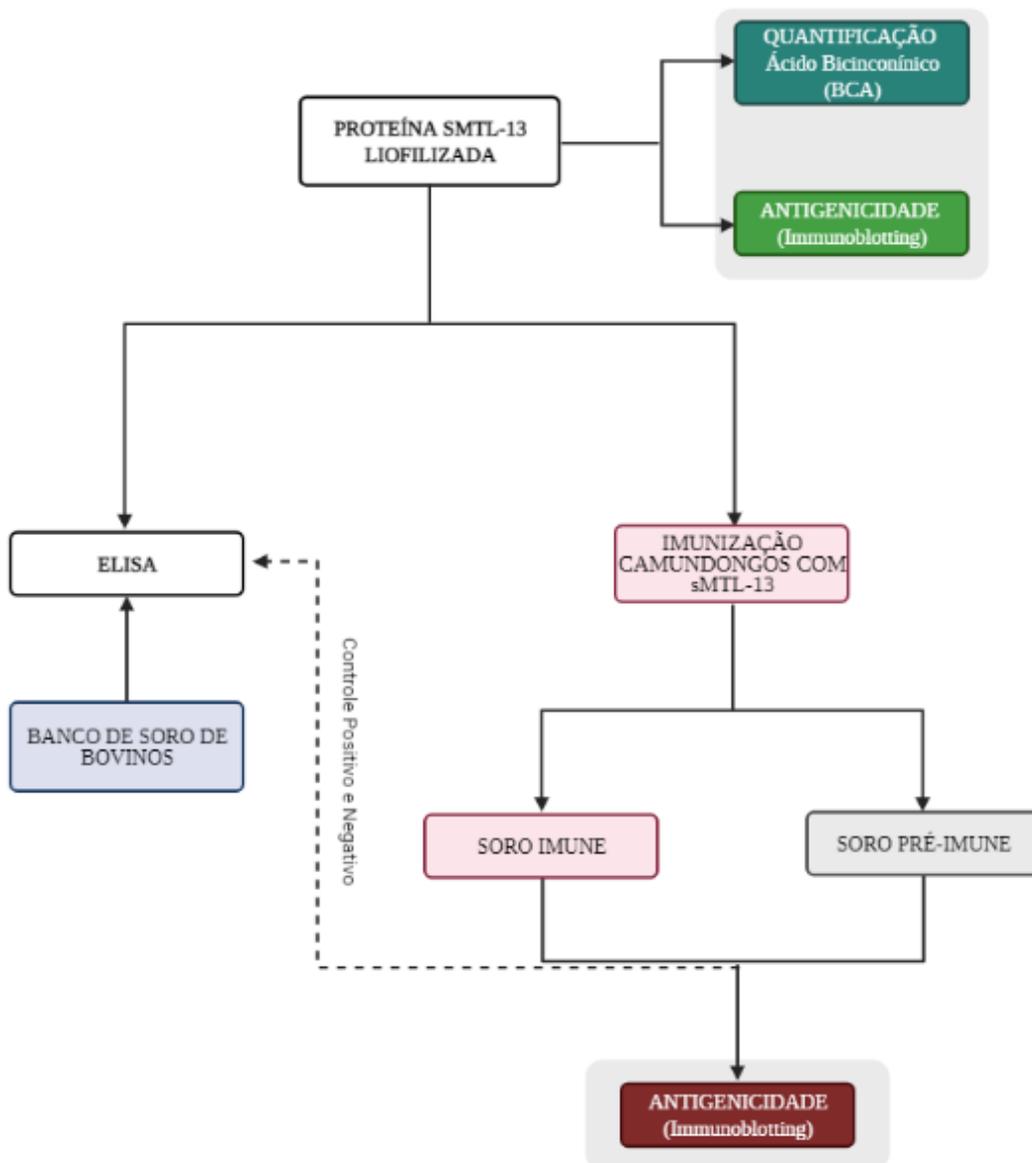
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a concentração proteica de amostras liofilizadas da proteína sMTL-13 através do método BCA;
- Identificar a proteína sMTL-13 através da técnica *Western Blot*;
- Imunizar camundongos C57BL/6 com a proteína sMTL-13, com o objetivo de obter um *pool* de amostras para o controle positivo e negativo no teste de ELISA;
- Observar a resposta imunológica humoral dos camundongos imunizados, através de um ensaio de *Western Blot*;
- Perspectivas sobre a construção de um ensaio de ELISA;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Figura 6. Desenho Experimental.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

4.2 COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

Todos os experimentos que utilizaram animais neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFSC (CEUA – UFSC), sob protocolo N° 8278290818.

4.3 LOCAL DO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia (LIDI), do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras contendo a proteína sMTL-13 liofilizada bem como os anticorpos foram cedidos pelo Prof. Dr. André Báfica da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA sMTL-13

A quantificação da proteína sMTL-13 foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit) de acordo com o protocolo modificado do fabricante (Thermo Scientific®). O reagente de trabalho (RT) foi preparado misturando-se 1 parte do reagente B (solução de sulfato de cobre) a 50 partes do reagente A (solução de ácido bicinconínico). Para elaboração da curva padrão, foi utilizado a solução estoque de albumina bovina (BSA) a 2 mg/mL, a qual foi submetida a diluições seriadas para obtenção das concentrações finais nos poços de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 e 0.03125 mg/mL. Em paralelo, também realizou-se a diluição da proteína sMTL-13 em microtubos contendo 180 µl de água Milli-Q. Posteriormente, 10 µl dessas amostras foram transferidas para microplacas contendo 180 µl do RT recém preparado, seguido da incubação durante 30 minutos a 37°C. A leitura foi feita a 540 nm em leitor de placas (BioTek) e as concentrações foram obtidas com base na curva padrão de BSA. Os resultados foram ajustados no programa GraphPad PRISM.

4.5 WESTERN BLOT

Após a quantificação da proteína sMTL-13, as amostras foram submetidas ao ensaio de imunodeteção utilizando a técnica de *Western Blot*, que consiste nos seguintes passos:

4.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Diferentes concentrações da proteína sMTL-13 (4, 6 E 10 mg/mL) foram solubilizadas em tampão de amostra 4x (Tris-HCl 50 mM pH 6.8; 2-Mercaptoethanol (BME) 2,5%; Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 2%; Glicerol 10% e Azul de Bromofenol 0,2%) e, então, incubadas a 100°C por 10 minutos. Após a incubação, foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE 5-15%, utilizando como marcador molecular o Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad), sob voltagem de 70V a 120V.

4.5.2 Transferência eletroforética

Ao final da separação proteica em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o módulo de transferência XCell II™ Novex mini-Cell (Invitrogen). A transferência da proteína sMTL-13 foi realizada a 25V por 2h em tampão de transferência Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M) contendo 10% de metanol. Para confirmar a transferência das proteínas para a membrana de forma igual para todas as amostras, a mesma foi corada com solução Ponceau S [1% (m/v) Ponceau S em 10% HCl].

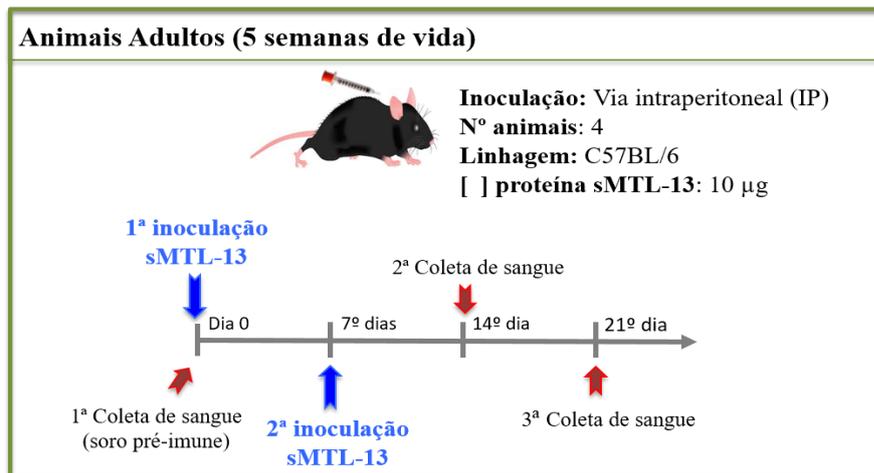
4.5.3 Immunoblotting

Ao final da transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó em TBS 1X durante 45 min em temperatura ambiente (TA) sob agitação, para evitar a ligações inespecíficas. Posteriormente, adicionou-se o anticorpo monoclonal anti-polihistidina (1:10.000) ou anti-sMTL13 (2 µg/mL) em TBST-BSA 5% (TBS 1X-0,1% Tween-20) e a membrana foi incubada overnight a 4°C, sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada por 1h a TA sob agitação constante com o anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase (anti-mouse IgG, HRP-linked, Cell Signaling), diluído 2.000 vezes em TBST-BSA 5%. Por fim, a membrana foi lavada e revelada com o kit ECL (Pierce), que consiste em um substrato quimioluminescente para a enzima peroxidase utilizada no anticorpo secundário da reação. A detecção das bandas foi possível através do Fotodocumentador Chemidoc BioRad.

4.6 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS E CONSTRUÇÃO DO POOL DE AMOSTRAS

Para os estudos de imunogenicidade da proteína sMTL-13, foram utilizados quatro camundongos pertencentes a linhagem C57BL/6, com cinco semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Os camundongos foram expostos, através da via intraperitoneal, a uma dose de 10 µg de sMTL-13 na presença de 50 µl do Adjuvante Incompleto de Freund (Freund's Incomplete Adjuvant - IFA) e salina. O protocolo de imunização foi repetido sete dias após a 1ª inoculação e as coletas de sangue por meio de punção cardíaca ocorreram 14 e 21 dias após a 1ª inoculação, sacrificando um e três animais, respectivamente. Além disso, amostras de sangue foram coletadas antes da inoculação do antígeno, através de uma incisão na extremidade distal da cauda, com a finalidade de obter o soro pré-imune. Todos os microtubos contendo o sangue foram centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos, para a separação da fração correspondente ao (Figura 7). Os soros foram submetidos a temperatura de 56°C por 30 minutos para inativação do sistema complemento. As amostras posteriormente foram submetidas a técnica de *Western Blot*, utilizando as diferentes amostras de soro na diluição 1:500.

Figura 7. Representação esquemática do protocolo de imunização. Camundongos C57BL/6 foram imunizados (dia 0) com o antígeno sMTL-13 e submetidos a um novo desafio sete dias após. O sangue foi coletado 14 e 21 dias após a 1ª inoculação.



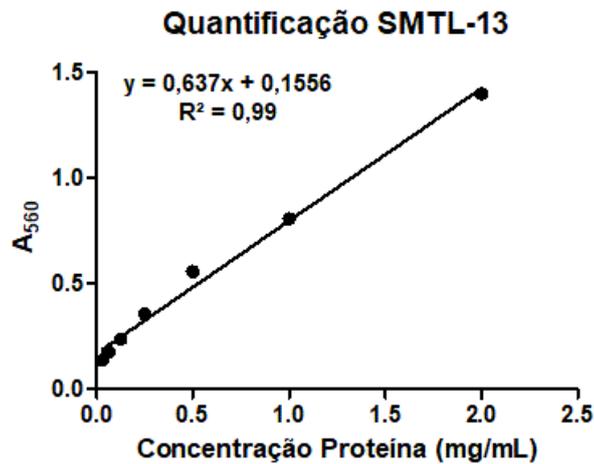
Fonte: elaborada pela autora (2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONCENTRAÇÃO PROTEÍNA sMTL-13

Foram determinadas as absorbâncias das diluições de BSA com concentrações proteicas conhecidas em leitor de placas. Em seguida, calculou-se a relação linear entre as duas variáveis (absorbância e concentração) com base na equação da reta: $y = 0,637x + 0,1556$. Foi possível observar que a curva-padrão foi satisfatoriamente linear, pois apresentou valor de $R^2 = 0,9911$, sugerindo seguridade quanto técnica de quantificação (Figura 8).

Figura 8. Curva-padrão (BSA). A equação gerada foi linear ($y = 0,637x + 0,1556$) e de alta precisão, como demonstrado pelo valor de R^2 (0,9911); A_{560} : valor da absorbância determinada a 560 nm.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

O valor encontrado na mensuração da proteína sMTL-13 diluída em água MilliQ foi de 0,52 mg/mL. O ensaio colorimétrico BCA é usado para determinações quantitativas de proteínas devido a sua alta sensibilidade, facilidade e tolerância a várias soluções empregadas durante as técnicas de purificação (SMITH *et al.*, 1985). O princípio da técnica de ácido bicinonínico consiste em reduzir Cu^{2+} para Cu^{+} através da presença de ligações peptídicas e resíduos de cisteína, tirosina e triptofano. Diante disso, através da análise *in silico*, foi possível observar a composição de aminoácidos da proteína sMTL-13 e constatamos a presença de 3,8% de cisteína e 5,1% de triptofano, o que nos permite utilizar deste ensaio para a quantificação (CROSSMAN; CLEMENTS; COOPER, 2000).

Além disso, foi necessário a adaptação do método BCA para o experimento em questão, devido as limitações do número de amostras. Segundo Bainor e colaboradores (2011),

o desempenho da técnica colorimétrica é afetado em pequenas quantidades quando pipetadas em placas de 96 poços. Entretanto, o valor do coeficiente de determinação (R^2) encontrado neste estudo indica uma certa confiabilidade nos dados demonstrados mesmo em condições limitadas. Assim, esta adaptação simples permitiu a detecção precisa da concentração de proteína em um menor volume de amostras (BAINOR *et al.*, 2011).

5.2 ANTIGENICIDADE

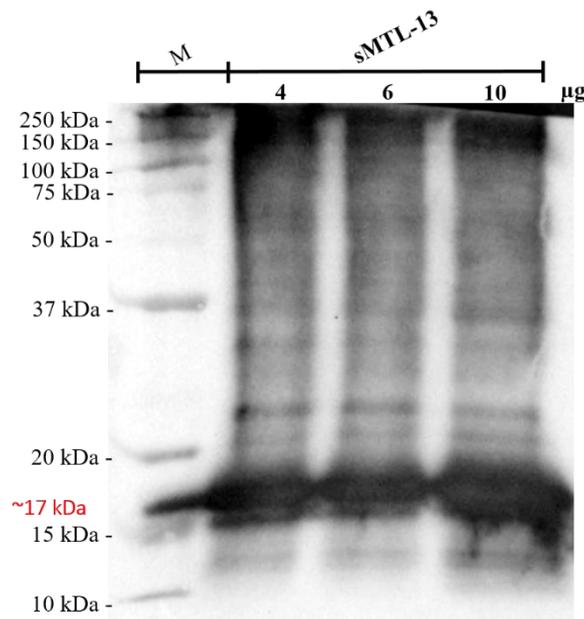
A metodologia de *Western Blot* foi aplicada com o objetivo de confirmar a presença da proteína sMTL-13 na amostra liofilizada. Para isso, utilizou-se a proteína previamente quantificada pelo método BCA, nas concentrações de 4, 6 e 10 μg para a ligação com o anticorpo primário anti-HIS (1:10.000). Após o período de incubação, marcação com o anticorpo secundário (anti-mouse IgG, HRP-linked, Cell Signaling) e revelação, foi possível observar a presença de uma banda correspondente ao peso molecular de aproximadamente 17 kDa (Figura 9). No entanto, como a proteína hipotética apresenta peso molecular de 13 kDa (NOGUEIRA *et al.*, 2010), foi necessário realizar novamente a mesma metodologia, mas utilizando anticorpos específicos anti-sMTL-13 purificado na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$. Como amostras controle utilizou-se o “branco” e BSA (4 μg). Logo, foi possível observar a presença de uma banda com mesmo peso molecular citado anteriormente e a ausência de bandas nas colunas consideradas controle (Figura 10).

A presença de uma banda de 17 kDa também foi demonstrado em um trabalho desenvolvido por Nogueira (2012), que corresponde a proteína sMTL-13 associada ao peptídeo sinal (*signal peptides* – SP). Peptídeos sinal geralmente estão localizados na região N-terminal, apresentando como função básica o endereçamento da proteína. A clivagem dessa porção muitas vezes ocorre por ação de uma classe de enzimas conhecidas como peptidases, responsáveis por liberar a forma madura da proteína, uma vez que a mesma chega a membrana celular. No entanto, em alguns casos, é possível que estas moléculas permaneçam ancoradas à superfície da bactéria (OWJI *et al.*, 2018). De acordo com Morales (2014), a proteína sMTL-13 pode ser encontrada de ambas as formas, sendo a mais prevalente sua forma desprovida do SP, com peso molecular de aproximadamente 13 kDa (NOGUEIRA *et al.*, 2010; MORALES, 2014; SOUZA, 2012).

Muitas vezes, tanto proteínas extracelulares quanto as associadas a membrana, demonstram relação importante com a patogênese da bactéria. Algumas proteínas secretadas e

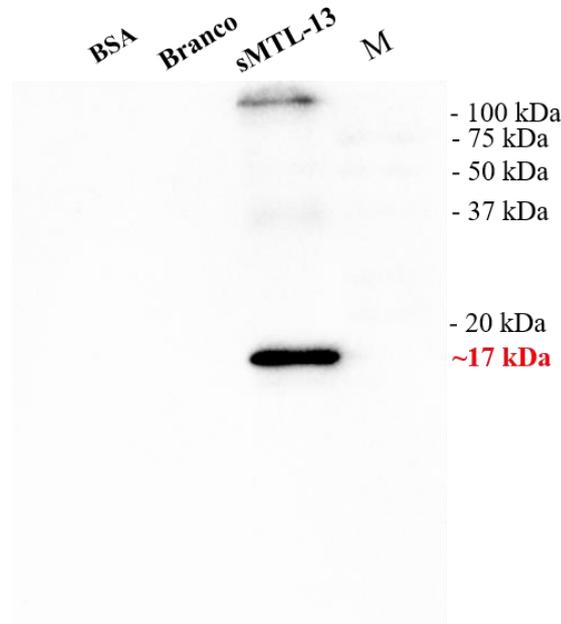
exportadas do *M. tuberculosis* são consideradas fatores de virulência, podendo estar envolvidas em mecanismos de evasão do sistema imune, tal como a sobrevivência no interior de macrófagos (NOGUEIRA, 2008). Um exemplo disso, é o complexo Ag85, do qual encontra-se principalmente no filtrado de cultura (CFP) de micobactérias, mas também na superfície bacteriana. Esse antígeno tem sido alvo de estudos, devido a sua capacidade de modular processos inflamatórios, além de induzir a proliferação de células T e produção de altos níveis de IFN- γ (WIKER; HARBOE, 1992; SOUZA, 2012). Por outro lado, outras moléculas também ganham destaque por estarem predominantemente no CFP, desempenhando papel importante na virulência de *M. tuberculosis*, tais como ESAT-6 e CFP-10. Essas proteínas estão relacionadas a fatores de escape microbiano do fagossomo para o citoplasma do macrófago, necrose da célula hospedeira e disseminação da bactéria para as células adjacentes (WELIN *et al.*, 2014).

Figura 9. Análise da proteína liofilizada ressuspensa com salina por *Western Blot*. Utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-HIS (1:10.000), seguido de incubação com anti-mouse IgG (1:2000). Revelação Kit ECL (Pierce). Presença de bandas com peso molecular de ~17 kDa; M: Marcador Molecular; kDa: quilodalton.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Figura 10. Marcação proteína com anticorpo anti-sMTL13 purificado. Utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-Smtl-13 purificado (2 µg/mL), seguido de incubação com anti-mouse IgG (1:2000). Revelação Kit ECL (Pierce). Presença de bandas com peso molecular de ~17 kDa. M: Marcador de massa molecular; kDa: Quilodalton; Branco: salina + tampão de amostra; BSA: Albumina do soro bovino. Concentração de BSA e sMTL-13 = 4µg.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

5.3 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS SOROS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

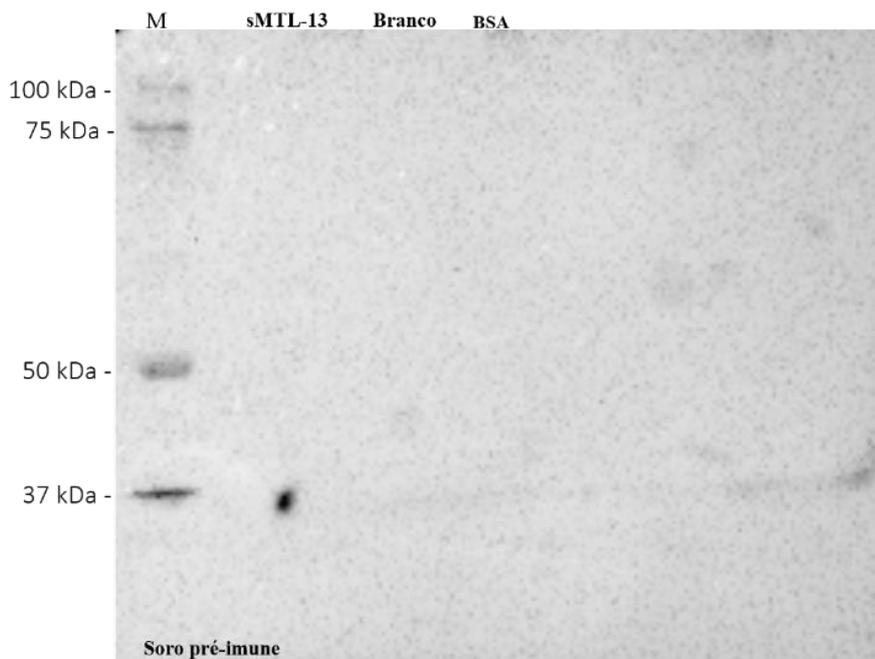
A especificidade dos soros imunes e pré-imunes foi analisada pela técnica de *Western Blot*, a partir disso, foi possível observar a presença de bandas correspondentes ao peso molecular da proteína sMTL-13 conjugado ao peptídeo sinal ~17 kDa nos soros dos animais imunizados. Em contrapartida, o soro pré-imune não demonstrou reatividade quando incubada com a proteína sMTL-13. Além disso, tanto o soro imune quanto o soro pré-imune não continham anticorpos reativos a proteína BSA do grupo controle. Da mesma forma que nenhuma reatividade foi observada quando o diluente da proteína e o tampão de amostra (branco) foi submetido à eletroforese, transferidos para a membrana de nitrocelulose e exposto aos soros.

O processo de imunização consiste em induzir o sistema imune do hospedeiro a responder a antígenos simples. Esses processos são rotineiramente provocados através da injeção da proteína de interesse nos animais por meio de diferentes vias associado a um

adjuvante, do qual é responsável pelo prolongamento da vida do antígeno injetado, estimulando o sistema imunológico e fornecendo um conjunto complexo de sinais para o compartimento inato do sistema imunológico. Posterior ao processo de imunização, os camundongos imunizados são monitorados com o objetivo de detectar anticorpos específicos a molécula alvo de estudos (MURPHY, 2014; BILLIAU; MATTHYS, 2001).

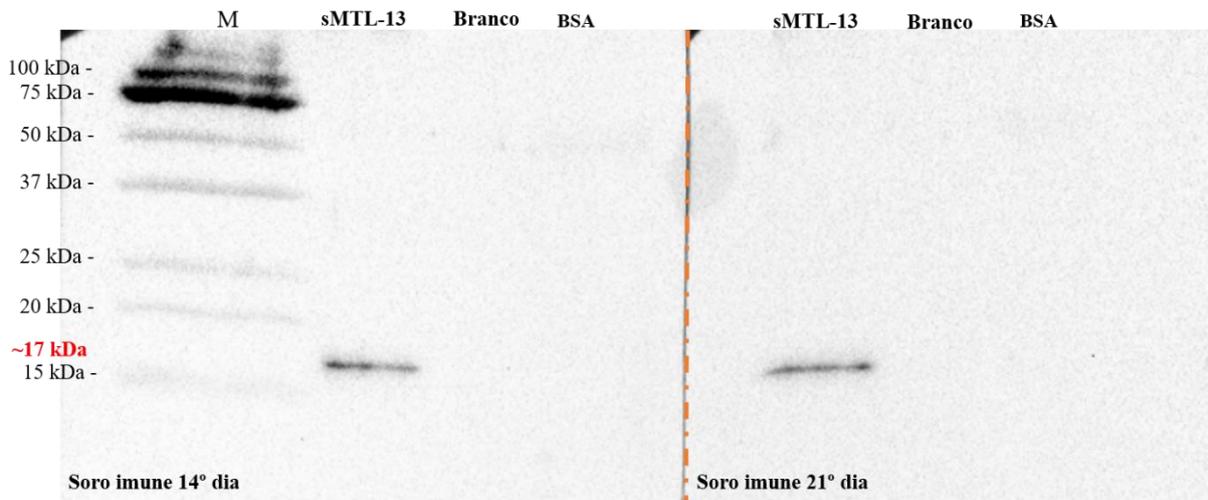
A imunização com a proteína sMTL-13 já foi demonstrada anteriormente por Nogueira (2012) para estudos envolvendo a geração de anticorpos monoclonais através da tecnologia conhecida como hibridoma. O hibridoma é o produto da fusão de linfócitos B com uma linhagem celular mutante derivada de mieloma. Normalmente, utiliza-se células de camundongos induzidos experimental a desenvolver esse tipo de neoplasia, fundindo-se com células B de camundongos imunizados com o antígeno do qual deseja-se obter anticorpos monoclonais. O sobrenadante desta cultura, posteriormente foi empregado na metodologia de WB para detecção da proteína sMTL-13 após o processo de purificação e detecção da mesma no CFP. Diante desses achados, pode-se afirmar que os anticorpos gerados após o processo de imunização demonstram-se específicos, no entanto, nenhum trabalho ainda avaliou a reatividade dos soros (ímune e pré-ímune) frente a proteína sMTL-13 em um ensaio de WB.

Figura 11. Análise do soro pré-ímune por *Western Blot*. Utilizou-se como marcação primária soro pré-ímune (1:500), seguido de incubação com anti-mouse IgG (1:2000). Revelação Kit ECL (Pierce). M: Marcador Molecular. sMTL-13 e BSA: 4 µg/µl da proteína; Branco: Salina + tampão de amostra.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

Figura 12. Avaliação do soro imune 14° dia e 21° dia. Utilizou-se como marcação primária soro pré-imune (1:500), seguido de incubação com anti-mouse IgG (1:2000). Revelação Kit ECL (Pierce). M: Marcador Molecular. sMTL-13 e BSA: 4 µg/µl da proteína; Branco: Salina + tampão de amostra.



Fonte: elaborada pela autora (2021).

6 PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como objetivo descobrir a concentração das amostras contendo a proteína sMTL-13, avaliar a especificidade de anticorpos anti-sMTL-13 e soros de camundongos imunizados com a proteína de interesse, dos quais servirão como grupos controles. Essas ferramentas serão úteis, posteriormente, para a construção de um teste diagnóstico de ELISA. O ensaio de ELISA é uma técnica aplicada em uma placa para detectar e quantificar peptídeos, proteínas, anticorpos e hormônios. Normalmente são utilizadas placas de poliestireno de 96 poços (ou 384 poços), onde os antígenos são adsorvidos para que em seguida se liguem aos anticorpos. Podem ser ainda adicionados anticorpos secundários conjugados a enzimas, das quais quando em contato a um substrato geram um produto mensurável (ALHAJJ; FARHANA, 2021).

Entretanto, para que seja possível desenvolver um teste de diagnóstico, devem ser encontradas condições precisas e ideais de desempenho para todas as etapas do protocolo de teste. Isso garante que todo o procedimento seja ideal. Antes do uso rotineiro em diagnósticos, por exemplo, o procedimento recém-desenvolvido ou modificado deve ser comprovado como exato, preciso e reproduzível. Além disso, para medir os valores obtidos com o teste, é necessário padronizar o mesmo. Com base nisso, os próximos passos utilizando os elementos demonstrados neste trabalho serão a otimização dos componentes de um ELISA, tais como: qualidade da placa, concentração ideal de antígenos, soluções de bloqueio (evitar ligações inespecíficas), melhor diluente e diluição da amostra a ser analisada, melhor concentração do anticorpo conjugado, enzimas ideais e o melhor método para a detecção.

7 CONCLUSÃO

Os achados deste trabalho levam as seguintes conclusões:

- Foi possível quantificar a proteína sMTL-13 através do método BCA, sem que não ocorresse nenhuma interferência;
- O anticorpo monoclonal anti-HIS marcou uma proteína de ~17 kDa, no entanto não demonstrou tanta especificidade;
- O anticorpo monoclonal anti-sMTL-13 purificado detectou a proteína sMTL-13 de *M. tuberculosis* de forma específica, demonstrando segurança na utilização desta molécula em ensaios futuros;
- Os soros imunes obtidos nos dias 14° e 21° após a inoculação apresentaram anticorpos anti-sMTL-13, demonstrando especificidade do soro frente a proteína de interesse, ao contrário do que ocorreu com o soro pré-imune;
- A proteína sMTL-13 tem bom perfil antigênico, portanto adequada para aplicação de imunoenaios para detecção de anticorpos contra *M. bovis*. No entanto, mais estudos são necessários para a confecção de um teste de ELISA.

REFERÊNCIAS

- ALBERTTI, L. A. G. **Detecção de micobactérias em animais silvestres em sub-regiões do pantanal sul-mato-grossense**. 2014. 52 f. Tese (Doutorado) - Curso de Saúde Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.
- ALHAJJ, M.; FARHANA, A. **Enzyme Linked Immunosorbent Assay**. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>. Acesso em: 01 mai 2021.
- ALMEIDA, R. F.C. *et al.* Resposta imune específica de bovinos experimentalmente sensibilizados com inóculos inativados de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 195-200, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2006000400002>.
- AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4-15, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.
- BAINOR, A. *et al.* Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. **Analytical Biochemistry**, v. 410, n. 2, p. 310-312, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.015>.
- BARLETTA, R. G.; STEFFEN, D. J. *Mycobacterium*. In: McVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 429-442.
- BERNITZ, N. *et al.* Review of Diagnostic Tests for Detection of *Mycobacterium bovis* Infection in South African Wildlife. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 8, p. 1-11, 28 jan. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2021.588697>.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal Of Leukocyte Biology**. p. 849-860. dez. 2001.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diagnóstico Situacional do PNCEBT: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Brasília: MAPA/AECS, 2020. 102 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt/DSPNCEBT.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2021.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. Disponível em: <http://www.adepara.pa.gov.br/sites/default/files/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>. Acesso em: 1 mar. 2021.
- BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância

Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 436 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 83, n. 1-3, p. 91-97, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1472-9792\(02\)00089-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1472-9792(02)00089-6).

CAGIOLA, M. *et al.* Analysis of Possible Factors Affecting the Specificity of the Gamma Interferon Test in Tuberculosis-Free Cattle Herds. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 5, p. 952-956, set. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cdli.11.5.952-956.2004>.

CASAL, C. *et al.* Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. **Research In Veterinary Science**, v. 112, p. 214-221, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.012>.

CORNER, L.A.L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2-4, p. 303-312, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.015>.

CORNER, L.A.L.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D. U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 1-2, p. 162-171, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.016>.

CROSSMAN, D.J; CLEMENTS, K.D; COOPER, G.J.S. Determination of protein for studies of marine herbivory: a comparison of methods. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*, v. 244, n. 1, p. 45-65, fev. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-0981\(99\)00126-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-0981(99)00126-4).

DEAN, G. S. *et al.* Minimum Infective Dose of *Mycobacterium bovis* in Cattle. **Infection And Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6467-6471, out. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.73.10.6467-6471.2005>.

DZODANU, E. G. *et al.* Diagnostic Yield of Fluorescence and Ziehl-Neelsen Staining Techniques in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: a comparative study in a district health facility. **Tuberculosis Research And Treatment**, v. 2019, p. 1-6, 10 abr. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/4091937>.

EHLERS, S.; SCHAIBLE, U. E. The Granuloma in Tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. **Frontiers In Immunology**, v. 3, p. 1-9, jan. 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>.

ETCHECHOURY, I. *et al.* Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. **Zoonoses And Public Health**, v. 57, n. 6, p. 375-381, 12 ago. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01233.x>.

FIGUEIREDO, E. E. S. *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in nasal swabs from tuberculous cattle by a multiplex PCR. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 386-390, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822010000200020>.

FORRELLAD, M. A. *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3-66, jan. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.22329>.

FUJIMOTO, L B M. **Corantes Alternativos para Uso no Diagnóstico Baciloscópico da Tuberculose**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

GAGNEUX, S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 202-213, 19 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8>.

GOOD, M.; DUIGNAN, A. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-11, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/410470>;

LA RUA-DOMENECH, R. de *et al.* Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research In Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 190-210, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.11.005>.

LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, n. 2, p. 77-109, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002>.

LABORCLIN. **Coloração Ziehl-Neelsen**. 2018. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

LYASHCHENKO, K. P. *et al.* Identification of Novel Antigens Recognized by Serum Antibodies in Bovine Tuberculosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 24, n. 12, p. 1-9, 4 out. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00259-17>.

MEDEIROS, L. *et al.* Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine Tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1-4, 2010.

MENESES, I. I. F. de S. **Avaliação de Proteínas Recombinantes para Detecção de Anticorpos contra *Mycobacterium bovis* por ELISA**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

MENIN, Á. *et al.* Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 9 jan. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053884>

MICHEL, A. L.; MÜLLER, B.; VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not?. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 371-381, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.029>.

MONAGHAN, M. L. *et al.* The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 111-124, maio 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90050-7](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(94)90050-7).

MORALES, S. L. V. **A lectina bacteriana sMTL-13 regula a morte celular e produção de fator de necrose tumoral em macrófagos durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis***. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MULLER, B. I. **Molecular epidemiology and diagnosis of “*Mycobacterium bovis*” infections in African cattle**. 2010. Tese (Doutorado), University of Basel, Faculty of Science, Basel, 2010. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/18234497.pdf> Acesso em: 3 mar. 2021.

MURAI, K. *et al.* Panorama 2019-1: bovine tuberculosis. **Bulletin de L'Oie**, v. 2019, n. 1, p. 1-3, 30 maio 2019. OIE (World Organisation for Animal Health). <http://dx.doi.org/10.20506/bull.2019.1.2912>

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 888 p.

NEILL, S. D.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1-2, p. 79-86, fev. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1054/tube.2000.0279>.

NOGUEIRA, L. L. **Clonagem, expressão e caracterização imunológica do gene Rv1419 de *Mycobacterium Tuberculosis***. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

NOGUEIRA, L. L. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. **European Journal Of Immunology**, v. 40, n. 3, p. 744-753, mar. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200939747>.

NOGUEIRA, L. L. **Investigação do papel da proteína codificada pelo gene Rv1419 de *Mycobacterium tuberculosis* durante a infecção: potencial diagnóstico e propriedades imunoregulatórias**. 2012. 62 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. OIE, World Organisation For Animal Health. **Bovine Tuberculosis**. 2018. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVINE_TB.pdf. Acesso em: 1 mar. 2021.

OLIVEIRA, C. C. **Tuberculose bovina no Brasil: de 1999 a 2017**. 2019. 27 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2019.

OWJI, H. *et al.* A comprehensive review of signal peptides: structure, roles, and applications. **European Journal Of Cell Biology**, v. 97, n. 6, p. 422-441, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.06.003>.

PACHECO, A. M. *et al.* Tuberculose Bovina - Relato de Caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 13, n. 13, p. 1-5, jul. 2009. Semestral.

POLLOCK, J. M. *et al.* Immune responses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1-2, p. 103-107, fev. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1054/tube.2000.0258>.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352-366, 20 abr. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3211>.

RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 75, n. 4, p. 830-837, 10 nov. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.23613>.

RIOJAS, M. A. *et al.* Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 324-332, 1 jan. 2018. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.002507>.

RODRIGUES, R. A. *et al.* **Reações falso-negativas ao teste cervical comparativo para tuberculose bovina**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2017. 30 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983- 974X;38).

RUGGIERO, A.P. *et al.* Tuberculose Bovina: Alternativas para o Diagnóstico. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, jan. 2007.

RUSSI, L. S. *et al.* **Atualização em tuberculose bovina**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2009. 11 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado técnico, 121).

SALES, M. L. **Identificação de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* por PCR**. 2012. 62 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SALFINGER, M.; PFYFFER, G. E. The New Diagnostic Mycobacteriology Laboratory. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 13, n. 11, p. 961-979, 1994.

SANTOS, A. F. S.; LIMA, A. F. Tuberculose Pulmonar e a Formação do Granuloma: uma Revisão de Literatura. **Ciência Biológica e de Saúde Unit.**, Alagoas, v. 4, n. 2, p. 111-124, nov. 2017.

SELVA, A. F. F.; MELO, L. G. F. de; ZANINI, M. S. Avanços no diagnóstico da Tuberculose. In: SILVA, M. A. da *et al.* **Tópicos Especiais em Ciência Animal IX**. Alegre: Caufes, 2020. Cap. 5. p. 112-129.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, out. 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

- SOUZA, I. I. F. *et al.* ELISA using a recombinant chimera of ESAT-6/MPB70/MPB83 for *Mycobacterium bovis* diagnosis in naturally infected cattle. **Journal Of Veterinary Medical Science**, v. 81, n. 1, p. 9-14, 2019. Japanese Society of Veterinary Science.
- SOUZA, M. A. **Tuberculose Bovina: diagnóstico intradérmico e exames complementares em propriedade de exploração leiteira**. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
- SOUZA, N. M. de. **Avaliação da imunogenicidade da sMTL-13, uma lectina secretada de *Mycobacterium tuberculosis***. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 323-334, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37132007000300015>.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 568 p.
- TORTOLI, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 15, n. 10, p. 906-910, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03014.x>.
- WATERS, W. R. *et al.* Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Use in the Detection of Bovine Tuberculosis in Cattle. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 18, n. 11, p. 1882-1888, 14 set. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.05343-11>.
- WATERS, W. R. *et al.* Immune Responses to Defined Antigens of *Mycobacterium bovis* in Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium kansasii*. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 13, n. 6, p. 611-619, jun. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00054-06>.
- WELIN, A. *et al.* CFP-10 from *Mycobacterium tuberculosis* Selectively Activates Human Neutrophils through a Pertussis Toxin-Sensitive Chemotactic Receptor. **Infection And Immunity**, v. 83, n. 1, p. 205-213, 20 out. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.02493-14>
- WHELAN, C. *et al.* Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 3, p. 499-503, maio 2011. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638711403410>.
- WIKER, H. G.; HARBOE, M. The Antigen 85 Complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 4, p. 648-661, dez. 1992.
- WOOD, P. R.; JONES, S. L. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1-2, p. 147-155, fev. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1054/tube.2000.0272>.