

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DO USO DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DE *Mycobacterium bovis* COMO
ANTÍGENOS EM TESTE INTRADÉRMICO PARA O
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA**

Elaine Silva de Pádua Melo

CAMPO GRANDE, MS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DO USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES
DE *Mycobacterium bovis* COMO ANTIGENOS EM TESTE
INTRADÉRMICO PARA TUBERCULOSE BOVINA**

Evaluation of the usage recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* as antigens in intradermal tests for diagnosis of bovine tuberculosis

Elaine Silva de Pádua Melo

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS
2014

Certificado de aprovação

ELAINE SILVA DE PÁDUA MELO

AVALIAÇÃO DO USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Mycobacterium bovis* COMO ANTÍGENOS EM TESTE INTRADÉRMICO PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA

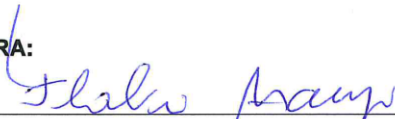
Evaluation of the usage of recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* as antigens in intradermal tests for the diagnosis of bovine tuberculosis

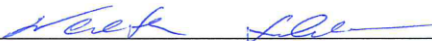
Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de doutora em Ciência Animal.


Área de concentração: Saúde Animal.


Aprovado (a) em: 20/02/2014

BANCA EXAMINADORA:


Doutor Flávio Ribeiro de Araújo
(EMBRAPA) - (Orientador)


Doutor Walter Lilenbaum
UFF


Doutor Newton Valério Verbisck
Embrapa/CNPGC


Doutora Klaudia dos Santos Goncalves Jorge
UFMS


Doutora Ana Luiza Alves Rosa Osório
UFMS

*Ao Pedro,
meu pedacinho e expressão de um grande amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, pela orientação e apoio em mais essa etapa.

À Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório, professora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela grande ajuda nos testes com os animais, por sua tranquilidade imprescindível na execução dos trabalhos e pelos ensinamentos.

Ao Carlos Alberto do Nascimento Ramos, doutor em Medicina Veterinária, por ser antes de tudo um esposo maravilhoso, meu orgulho e minha força. Obrigada pela participação integral no meu doutorado, sendo um pouco... orientador, estatístico, tradutor, crítico, parceiro de laboratório, veterinário, tratador de animais, caçador de maravalha e além de tudo por resolver o irresolúvel dentro do laboratório.

Ao Pedro de Pádua Melo Ramos, meu filho, que quando eu iniciei o doutorado, dava os primeiros passinhos em sua vida e hoje, aos quatro anos, já é um grande super-herói, ou melhor, cada dia é um herói diferente. Obrigada por sua alegria, seu sorriso, seu carinho e por entender de alguma forma que a mamãe precisava ficar longe para cuidar dos “*xinhos*” (cobaias).

À minha família, pelo amor e por acreditarem sempre em mim. Especialmente à minha mãe por cuidar com tanto carinho do meu filho, permitindo assim que eu pudesse fazer meu doutorado.

À Dra. Iandara Schettert Silva, professora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por todas as oportunidades, apoio e incentivo.

Ao Dr. Newton Verbisky, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, pela análise crítica e valiosas sugestões à tese, e pelas análises de espectrometria de massas.

À Marilete, ex-secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela paciência, atenção e ajuda desde o mestrado.

Às colegas do laboratório de Imunologia da Embrapa Gado de Corte, Letícia Carvalho, Cristina Pires e Ana Beatriz, pela ajuda e pelos bons momentos passados juntas.

À Lívia dos Santos Russi, mestre em Ciência Animal, pela longa amizade, proatividade nata e pelo incentivo.

À Ingrid Ieda Fernando de Souza, mestre em Ciência Animal, pela amizade, por ser uma grande companheira de laboratório que sempre me ajudou em tudo e principalmente a não desanimar com as loucuras das induções e purificações. Obrigada pelas várias horas dedicadas ao GenBank e aos deliciosos bolos de sempre.

Ao Renato Henrique Marçal, técnico de laboratório da Embrapa Gado de Corte, pelo auxílio com os cobaios e no laboratório.

Aos Srs. Américo e Valdir, funcionários da Embrapa Gado de Corte, por buscarem os cobaios no Lanagro de Campinas-SP e cuidarem dos animais na viagem.

Aos funcionários do campo da Embrapa Gado de Corte, pela contenção dos bovinos.

Aos estagiários, funcionários e pesquisadores da Embrapa Gado de Corte, pela agradável convivência durante todos esses anos.

À Embrapa Gado de Corte, pela possibilidade de utilização dos laboratórios e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-SP), pelo fornecimento dos cobaios, especialmente a Sra. Ester Garcia Rossi, chefe do Biotério, pela atenção.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-MG), especialmente a Sra. Paula Matos Garcia Rosa pelo treinamento com os cobaias.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

*A alegria não chega apenas no encontro do
achado, mas faz parte do processo da busca.*
Fernando Pessoa.

*Alegria é visualizar uma única
banda após tantas horas de
purificação, trabalhando com o
invisível.*

*Alegria é cultivar overnight e
verificar que o shaker não desligou
após oscilação de energia e o
cultivo cresceu.*

*Alegria é purificar muita proteína e
a coluna de cromatografia não
travar.*

*Alegria é fazer uma PCR e o gene
amplificar.*

*Alegria é trabalhar com clones
poderosos, que nunca deixam de
expressar.*

*Alegria é fazer uma eletroforese e
mesmo com várias atividades para
fazer, não esquecer de desligar.*

*Alegria é transferir o gel em um
Western blot e uma banda revelar.*

*Alegria é verificar que a proteína
continua solúvel após dialisar.*

*Alegria é ter várias proteínas para
purificar e não ter que o pH das
soluções acertar.*

Resumo

MELO, E.S.P. Avaliação do uso de proteínas recombinantes de *Mycobacterium bovis* como antígenos em teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose bovina. 2014. 99 folhas. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

A tuberculose bovina é uma doença de importância econômica e zoonótica, causada principalmente por *Mycobacterium bovis*. Como não existe uma vacina eficaz para essa doença, os programas para seu controle e erradicação consistem no diagnóstico e abate de animais infectados com base nos resultados do teste de imunidade celular *in vivo*, o teste intradérmico. Nesse ensaio são utilizados os derivados proteicos purificados (PPD) de *M. bovis* que são capazes de induzir reações de hipersensibilidade tardia em animais infectados. No entanto, devido a problemas relacionados principalmente à especificidade da mistura de proteínas que compõem o PPD, que pode resultar em reações cruzadas com outras micobactérias, a busca por novos antígenos se faz necessária. Nesse sentido, proteínas específicas de *M. bovis* envolvidas na resposta imune celular têm sido testadas em substituição ao PPD bovino no teste intradérmico, com resultados promissores. O objetivo do presente estudo foi produzir proteínas recombinantes de *M. bovis* e avaliá-las como antígenos em teste intradérmico em *Cavia porcellus* e bovinos. As proteínas recombinantes ESAT-6, PE13, PE5, ESX-1, Mb0143 e TB10.4 foram produzidas em *Escherichia coli* e purificadas por cromatografia de afinidade agarose-níquel em condição nativa. A proteína ESAT-6 foi purificada também em condição desnaturante. As proteínas ESAT-6, PE13, PE5 e ESX-1, quando testadas em *Cavia porcellus*, apresentaram capacidade para diferenciar animais previamente sensibilizados com cepa *M. bovis* AN5 inativada dos não sensibilizados, quando combinadas em forma de um coquetel contendo 40 µg de cada proteína. As condições de solubilização e purificação influenciaram o desempenho antigênico das proteínas em estimular hipersensibilidade tardia, pois a proteína ESAT-6 produzida em condição desnaturante desencadeou reação inespecífica nos animais não sensibilizados, enquanto que aquelas produzidas em condições nativas e aplicadas em baixas concentrações (6, 12, 24 e 48 µg) induziram reações significativas nos animais sensibilizados, confirmando o seu potencial para o diagnóstico. Quando testadas em bovinos, apenas as proteínas ESX-1, Mb0143 e PE5 aplicadas individualmente, foram capazes de diferenciar bovinos sensibilizados de não sensibilizados quando 320 µg das proteínas foram injetadas. As proteínas recombinantes de *M. bovis* aqui caracterizadas demonstraram resultado promissor para serem utilizadas como antígenos em teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose bovina.

Palavras-chave: teste intradérmico, proteína recombinante, diagnóstico.

Abstract

MELO, E.S.P. Evaluation of the usage recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* as antigens in intradermal tests for diagnosis of bovine tuberculosis. 2014. 99 folhas. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Bovine tuberculosis is a disease of economic and zoonotic importance, mainly caused by *Mycobacterium bovis*, and as there is no an effective vaccine for this disease, the control and eradication consist in the diagnosis and slaughter of the infected animals based on the tuberculin skin test result. In this assay purified protein derivative (PPD) of *M. bovis* that induce a delayed hypersensitivity reactions in infected animals is used. However, due to problems mainly related to the specificity of the PPD protein mixture, which may result in cross-reactions with other mycobacteria, the search for new antigens are needed. Thus, specific proteins of *M. bovis* involved in cell mediated immunity have been assessed to replace the bovine PPD in skin tests showing promising results. The aim of this study was to produce recombinant proteins of *M. bovis* and evaluate them as antigens in skin tests in guinea pigs and cattle. The recombinant proteins ESAT-6, PE13, PE5, ESX-1 Mb0143 and TB10.4 were produced in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography using nickel agarose resin, under native condition. The ESAT-6 protein was also purified in denaturing condition. The proteins ESAT-6, PE13, PE5 and ESX-1, when combined in the form of a cocktail containing 40 µg of each protein, differentiate guinea pigs were able previously sensitized with *M. bovis* strain AN5 from non-sensitized animals. The purification conditions influenced the antigenic performance of the proteins to stimulate a delayed hypersensitivity response, since the ESAT-6 protein produced in denaturing condition triggered nonspecific reactions in non-sensitized animals, whereas under native condition and applied at low concentrations (6, 12, 24 and 48 µg) resulted in significant reactions only in sensitized animals, confirming their potential for diagnosis. When tested in cattle, only the proteins ESX-1, Mb0143 and PE5 individually were able to differentiate between non-sensitized and sensitized cattle when 320 µg of protein was injected. The recombinant proteins of *M. bovis* showed promising results for use on skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis.

Keywords: skin test, recombinant protein, diagnostics.

Lista de ilustrações

Figura 1. Modelo do sistema de secreção (ESX) composto por proteínas da região de diferença 1 (RD1).....	44
Figura 2. Representação dos genes codificados pela região de diferença 1 (RD1), presentes nas cepas virulentas de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> que foram deletados do Bacilo de Calmette-Guérin (BCG).....	45

Lista de tabelas

Tabela 1. Interpretação do Teste Cervical Simples em bovinos.....	28
Tabela 2. Interpretação do Teste Cervical Comparativo em bovinos.....	29

Lista de abreviaturas e siglas

BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CFP10	<i>Culture filtrate protein 10 kDa</i>
CMT	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ESAT-6	<i>Early secretory antigenic target 6 kDa</i>
ESX	Sistema de secreção
ETR	<i>Exacts tandem repeat</i>
HE	Hematoxilina eosina
IL-12	Interleucina 12
IFN- γ	Interferon gama
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal classe II
MIRU	<i>Mycobacterial interspersed repetitive units</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ORF	<i>Open reading frames</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
PPD	Derivado proteico purificado
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RD	Região de diferença
Spoligotyping	<i>Spacer oligonucleotide typing</i>
TCS	Teste cervical simples
TCC	Teste cervical comparativo
TNF	Fator de necrose tumoral
TPC	Teste da prega caudal
UI	Unidades Internacionais
VNTR	<i>Variable numbers of tandem repeats</i>

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	15
2.0 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivos gerais.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Importância econômica.....	18
3.2 Agente etiológico.....	19
3.3 Transmissão.....	21
3.4 Imunopatogenia.....	22
3.5 Diagnóstico.....	24
3.5.1 Ensaio <i>ante mortem</i>	25
3.5.1.1 Exame clínico.....	25
3.5.1.2 Teste intradérmico.....	26
3.5.1.3 Quantificação de interferon gama (IFN- γ).....	30
3.5.1.4 Ensaio sorológicos.....	32
3.5.2 Ensaio <i>post mortem</i>	34
3.5.2.1 Exame macroscópico.....	34
3.5.2.2 Isolamento em cultura.....	35
3.5.2.3 Exame histopatológico.....	37
3.5.2.4 Diagnóstico molecular.....	38
3.6 Controle.....	39
3.6.1 Desenvolvimento de vacinas.....	40
3.6.2 Proteínas de <i>M. bovis</i> como antígeno em ensaios de diagnóstico.....	42
REFERÊNCIAS.....	50
Artigo 1. Teste intradérmico com proteínas recombinantes de <i>Mycobacterium bovis</i> em <i>Cavia porcellus</i>	62
Abstract	62
Resumo	63

Introdução	64
Material e Métodos	65
Amplificação dos genes.....	65
Clonagem dos genes e produção das proteínas recombinantes.....	65
Aspectos éticos.....	66
Sensibilização com <i>Mycobacterium bovis</i>	66
Teste intradérmico.....	66
Avaliação da influência das condições de purificação no desempenho antigênico das proteínas.....	66
Análise estatística.....	67
Resultados	67
Discussão	68
Conclusão	70
Referências	71
Artigo 2. Avaliação do uso de proteínas recombinantes de <i>Mycobacterium bovis</i> como antígenos no teste intradérmico em bovinos.....	78
Resumo	79
Introdução	80
Material e métodos	81
Aspectos éticos.....	81
Sensibilização dos bovinos.....	82
Amplificação dos genes.....	82
Clonagem dos genes, produção e avaliação das proteínas recombinantes.....	83
Teste intradérmico.....	84
Análise estatística.....	85
Resultados	85
Discussão	86
Abstract	91
Referências	91

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença de importância econômica e zoonótica, causada por agentes bacterianos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (MICHEL et al., 2010; VALENTE et al., 2011). A principal espécie causadora da tuberculose bovina é *Mycobacterium bovis* (CORNER et al., 2012), no entanto, outras espécies podem estar envolvidas como *Mycobacterium caprae* em algumas regiões da Europa (PRODINGER et al., 2005) e mais raramente *Mycobacterium tuberculosis* na África (BERG et al., 2009) e Índia (THAKUR et al., 2012) e *M. africanum* na Ásia (RAHIM et al., 2007).

A importância econômica da tuberculose bovina é atribuída às perdas diretas resultantes da diminuição da produção de leite, do descarte precoce, eliminação de animais de alto valor zootécnico e condenação de carcaças no abate (BRASIL, 2006). Além disso, a presença da tuberculose nos rebanhos torna os produtos provenientes da pecuária vulneráveis as barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional (MICHEL et al., 2010; KORO et al., 2013).

A importância zoonótica da tuberculose bovina está relacionada ao fato de que *M. bovis* pode ser transmitido por via aerógena ou orofaríngea ao homem e provocar enfermidade indistinguível daquela causada por *M. tuberculosis*. A maioria dos casos de tuberculose humana é decorrente de infecção por *M. tuberculosis* e um número bem menor de casos são atribuídos a *M. bovis*. Mas a real incidência de *M. bovis* em humanos pode ser subestimada (KANTOR et al., 2010).

Não existe disponível uma vacina eficaz para a tuberculose bovina e o controle e erradicação da doença consiste no diagnóstico e abate de animais infectados (OIE, 2013). A definição do estado de infecção desses bovinos é estabelecida principalmente com base nos resultados de teste de imunidade celular *in vivo*, mais especificamente o teste intradérmico (COCKLE et al., 2006). Nesse teste, uma resposta imune mediada por células é desencadeada apenas em animais infectados, após a inoculação intradérmica de extrato de *M. bovis*, denominado derivado proteico purificado (PPD)

(MONAGHAN et al., 1994). O teste de tuberculinização pode ser realizado na prega caudal (recomendado apenas para bovinos de corte), ou na região cervical. Este último pode ser simples, ou seja, realizado apenas com PPD de *M. bovis* ou comparativo, realizado simultaneamente com PPD de *M. bovis* e PPD de *M. avium* (BRASIL, 2006).

No Brasil, de acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), instituído pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o teste de tuberculinização cervical simples (TCS) deve ser utilizado como teste de triagem. Uma vez definidos os animais positivos, estes podem ser submetidos ao teste de tuberculinização cervical comparativa (TCC) para confirmar os resultados positivos e excluir possíveis reações cruzadas com espécies de micobactérias não tuberculosas (BRASIL, 2006).

Embora seja o teste oficial para auxiliar no controle da tuberculose bovina em diversos países (OIE, 2013), o teste intradérmico com PPD tem apresentado alguns problemas, principalmente relacionados à especificidade e sensibilidade (MENIN et al., 2013). A especificidade é reduzida devido à sensibilização dos bovinos com cepas de micobactérias ambientais ou infecção com *M. avium* subs. *paratuberculosis* (XIN et al., 2013). O extrato bacteriano (PPD) é uma mistura complexa de proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos nucléicos, sendo muitos desses componentes inclusive, compartilhados por inúmeras espécies de micobactérias (tuberculosas ou não). Essa complexidade antigênica é, provavelmente, a principal causa da ocorrência de reações inespecíficas nos testes de tuberculinização (MONAGHAN et al., 1994). Além disso, países que já atingiram certo nível de controle da enfermidade, reduzindo a prevalência da doença, testes diagnósticos sensíveis e mais específicos são necessários para o avanço na estratégia de controle em direção à erradicação (MENIN et al., 2013).

Visando solucionar esses problemas, várias pesquisas têm sido focadas em antígenos específicos de *M. bovis* ou do CMT, para substituir o PPD no teste intradérmico. Alguns desses antígenos têm proporcionado resultados animadores, como ESAT-6 e CFP10, que são fortes estimuladores da produção de interferon gama

(IFN- γ), principal citocina da resposta imune celular estabelecida durante a infecção por micobactérias (MUSTAFA et al., 2002; PALMER; WATERS, 2006).

O uso dessas proteínas no diagnóstico tem apresentado relevância principalmente por terem demonstrado capacidade em distinguir infecção por *M. bovis* de infecção por *M. avium* (WATERS et al., 2004; AAGAARD et al., 2010; XIN et al., 2013), além de diferenciar entre bovinos infectados naturalmente com *M. bovis* de bovinos vacinados contra paratuberculose e vacinados experimentalmente contra a tuberculose utilizando o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (BUDDLE et al., 2003; WHELAN et al., 2010).

Com o sequenciamento do genoma de espécies de *Mycobacterium*, dentre os quais *M. bovis*, *M. tuberculosis* e *M. avium* (GARNIER et al., 2003), inúmeros genes codificadores de proteínas promissoras para o diagnóstico da tuberculose bovina foram identificadas (JONES et al., 2012; XIN et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do presente estudo foi produzir proteínas recombinantes de *Mycobacterium bovis* e avaliá-las como antígenos em teste intradérmico em *Cavia porcellus* e bovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir proteínas recombinantes solúveis;
- Avaliar o desempenho das proteínas combinadas ou individualmente em teste intradérmico;
- Verificar se as condições de purificação interferem no desempenho das proteínas em teste intradérmico;

- Avaliar a viabilidade de utilização de modelo experimental para a tuberculose bovina utilizando animais sensibilizados com cepa inativada;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância econômica

A tuberculose bovina já foi erradicada de diversos países desenvolvidos nos quais programas de controle foram estabelecidos (MICHEL et al., 2010), mas ainda é comum em países em desenvolvimento, onde causa significativas perdas econômicas (KORO et al., 2013) estimadas para a agricultura mundial em três bilhões de dólares anuais (GARNIER et al., 2003).

A doença nos bovinos pode acarretar um aumento do intervalo entre os partos e a produção de crias debilitadas, gerar uma necessidade maior de substituição dos animais no rebanho e diminuir o valor comercial dos produtos provindos de fazendas onde a tuberculose foi identificada (ABRAHÃO et al., 2005).

O Brasil abateu no último ano 40,4 milhões de cabeças de gado, chegando a exportar cerca de 20% da produção nacional de carne (ABIEC, 2013) e representa junto com a Argentina, o maior exportador de carne da América Latina (KANTOR et al., 2010). Diante deste cenário, a presença da tuberculose nos rebanhos torna os produtos oriundos da pecuária vulneráveis as barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional (MICHEL et al., 2010; KORO et al., 2013). Como a Rússia, maior importadora de carne *in natura* do Brasil (29%) no primeiro trimestre de 2013 (IBGE, 2013) que estabeleceu como requisito para a importação que a carne e seus produtos sejam livres de doença como a tuberculose (ABIEC, 2013).

A cronicidade da doença (POLLOCK; NEILL, 2002), aliada a reduzida mortalidade dos animais, colabora para a baixa percepção dos pecuaristas quanto aos prejuízos que a tuberculose bovina é capaz de gerar. No entanto, ela é responsável por deteriorar a capacidade produtiva e reprodutiva dos animais (VALENTE et al., 2011).

3.2 Agente etiológico

As bactérias causadoras de tuberculose em animais e no homem pertencem à Classe Actinobacteria, Ordem Actinomycetales, Família Mycobacteriaceae e Gênero *Mycobacterium* que é composto por dois grandes complexos, denominados complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), que compreende as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii* (NIEMANN et al., 2000), *M. pinnipedii* (COUSINS et al., 2003), *M. caprae* (ARANAZ et al., 2003) e *M. mungi* (ALEXANDER et al., 2010) e a subespécie *M. orygis* (VAN INGEN et al., 2012), e complexo *M. avium-intracellulare* (MAC), formado por cepas não tuberculosas, no qual existem duas espécies *M. avium* e *M. intracellulare*, sendo que a primeira é subdividida em quatro subespécies, *M. avium avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum* e *M. avium hominissuis* (BIET et al., 2005).

Apesar de as micobactérias do complexo MAC não serem virulentas para os bovinos, com exceção de *M. avium paratuberculosis* que causa a gastroenterite crônica de ruminantes, conhecida como doença de Johne's (FACCIUOLO et al., 2013), as espécies desse complexo são de grande importância, pois causam reações inespecíficas no teste intradérmico, o que dificulta o diagnóstico da tuberculose bovina (MONAGHAN et al., 1994; POLLOCK et al., 2005; AAGAARD et al., 2010).

A principal cepa infectante para os bovinos é *M. bovis* e é a mais virulenta entre as espécies do complexo *M. tuberculosis*. Apresenta uma das maiores gamas de hospedeiros conhecidos, sendo capaz de infectar muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem (O'REILLY; DABORN, 1995) e os bovinos expostos a esse organismo podem desenvolver doença crônica (POLLOCK; NEILL, 2002).

Mycobacterium bovis e *M. tuberculosis* são as espécies mais fortemente relacionadas geneticamente, com homologia de 99,95%, mostrando colinearidade e nenhuma evidência de grandes translocações, duplicações ou inversões (GARNIER et al., 2003). As principais diferenças entre elas correspondem às deleções ocorridas no

genoma de *M. bovis* e a polimorfismos nucleotídicos únicos em genes que codificam para proteínas secretadas e de parede celular (ABALOS; RETAMAL, 2004).

As micobactérias, em geral, são caracterizadas por serem bacilos imóveis, não esporulados, não encapsulados, não produtores de toxina, microaerófilos, medindo de 1 a 100 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura. Apresentam a propriedade morfotintorial de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), devido à capacidade de formar complexos com os derivados de trifenilmetano, resistindo à ação do álcool-ácido (CORNER, 1994). *Mycobacterium bovis* é resistente à ação de agentes químicos, mas sensível à ação de agentes físicos, como a radiação ultravioleta e o calor (POLLOCK; NEILL, 2002). São espécies dependentes da oferta de oxigênio e exigentes quanto ao suprimento de nutrientes (GRANGE et al., 1996; CORNER et al., 2012).

Uma característica dos membros desse gênero é a baixa permeabilidade da parede celular, com alta proporção de lipídeos complexos que são organizados em três compartimentos superpostos, a membrana citoplasmática, uma camada intermediária e a cápsula. Os componentes do envoltório celular incluem ácidos micólicos, arabinogalactanos, lipoproteínas, lipomananos, lipoarabinomananos e glicolipídeos, responsáveis pela primeira interação entre o bacilo e a célula hospedeira (SANI et al., 2010; BANERJEE et al., 2011; PIRSON et al., 2012). As micobactérias são classificadas como bactérias Gram-positivas, apesar de possuírem envelope rico em lipídeos semelhante às bactérias Gram-negativas (SANI et al., 2010).

Esse elevado conteúdo lipídico da parede celular das micobactérias, que pode atingir até 40% do peso seco das células, é responsável por importantes efeitos biológicos no hospedeiro, como a indução da formação de granuloma, atividade adjuvante, capacidade de sobrevivência dentro da célula do hospedeiro, patogenicidade (POLLOCK; NEILL, 2002), resistência a colorações laboratoriais simples e a antibióticos comuns (KAUFMAN; ANDERSEN, 1998).

3.3 Transmissão

A infecção por *M. bovis* é influenciada por diversos fatores, tais como idade, meio ambiente, práticas de manejo adotadas (NEILL et al., 1994), condições imunológicas, resistência genética e transporte (HUMBLET et al., 2009). A via de transmissão mais comum e mais importante é a aerógena (O'REILLY; DABORN, 1995), correspondendo a cerca de 90% das infecções (NEILL et al., 1994).

Os animais infectados são a principal fonte de infecção, pois são capazes de transmitir a doença a outros animais, antes mesmo do desenvolvimento de lesões teciduais (ROXO, 1997) e com o avanço da doença esse potencial de transmissão aumenta (KHATRI et al., 2012). A capacidade que um animal infectado tem de transmitir a micobactéria para outro depende da geração de aerosol, do número de bacilos excretados e da densidade do rebanho (POLLOCK et al., 2006).

Além da disseminação pela respiração, o bacilo pode ser eliminado pela secreção nasal, leite, fezes, urina, secreção vaginal e uterina e também pelo sêmen (RUGGIERO et al., 2007). Apesar da transmissão congênita e por contato com órgãos genitais ocorrer, elas são raras (NEILL et al., 1994).

A via orofaríngea pode ser considerada como o meio secundário mais comum de infecção, sendo o principal meio de contaminação para bezerros jovens que se alimentam de leite materno contaminado por *M. bovis* proveniente de vacas tuberculosas (NEILL et al., 1994).

Estudos têm demonstrado que a forma de criação, intensiva ou extensiva e a raça dos animais destacam-se como os principais fatores de risco para o aumento da prevalência e da suscetibilidade dos bovinos à tuberculose (AMENI et al., 2006; AMENI et al., 2007). Há indicações de que bovinos *Bos indicus* (Zebu) sejam mais resistentes à tuberculose do que *Bos taurus* (Europeu) (FIRDESSA et al., 2012). E a aglomeração dos animais em estábulos e a inadequação das instalações zootécnicas contribuem para ampliar a sobrevivência de *M. bovis* no ambiente e propicia o contato estreito e frequente entre os animais infectados e suscetíveis, o que facilita a propagação da

enfermidade com maior eficiência (BRASIL, 2006). Somado a isso, a transmissão pela via respiratória é facilitada pelo substancial movimento dos rebanhos dentro da propriedade, entre as propriedades e por meio de eventos agropecuários (JORGE et al., 2004a).

Mycobacterium bovis pode ainda ser transmitido dos bovinos para o homem, principalmente por meio do consumo de leite não pasteurizado e por aerossol devido ao contato próximo dos animais infectados com veterinários, ordenhadores, produtores rurais e trabalhadores de matadouros e frigoríficos (AMENI et al., 2006; MICHEL et al., 2010; TORRES-GONZALEZ et al., 2013). Esse caráter ocupacional caracteriza a tuberculose bovina como uma importante zoonose, apresentando maior relevância à saúde pública nos países em desenvolvimento (ROXO et al., 1997).

3.4 Imunopatogenia

A manifestação da tuberculose é influenciada pela resposta imune individual. Na maioria das vezes, em razão do predomínio dessa resposta, o bacilo pode coexistir com o hospedeiro na forma de uma infecção latente, que em condições imunossupressivas pode ser reativada, causando o aparecimento de tuberculose ativa (RUGGIERO et al., 2007) ou a micobactéria pode ser morta e eliminada do hospedeiro a partir do primeiro contato com os macrófagos (WELSH et al., 2005).

No início da infecção por *M. bovis*, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos, que subsequentemente interagem com outras células envolvidas nas respostas imunes inata e adquirida nos tecidos ou linfonodos dos bovinos (POLLOCK; NEILL, 2002). É produzida predominantemente uma resposta imune mediada por células, com pouca ou nenhuma produção de anticorpos e, com o progresso da doença essa produção é iniciada ou aumentada. Assim, existe uma correlação inversa entre o curso da resposta imune celular e humoral e o avanço da doença (RITACCO et al., 1991). A imunidade celular ocorre a partir da fagocitose e processamento de *M. bovis* pelos macrófagos, células dendríticas ou células de Langerhans, seguido pela apresentação desses antígenos associados às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal

classe II (MHC II), aos linfócitos T que expressam co-receptores CD4 (NEILL et al., 1994). Essa interação resulta no estabelecimento de resposta imunológica do tipo Th1 (POLLOCK et al., 2006), caracterizada pela produção de IFN- γ , interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF), que é considerada a principal via de recrutamento de outros macrófagos, linfócitos e fibroblastos (POLLOCK et al., 2001). Nessa resposta os linfócitos T CD4 correspondem à população de células dominantes na produção de IFN- γ , enquanto que os linfócitos T CD8 são envolvidos na lise das células infectadas (LIÉBANA et al., 2000).

A função dos macrófagos após a infecção pelas micobactérias é essencialmente dependente do fenótipo da célula T ativada, e essa ativação é determinada pela sinalização dos receptores de reconhecimento padrão (PRR), que estimulam a produção de IFN- γ após a interação com os lipídeos micobacterianos (ANDRADE et al., 2012), essencialmente com a fração lipídica polar (PIRSON et al., 2012).

A resposta imune humoral durante a tuberculose bovina é caracterizada pelo reconhecimento antigênico altamente heterogêneo, devido às variações que ocorrem na produção de proteínas micobacterianas, que são expressas em diferentes estágios da doença em um mesmo hospedeiro, ou seja, ocorre uma mudança no padrão de imunodominância dos antígenos (LYASHCHENKO et al., 1998).

Após a infecção por *M. bovis*, os órgãos e tecidos afetados pelas lesões primárias dependem da via de transmissão e da rota de disseminação de *M. bovis* para outros órgãos (MICHEL et al., 2010; MENIN et al., 2013). Se a infecção for por via respiratória, por meio dos aerossóis, o pulmão é o primeiro órgão atingido, assim como os linfonodos torácicos e craniais. Se for via sistema digestório a lesão se desenvolve primeiramente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos, podendo atingir praticamente todos os órgãos com a evolução e generalização da doença (ROXO, 1997).

As lesões primárias aparecem geralmente de 7 a 11 dias após a infecção e são pequenas, de cor amarelo pálido e com o núcleo caseoso, sendo visualizadas microscopicamente células gigantes contendo BAAR e debris de neutrófilos (POLLOCK

et al., 2006). Em muitos casos, as lesões podem ser confluentes tomando todo o parênquima pulmonar e formar lesões cavitárias, com expectoração de material bacilífero (ROXO, 1997). Conforme essas lesões progredem, ocorre o desenvolvimento de necrose consistindo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, além de mineralização e fibrose (POLLOCK et al., 2006).

3.5 Diagnóstico

Vários métodos estão disponíveis e consistem em avanços para o diagnóstico e controle da tuberculose bovina. Entre estes encontram-se os ensaios *ante mortem* como o exame clínico, o teste intradérmico, o ensaio celular baseado na quantificação de IFN- γ e os testes sorológicos, e os ensaios *post mortem*, como o diagnóstico de lesões macroscópicas, o exame microscópico da lesão, isolamento em cultivo, caracterização bioquímica e os métodos moleculares (OIE, 2013).

O principal problema no diagnóstico da tuberculose bovina é o longo tempo necessário para obter um diagnóstico definitivo, que é o isolamento e a identificação bioquímica de *M. bovis* (STEWART et al., 2012). Além dos problemas relativos à especificidade e sensibilidade que resultam em reações falso-positivas devido à existência de infecção cruzada com *M. avium* e micobactérias ambientais que compartilham antígenos, principalmente em situações epidemiológicas de baixa prevalência. Há ainda reações falso-negativas inerentes ao estado de anergia dos animais (RIVERA et al., 2009; ÁLVAREZ et al., 2012). Este cenário dificulta a tomada de decisão para a aplicação de medidas sanitárias com o intuito de controle e erradicação dessa enfermidade.

Como não existe um método *ante* ou *post mortem* com eficácia absoluta, ou seja, capaz de detectar todos os animais infectados com *M. bovis*, recomenda-se que mais de um método seja utilizado para o diagnóstico e que os resultados laboratoriais sejam interpretados em conjunto com os achados clínicos e de acordo com cada situação epidemiológica (BRASIL, 2006; DE LA RUA DOMENECH et al., 2006; RUGGIERO et al., 2007). Uma estratégia indicada também é aplicar métodos que permitam identificar

a resposta imune celular e humoral e o resultado confirmado por isolamento e identificação por meio de provas bioquímicas ou pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma vez que os animais de um mesmo rebanho podem estar em diferentes estágios da infecção. Assim, métodos confirmatórios podem garantir a confiabilidade do diagnóstico (FRÁGUAS et al., 2008; MARASSI et al., 2013).

Um dos desafios para os países em desenvolvimento é a disponibilização de metodologia que assegure a distinção entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*, para o acompanhamento da transmissão de *M. bovis* para humanos e para a elaboração de uma análise fiel da situação epidemiológica da tuberculose zoonótica em diversas regiões, principalmente naquelas aonde a doença é endêmica e a tuberculose bovina e humana coexistem (RUGGIERO et al., 2007).

3.5.1 Ensaios *ante mortem*

3.5.1.1 Exame clínico

Os sinais clínicos em bovinos com tuberculose são limitados e dificultam o diagnóstico presuntivo. Embora as lesões possam envolver vários órgãos da cavidade torácica e abdominal, o animal pode não mostrar evidências da doença no estágio terminal (THOEN et al., 2009; RUGGIERO et al., 2007), o que caracteriza a infecção subclínica. Quando presentes, os sinais clínicos podem incluir fraqueza, anorexia, dispnéia, emagrecimento, aumento de gânglios linfáticos e tosse, porém não são patognomônicos (OIE, 2013).

Também deve ser levada em consideração a existência de um tempo entre a infecção primária, o desenvolvimento de uma resposta imunológica e o aparecimento dos sinais clínicos (MENIN et al., 2013). Além disso, a manifestação da doença é influenciada pela resposta imune individual e o bacilo pode coexistir com o hospedeiro na forma de uma infecção latente, que em condições imunossupressivas pode ser reativada (RUGGIERO et al., 2007).

Em estudo com bovinos naturalmente infectados, positivos em teste intradérmico, Menin et al. (2013) observaram que 92,3% dos animais avaliados não apresentavam sinais clínicos sugestivos de infecção por micobactérias. No entanto, na avaliação *post mortem*, 95,2% desses bovinos apresentavam lesões visíveis graves associadas à tuberculose. Isto significa que esses animais assintomáticos e sem evidência de lesões desempenham papel importante na transmissão da bactéria e manutenção da doença, devido à dificuldade de serem diagnosticados e eliminados do rebanho.

3.5.1.2 Teste intradérmico

O teste intradérmico é o método padrão para a detecção da tuberculose bovina (OIE, 2013). Consiste na injeção intradérmica de PPD e avaliação de uma reação de hipersensibilidade tardia, deflagrada a partir da interação entre células T CD4 previamente sensibilizadas e os antígenos (PPD) apresentados por macrófagos associados às moléculas do MHC II (MONAGHAN et al., 1994; POLLOCK et al., 2006), que é caracterizada por uma reação inflamatória intensa, edema discreto, infiltração de grande quantidade de células mononucleares no tecido e que atinge a intensidade máxima 72 horas após a inoculação (POLLOCK et al., 2005).

Existem dois antígenos utilizados para desencadear as reações de hipersensibilidade: o PPD bovino, proveniente de *M. bovis* cepa AN5, e aviário oriundo de *M. avium* cepa D4 (BRASIL, 2006). O PPD é preparado a partir de micobactérias cultivadas em meio líquido sintético, tratadas pelo calor de vapor de fluxo livre, filtrada, concentrada por precipitação, lavada e dissolvida em uma preparação estéril isenta de micobactérias intactas, consistindo em uma mistura de proteínas não definidas, juntamente com lipídios, açúcares, ácidos nucléicos e uma grande variedade de antígenos que são comuns em várias espécies de micobactérias (MONAGHAN et al., 1994).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) estabelece no Código Sanitário Internacional que a potência do PPD produzido deva ser estimada por métodos

biológicos, com base na comparação a um PPD padrão e expressa em Unidades Internacionais (UI). Na maioria dos países, a potência estimada considerada aceitável para o PPD bovino é de 2000 UI. Sendo que em bovinos com diminuição da sensibilidade alérgica ou em campanhas de erradicação são recomendadas doses de até 5000 UI (OIE, 2013). Esse teste de potência antigênica do PPD é realizado em modelos animais da espécie *Cavia porcellus* (MORRISON et al., 2000; OIE, 2013), por apresentarem respostas imunológicas semelhantes às observadas nos bovinos, antes da partida de antígeno ser liberada para o uso (MEIKLE et al., 2011). O PPD bovino produzido no Brasil contém 1 mg de proteína por ml (32.500 UI) e é recomendada a aplicação de 100 µg (3320 UI) e o PPD aviário contém 0,5 mg de proteína por ml (25.000 UI), aplicado na concentração de 50 µg (2500 UI) (BRASIL, 2006).

O PPD pode ser aplicado basicamente de duas formas para a realização do teste cutâneo nos animais, no teste cervical simples (TCS) em que se utiliza como antígeno o PPD bovino, e no teste cervical comparativo (TCC) que emprega o PPD bovino em comparação ao PPD aviário (MONAGHAN et al., 1994). Além desses métodos existe ainda o teste da prega caudal (TPC), que é indicado para triagem ou monitoramento de rotina apenas em gado de corte, aplicando-se o PPD bovino na base da cauda do animal na junção da pele pilosa e da pele glaba (BRASIL, 2006).

No TCS, o PPD bovino é inoculado por via intradérmica no terço médio da região cervical ou na região escapular, em local anteriormente demarcado por tricotomia (BRASIL, 2006). Antes e 72 horas após a inoculação é realizada a medida da espessura da dobra da pele com a utilização de um cutímetro, para verificar a presença de reação ao PPD de *M. bovis* caracterizado pela endureção ou inchaço da pele (OIE, 2013), determinado pelo infiltrado de células mononucleares e formação de edema (NEILL et al., 1994).

O aumento da espessura da dobra da pele é calculado subtraindo-se da medida da dobra da pele 72 horas após a inoculação, a medida tomada no dia da inoculação para o PPD bovino e os resultados obtidos no TCS são interpretados (TABELA 1) de acordo com o estabelecido no Regulamento Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Os animais reagentes inconclusivos, podem a critério do médico veterinário habilitado, serem submetidos a um teste confirmatório, em um intervalo de 60 a 90 dias ou serem considerados positivos e destinados ao abate sanitário em estabelecimento com inspeção sanitária oficial junto aos animais positivos (BRASIL, 2006).

Tabela 1. Interpretação do Teste Cervical Simples em bovinos.

Características da reação				
ΔB (mm)	Sensibilidade	Consistência	Outras	Interpretação
0,0 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

Fonte: BRASIL, 2006.

No TCC, as injeções de PPD de *M. bovis* e de *M. avium* são feitas no terço médio do pescoço, antecedidas também de uma primeira mensuração da pele e a leitura do resultado realizada após 72 horas, com nova mensuração da pele para a verificação da presença de endureção (MONAGHAN et al., 1994). A interpretação do TCC (TABELA 2) segue o estabelecido no Regulamento Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

O TCC é o teste confirmatório utilizado em animais reagentes (positivos e inconclusivos) ao TCS ou TPC. É também recomendado como teste de rotina para estabelecimentos de criação com ocorrência de reações inespecíficas e estabelecimentos certificados como livres, visando garantir boa especificidade diagnóstica (BRASIL, 2006). Além de contribuir para diferenciar animais infectados com *M. bovis* daqueles expostos a micobactérias não-tuberculosas (SCHILLER et al., 2010).

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
$\Delta B > \Delta A$	$\geq 4,0$	Positivo

Fonte: BRASIL, 2006.

Devido à complexidade do PPD bovino, a sensibilidade e a especificidade do teste intradérmico podem variar de lote para lote do PPD (AAGAARD et al., 2010). Além disso, esse teste pode ocasionar resultados falso-negativos quando realizado em animais em final da gestação ou pós-parto, com desnutrição, imunossupressão causada pelo uso inadequado de drogas e devido ao fenômeno da anergia (RIVERA et al., 2009; ÁLVAREZ et al., 2012). A anergia é caracterizada pela ausência de reatividade cutânea ao PPD bovino em indivíduos previamente sensibilizados, principalmente quando se têm infecções avançadas por *M. bovis*, (ROXO, 1997), estresse associado ao transporte e repetição do teste cutâneo (DE LA RUA DOMENECH et al., 2006).

No caso específico da realização de uma nova tuberculinização, o animal fica com a capacidade diminuída de responder ao novo teste, ou seja, dessensibilizado e só recobra essa capacidade após um período de pelo menos 60 dias (ROXO, 1997), por isso o prazo de 60 a 90 dias para re-teste estabelecido pela Instrução Normativa SDA nº 06, de 08 de janeiro de 2004, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2006). Apesar disso, Coad et al. (2010) observaram que após quatro sucessivos TCCs com intervalo de 60 dias entre os testes, os animais demonstraram uma progressiva e significativa diminuição da magnitude da resposta entre os testes consecutivos, mas somente em relação ao PPD bovino e concluíram ainda que, essa dessensibilização está diretamente relacionada a repetição do teste e progressão da

doença que resulta na diminuição da resposta imune mediada por célula e não em consequência da severidade patológica da tuberculose.

Variações inerentes ao teste, tais como dose, conservação e o próprio PPD utilizado, somadas às possíveis variações na execução, leitura e interpretação do teste, também podem contribuir para o aumento de resultados falso-negativos (MONAGHAN et al., 1994).

Os animais sensibilizados com cepas de micobactérias ambientais podem reagir positivamente ao PPD bovino devido à presença de antígenos comuns nas cepas virulentas e não-virulentas (POLLOCK et al., 2005; XIN et al., 2013). Essas reações falso-positivas estão relacionadas principalmente com a utilização do PPD bovino que limita a especificidade do teste (AAGAARD et al., 2010).

Nesse sentido, novos antígenos específicos de *M. bovis* têm sido testados de diversas formas, purificados, sintéticos, peptídeos e proteínas individuais ou em coquetel, visando potencializar a antigenicidade e especificidade dos antígenos utilizados no diagnóstico da tuberculose bovina (VORDERMEIER et al., 2001; COCKLE et al., 2006; WHELAN et al., 2010; CASAL et al., 2012). Alguns antígenos promissores têm sido identificados, como ESAT-6 e CFP10 principalmente (FLORES-VILLALVA et al., 2012; XIN et al., 2013) além de outros antígenos como MPB70, MPB83 (WHELAN et al., 2010), Rv3615c (WHELAN et al., 2010; CASAL et al., 2012), RV3872, MPT63 e TB10.4 (XIN et al., 2013).

3.5.1.3 Quantificação de interferon gama (IFN- γ)

O teste de detecção de IFN- γ avalia a produção dessa citocina em respostas linfoproliferativas específicas contra PPD de *M. bovis*, mediante a incubação de sangue de bovinos suspeitos, estimulados com os PPDs bovino e aviário (como controle da especificidade) durante 12 horas, entre 37 e 39°C, seguido da utilização do plasma para a execução de ELISA de captura de antígeno, com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ para a mensuração dos níveis da citocina. Esse ensaio é baseado no fato de que os

animais infectados produzem linfócitos T de memória, os quais respondem rapidamente à estimulação *in vitro* com PPD, produzindo elevados níveis de IFN- γ (WOOD; JONES, 2001).

A quantificação relativa de IFN- γ é calculada pela subtração do valor de densidade óptica (DO) encontrada com o PPD aviário, do valor de DO obtida com o PPD bovino e a interpretação dos resultados varia, sendo baseados normalmente no nível de exposição às micobactérias ambientais e ao nível de prevalência da doença na região avaliada (SCHILLER et al., 2010).

O ensaio de dosagem de IFN- γ tem sido usado para o diagnóstico da tuberculose bovina e aplicado principalmente no estágio inicial da infecção que é dominada por resposta imune celular (POLLOCK; NEILL, 2002), e em regiões de alta prevalência da tuberculose bovina (ÁLVAREZ et al., 2012). É também utilizado como ferramenta de triagem do rebanho para definir o *status* da doença em situações epidemiológicas específicas e principalmente para complementar o diagnóstico de animais negativos ou inconclusivos no TCC (STRAIN et al., 2011).

O teste de IFN- γ apresenta algumas vantagens em relação ao teste tuberculínico, como a possibilidade de repetição do ensaio quando necessário, sem aguardar um longo intervalo de tempo, pois não altera o estado imunológico do animal (RIVERA et al., 2009), e apresenta grande acurácia na leitura dos resultados, por ser automatizada (OIE, 2013). Ademais, a metodologia e a interpretação do teste podem ser completamente padronizadas entre os diferentes laboratórios (KANTOR et al., 2008).

A capacidade de produção de IFN- γ por bovinos submetidos a sucessivos testes intradérmicos pode não ser influenciada (RAGEN et al., 2009; COAD et al., 2010), ressaltando mais uma vez, o potencial desse teste como complementação ao teste alérgico (OIE, 2013). Porém, essa informação é contraditória (SCHILLER et al., 2010) e resultados em que a produção de IFN- γ é diminuída também têm sido relatados (PALMER; WATERS et al., 2006).

O emprego do teste de IFN- γ ainda oferece algumas restrições, como o elevado custo dos kits comerciais, a necessidade de um tempo restrito para o processamento das amostras de sangue e a execução do teste e, além disso, a possibilidade da ocorrência de resultados falso-positivos, devido às reações cruzadas com micobactérias ambientais (KANTOR; RITACCO, 1994). A estimulação de linfócito T com PPD aviário e quantificação do IFN- γ produzido, que é realizado em paralelo com o PPD bovino, colabora para reduzir a incidência desses resultados (JORGE et al., 2004b).

Para superar as limitações existentes, importante atenção tem sido dada aos antígenos de *M. bovis* no teste de dosagem de IFN- γ para o diagnóstico da tuberculose bovina, sendo empregados em substituição ao PPD bovino, dentre os quais se destacam as proteínas ESAT-6 e CFP10 (VORDERMEIER et al., 2001; MUSTAFA et al., 2006; AAGAARD et al., 2010; VUTLA et al., 2011). As proteínas PE5, PE13 e TB10.4 podem ainda suplementar o potencial de ESAT-6 e CFP10 para o diagnóstico (AAGAARD et al., 2006).

3.5.1.4 Ensaios sorológicos

Alguns testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos provenientes da resposta imune humoral contra *M. bovis* têm sido desenvolvidos (OIE, 2013), dentre os quais o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) tem demonstrado grande potencial, pois permite o processamento de um grande número de amostras em curto espaço de tempo e possui leitura dos resultados automatizada o que torna a interpretação dos resultados mais objetiva (SOARES, 2001).

Considerando a relação inversa entre a resposta imune mediada por células e humoral contra *M. bovis*, o teste intradérmico e os testes sorológicos buscam mensurar respostas imunológicas diferentes, que se desenvolvem em estágios distintos da infecção (CHAPINAL et al., 2012). Os anticorpos são geralmente desenvolvidos em estágios mais avançados da tuberculose e estão relacionados com o progresso da doença (POLLOCK; NEILL, 2002), por isso os ensaios baseados em anticorpos mostram-se úteis como testes complementares aos ensaios baseados na resposta

celular (RUGGIERO et al., 2007; OIE, 2013), ajudando a identificar os bovinos em estágio avançado da doença, com resultados falso-negativos em teste intradérmico e quantificação de IFN- γ , devido ao estado de anergia dos animais (STRAIN et al., 2011; WHELAN et al., 2011).

Os testes sorológicos apresentam ainda alguns problemas quanto a sensibilidade e especificidade, que variam em função do estágio de infecção da doença em que o teste é aplicado, em função dos antígenos empregados no ensaio (STRAIN et al., 2011) e a ocorrência de reações cruzadas com outras espécies de micobactérias (MORRISON et al., 2000).

Nesse sentido, o desenvolvimento de um teste de sorodiagnóstico requer o conhecimento detalhado do mecanismo imune humoral induzido pela infecção com *M. bovis* em bovinos (POLLOCK et al., 2006) e a identificação dos principais antígenos envolvidos na estimulação da produção de anticorpos, pois se sabe que durante a tuberculose bovina, múltiplos antígenos são envolvidos e que o reconhecimento desses varia de animal para animal e em função do tempo de infecção (LYASHCHENKO et al., 1998).

Existem vários estudos para a identificação de antígenos de *M. bovis*, preferencialmente reconhecidos pela resposta imune humoral de bovinos infectados, que contenham epítomos de células B e apresentem potencial para o diagnóstico, como ESAT-6, CFP10, MPB70 e MPB83, que apresentaram resultados promissores como teste complementar ao teste intradérmico (LIU et al., 2007; WHELAN et al., 2011; SOUZA et al., 2012). Além de constituir uma alternativa para a triagem de infecção por *M. bovis* nos bovinos, utilizando até mesmo soro coletado para outros estudos epidemiológicos, como para a brucelose, aumentando a cobertura diagnóstica (SOUZA et al., 2012).

3.5.2 Ensaio *post mortem*

3.5.2.1 Exame macroscópico

A triagem macroscópica para o diagnóstico da tuberculose bovina ocorre durante a inspeção sanitária *post mortem* em abatedouros-frigoríficos e é realizada para buscar lesões suspeitas de tuberculose e encaminhá-las para a confirmação laboratorial por teste histopatológico ou bacteriológico (CORNER, 1994; FENTAHUM; LUKE, 2012). É uma etapa crítica, que apresenta certa dificuldade, pois muitos processos inflamatórios granulomatosos apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para a tuberculose (ROXO, 1997). Mas pode ser um método de alta sensibilidade se uma inspeção visual for realizada de forma minuciosa durante o abate sanitário, o que permite encontrar lesões sugestivas em vários órgãos dos animais abatidos (FRÁGUAS et al., 2008).

Deve ser levado em consideração que qualquer tecido do corpo pode ser afetado pelas micobactérias, mas as lesões são mais observadas nos linfonodos brônquicos, mediastínicos e retrofaríngeos e nos pulmões, intestino, fígado, baço, pleura e peritônio, sendo que o granuloma tuberculoso tem aparência geralmente amarelada e de consistência caseosa, com centro seco, firme e coberto com uma cápsula conjuntiva fibrosa, caseo-calcária ou calcificada e ocasionalmente purulenta (OIE, 2013).

Esse granuloma tuberculoso é uma estrutura complexa formada como um mecanismo de defesa do animal em resposta a persistência do estímulo micobacteriano, com acúmulo de células inflamatórias como as células gigantes multinucleadas e linfócitos (WANGOO et al., 2005).

Muitas vezes, a avaliação macroscópica é a única medida empregada para o diagnóstico da enfermidade, o que pode incorrer em erros na sua detecção, que por sua vez, podem resultar em prejuízos econômicos e sanitários, comprometendo o sucesso dos programas de vigilância da tuberculose bovina (FURLANETTO et al., 2012). Assim, a diminuição do tempo de realização do exame de lesões suspeitas,

pode possibilitar ações rápidas e adequadas para o controle da doença no homem e nos animais e auxilia na identificação dos fatores de risco, que desempenham importante papel na epidemiologia da tuberculose (RUGGIERO et al., 2007).

Em alguns casos deve-se considerar que pode ocorrer uma correlação inversa entre os achados patológicos e a resposta ao teste tuberculínico, onde animais com forte resposta ao PPD podem apresentar pouca ou nenhuma lesão evidente (FIRDESSA et al., 2012). Isso não quer dizer que se trata de reação falso-positiva, pois as lesões podem estar em estágio inicial de evolução ou não terem sido encontradas (BRASIL, 2006).

3.5.2.2 Isolamento em cultura

Para um diagnóstico definitivo da tuberculose bovina é necessário o isolamento por meio de cultivo e a identificação bioquímica do agente etiológico, a partir de espécimes clínicos ou *post mortem* (OIE, 2013).

Mycobacterium bovis é uma bactéria que requer meios de cultura ricos em nutrientes para o seu crescimento e isolamento e é recomendado que seja semeada concomitantemente nos meios Löwenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie (MARCONDES, 2006). Isso se deve ao fato de que Löwenstein-Jensen contém glicerol e é usado para o isolamento de *M. tuberculosis*. Porém algumas cepas de *M. bovis* não se desenvolvem bem em meios contendo glicerol e por isso utiliza-se em paralelo o Stonebrink-Lesslie que possui como suprimento o piruvato e permite o crescimento de *M. bovis* (GRANGE et al., 1996).

Após o isolamento do agente micobacteriano das lesões de animais suspeitos, o diagnóstico é definido a partir da identificação desse agente por meio de provas bioquímicas, análise de grupos funcionais de ácidos micólicos presentes na parede da bactéria (JORGE et al., 2004b) e técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (ARAÚJO et al., 2005).

Os testes bioquímicos avaliam a atividade da nitrata-se, preferência ao oxigênio (aeróbico ou micro-aerofílico) e a suscetibilidade a isoniazida e pirazinamida (GRANGE et al., 1996). Ademais, algumas características do cultivo podem ser levadas em consideração para a identificação da espécie, como a temperatura e o tempo para o crescimento, pigmentação da colônia e a observação de fotorreatividade (JORGE et al., 2004b). Contudo, a cultura apresenta aspectos que restringem o seu uso em larga escala, pois requer grande quantidade de bacilos viáveis e longo tempo para o crescimento bacteriano (RIVERA et al., 2009). O tempo necessário para confirmar a presença ou a ausência de *M. bovis* em amostras clínicas em cultura é de 30 a 90 dias (Brasil et al., 2006), e qualquer demora na confirmação desse resultado tem consequências para os programas de controle. Além disso, o cultivo micobacteriano pode acarretar um grande encargo financeiro aos programas de controle da tuberculose bovina (STEWART et al., 2012).

Os membros do complexo *M. tuberculosis*, incluindo *M. bovis*, crescem lentamente se comparado com os padrões bacteriológicos gerais, requerendo um longo tempo de incubação, especialmente no isolamento primário (CORNER et al., 2012), que varia em torno de 24 a 40 dias para o aparecimento das primeiras colônias macroscopicamente visíveis (CORNER, 1994; MARCONDES et al., 2006). Assim, apenas em uma pequena porcentagem de animais suspeitos ou positivos para a enfermidade realiza-se o diagnóstico definitivo (JORGE et al., 2004b).

Além disso, de acordo com Stewart et al. (2012), existem outros fatores que prejudicam a confirmação do diagnóstico da tuberculose bovina por meio do cultivo de *M. bovis*, como a dificuldade de seleção precisa de tecidos infectados para a cultura, uma vez que o animal pode apresentar lesões visíveis, mas muitas vezes não apresenta evidência de lesão, a natureza paucibacilar de *M. bovis* nos tecidos selecionados e os procedimentos de descontaminação, necessários no cultivo, mas que podem reduzir significativamente a viabilidade da bactéria, além de influenciarem a sensibilidade do isolamento primário de *M. bovis* em amostras de tecidos.

3.5.2.3 Exame histopatológico

O exame histopatológico é um método de diagnóstico complementar ao exame macroscópico, realizado em amostras com lesões presuntivas para a tuberculose bovina (CORNER et al., 1994). Os fragmentos de lesão devem ser colhidos com uma espessura de pelo menos um centímetro de diâmetro, em uma região que envolva a área de transição entre o tecido lesado e o normal, fixados em formol a 10% e inseridos em blocos de parafina. As amostras são então, cortadas com cerca de dois micrômetros, coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e analisadas por microscopia (CASSIDY et al., 1999).

Na avaliação microscópica os resultados da histopatologia são classificados como positivo quando observado granuloma envolvido por cápsula conjuntiva, presença de infiltrado inflamatório mononuclear constituído por macrófagos e linfócitos, presença de células epitelióides e células gigantes do tipo Langerhans delimitando a área de necrose de caseificação, que pode possuir em seu interior material amorfo basofílico (CASSIDY et al., 1999). Pode ser considerado inconclusivo quando a lesão for caracterizada por granuloma não encapsulado irregular, constituído de macrófagos, mas não de células gigantes multinucleadas do tipo Langerhans e necrose, consistente com o estágio inicial (WANGOO et al., 2005) e negativo quando forem encontradas características não compatíveis com granuloma tubercular, como infiltrado eosinofílico, hiperplasia linfóide, presença de colônia bacteriana sem área necrótica e tumor (VARELLO et al., 2008).

Os granulomas podem ser classificados adicionalmente em categorias de acordo com os estágios de desenvolvimento da lesão: I – lesão inicial ou ausência de lesão; II – granuloma sólido; III – necrose mínima e IV – necrose e mineralização (WANGOO et al., 2005), ou considerando o nível de encapsulamento do granuloma: I – com encapsulamento; II – cápsula fibrosa densa e III – encapsulamento densamente fibroso (MENIN et al., 2013).

O teste histopatológico apresenta a vantagem de ser rápido e de baixo custo, com resultados satisfatórios, principalmente em regiões de alta prevalência da doença, contudo apresenta baixa sensibilidade e especificidade, sendo mais indicado para um diagnóstico presuntivo (CORNER et al., 1994; FURLANETTO et al., 2012). Mesmo assim, a real etiologia e prevalência das lesões granulomatosas encontradas durante um exame macroscópico deve tentar ser determinada, por representarem motivo de condenação desnecessária de carcaças e induzirem ao erro de diagnóstico (FRÁGUAS et al., 2008).

3.5.2.4 Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares, como a PCR, representam um avanço no diagnóstico rápido da tuberculose bovina e têm sido de grande valia em estudos epidemiológicos, pois permitem a elucidação de casos, principalmente em áreas onde animais silvestres estão envolvidos (JORGE et al., 2004b). Além disso, os dados epidemiológicos gerados contribuem para melhorar as estratégias de controle e erradicação da tuberculose bovina (ROCHA et al., 2013).

A PCR é uma técnica que permite identificar a presença de sequências específicas de DNA micobacteriano, a partir de amostras clínicas sugestivas de tuberculose ou micobactéria isolada em meio de cultura seletivo e por isso contribui para a identificação da espécie de micobactéria, substituindo a caracterização bioquímica e também porque pode ser facilmente padronizado e pode detectar baixas quantidades de DNA (STRAIN et al., 2011).

Após a realização da PCR, podem ser realizados subsequentemente alguns métodos moleculares para a genotipagem e triagem preliminar dos membros do CMT (STRAIN et al., 2011; ROCHA et al., 2013), como o *spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*) que é a técnica de epidemiologia molecular mais comumente aplicada para esse fim, podendo ser associada ao MIRU (*mycobacterial interspersed repetitive units*), VNTR (*variable numbers of tandem repeats*) e ETR (*exacts tandem*

repeat), que aumentam o poder de identificação e discriminação entre os membros do complexo (OIE, 2013; ROCHA et al., 2013).

3.6 Controle

Os programas de controle da tuberculose bovina são baseados no método de diagnóstico padrão, estabelecido pela OIE, que é o teste intradérmico com derivados proteicos purificados (PPD) para a identificação e eliminação de animais infectados (OIE, 2013; COAD et al., 2010). Esse procedimento reduziu drasticamente a tuberculose em muitos países que implementaram essa estratégia de controle, porém não foi bem sucedido em algumas regiões em que animais silvestres funcionam como reservatório de *M. bovis* (MUSTAFA et al., 2002; VORDERMEIER et al., 2006).

Apesar do extenso conhecimento sobre a tuberculose, o diagnóstico precoce da doença, a identificação da espécie de micobactéria causadora da infecção e a remoção dos animais infectados, continuam sendo indispensáveis para o estudo da transmissão da micobactéria entre humanos e animais e importante na vigilância e controle da tuberculose (MICHEL et al., 2010; ÁLVAREZ et al., 2012). Além disso, outros aspectos relevantes devem ser considerados, como o suporte financeiro e técnico aos programas de controle, a padronização dos métodos e reagentes para realizar a tuberculinização nos bovinos e os eficientes sistemas de inspeção veterinária e vigilância epidemiológica (KANTOR et al., 2008).

O método de regionalização tem sido reconhecido pela OIE como uma importante estratégia aplicada aos programas de controle, pois permite a identificação de regiões geográficas com alto ou baixo risco para a doença e suas respectivas condições acerca da tuberculose, como o impacto social e econômico e as condições ecológicas e epidemiológicas, favorecendo a implantação de medidas de controle adequadas a cada região (PEREZ et al., 2011).

Pode-se afirmar que existem métodos diagnósticos adequados para o desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina,

entretanto, não existe um método diagnóstico que tenha uma eficácia absoluta. O teste de tuberculinização, a vigilância epidemiológica em matadouros, o controle sanitário e o diagnóstico laboratorial, são todos elementos básicos que devem ser empregados com critério e de modo adequado a cada situação epidemiológica (PARRA et al., 2008).

No Brasil está em vigor desde 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT, instituído pelo Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária, com o intuito de diminuir a prevalência e a incidência da tuberculose e certificar propriedades livres ou monitoradas para fornecer ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (BRASIL, 2006).

O programa recomenda o teste tuberculínico para a identificação dos animais infectados, sendo empregado o TCS como prova de rotina para o gado de leite e o TPC para a triagem exclusivamente em gado de corte, ambos utilizando o PPD bovino. O TCC com PPD bovino e aviário é aplicado como teste confirmatório para animais positivos ou inconclusivos na triagem (BRASIL, 2006).

A implantação de eficientes sistemas de vigilância pode contribuir para a detecção de focos remanescentes, acelerando o processo de erradicação da tuberculose no rebanho bovino (FURLANETTO et al., 2012). Outro método para tentar controlar a tuberculose bovina é o desenvolvimento de vacinas, que pode resultar em uma diminuição do risco de infecção e a frequência de realização dos testes tuberculínicos (COCKLE et al., 2002; VORDERMEIER et al., 2006).

3.6.1 Desenvolvimento de vacinas

Vacinar os bovinos contra a tuberculose bovina é impedir o estabelecimento da infecção nesses animais e induzir a resistência à infecção numa exposição futura, assim como não permitir que esses animais vacinados sejam reagentes em teste tuberculínico. Além disso, a vacina deve ser segura e aceita nos países importadores de carne e produtos lácteos (BUDDLE et al., 2003). Essas exigências estão mais relacionadas aos países desenvolvidos, onde a vacinação é considerada um método

promissor para o controle da tuberculose bovina em longo prazo (HOGARTH et al., 2006). Já nos países em desenvolvimento, as exigências para a vacinação são menos rigorosas, onde o objetivo principal seria reduzir a disseminação da tuberculose nos bovinos e contribuir para os programas de erradicação, utilizando vacinas estáveis e de baixo custo (BUDDLE et al., 2003).

As vacinas contra a tuberculose bovina já avaliadas foram baseadas em cepa de *M. bovis* viva atenuada do Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), cepa morta com adjuvante, subunidades de proteínas (HOGARTH et al., 2006; BUDDLE et al., 2013), DNA (VORDERMEIER et al., 2001), micobactérias não tuberculosas mortas e protocolos de *prime-boost*, baseados na combinação de DNA, subunidade de proteína, vírus recombinante e BCG viva atenuada (VORDERMEIER et al., 2006).

Seja qual for o princípio escolhido para o desenvolvimento de uma vacina contra a tuberculose bovina, é necessário levar em consideração que essa seja capaz de induzir uma forte resposta imune celular do tipo Th1 e uma imunidade protetora (VORDERMEIER et al., 2006). E para isso é necessário um grande conhecimento sobre a interação de *M. bovis* e o mecanismo de defesa do animal, ou seja, a cinética da resposta imune mediada por células e anticorpos desencadeada durante a infecção no bovino (POLLOCK et al., 2005; POLLOCK et al., 2006).

Dentre os tipos de vacina citados, *M. bovis* BCG é o protótipo de vacina para a utilização em programas de controle e erradicação, pois tem baixo custo e é capaz de proteger os bovinos contra o desafio virulento (VORDERMEIER et al., 2006; BUDDLE et al. 2013). Porém, a vacina baseada em BCG tem suas limitações reconhecidas e que impedem a utilização para o controle da tuberculose bovina, como comprometer a especificidade do teste tuberculínico devido a reações cruzadas entre antígenos presentes nas cepas patogênicas e na cepa vacinal (HOGARTH et al., 2006; BUDDLE et al. 2013), essencialmente em regiões endêmicas para *M. bovis*, onde a vacinação pode mascarar o diagnóstico preciso (McNAIR et al., 2007). Em decorrência das limitações citadas, a vacinação dos bovinos ainda não foi instituída em nenhum programa de controle e erradicação (HOGARTH et al., 2006). Nesse sentido, há uma

grande demanda no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico que sejam capazes de diferenciar animais vacinados de animais infectados, utilizando principalmente antígenos presentes em *M. bovis*, mas ausentes em *M. bovis* BCG, para que a vacinação seja incluída nas estratégias de controle da tuberculose bovina (COCKLE et al., 2002; SIDDEERS et al., 2008; WHELAN et al., 2010; BUDDLE et al., 2013).

3.6.2 Proteínas de *M. bovis* como antígeno em ensaios de diagnóstico

A complexidade do PPD bovino, que resulta em ocorrência de reações cruzadas com antígenos de micobactérias ambientais (FIFIS et al., 1994; POLLOCK et al., 2005) e a busca pelo desenvolvimento de vacinas (VORDERMEIER et al., 2001; BUDDLE et al., 2013), levaram à pesquisa de novos antígenos para o aprimoramento dos métodos de diagnóstico com mais sensibilidade e especificidade para a identificação de *M. bovis* (AAGAARD et al., 2003; POLLOCK et al., 2006; MOSAAD et al., 2012) e capacidade de diferenciar animais naturalmente infectados de vacinados, além de identificar antígenos candidatos a vacinas de subunidades (COCKLE et al., 2002).

Um grande número de proteínas específicas de *M. bovis* e que estimulam forte resposta imune em bovinos infectados, tem sido identificadas e testadas (MORRISON et al., 2000; POLLOCK et al., 2005). Principalmente depois da elucidação das sequências do genoma de *M. bovis* que permitiu a análise comparativa com outras micobactérias para o rastreamento de potenciais antígenos (GARNIER et al., 2003).

Existem várias estratégias para a identificação de imunógenos micobacterianos promissores para o diagnóstico, principalmente os métodos pós-genômicos, incluindo a predição de epítopos de células T, comparação genômica para a identificação de ORF (*open reading frames*) patógeno-específica, bem como, a avaliação do nível da expressão de genes e *microarray* (SIDDEERS et al., 2008). Associam-se a esses métodos, as avançadas ferramentas de proteômica que têm papel fundamental na determinação da estrutura das micobactérias e identificação dos antígenos. Onde se

destacam, a espectrometria de massas (MEIKLE et al., 2009), o *plunge freezing cryo electron* e a tomografia crio-eletrônica para, respectivamente, avaliar a ultra-estrutura celular e determinar a arquitetura tri-dimensional do envelope da micobactéria (SANI et al., 2010).

O conhecimento genômico e estrutural das micobactérias permitiu um avanço considerável acerca das bases moleculares da patogenicidade, virulência e mecanismos que permitem a sobrevivência e a persistência micobacteriana no hospedeiro, mais precisamente no microambiente agressivo dos macrófagos. Muitos dos genes relacionados à virulência micobacteriana codificam para proteínas de superfície, proteínas envolvidas nos sistemas de transdução de sinais e enzimas que participam das vias de metabolismo de lipídeos (FORRELAD et al., 2013).

Algumas proteínas do sistema de secreção (ESX) identificadas no envelope celular da micobactéria (FIGURA 1), como a ESAT-6, CFP10, EspB, EspE, EspF, EspK, ESX-1, ESX-5 e ESX-1 associada à família das PPE, que formam uma estrutura macromolecular exposta na superfície celular, desempenham papel essencial e especializado na interação com as células do hospedeiro, contribuindo para a modulação da resposta imune e persistência da infecção, principalmente devido à ligação aos macrófagos e consequente estímulo da produção de citocinas pró-inflamatórias e translocação dos fagossomos dentro do citosol (SANI et al., 2010).

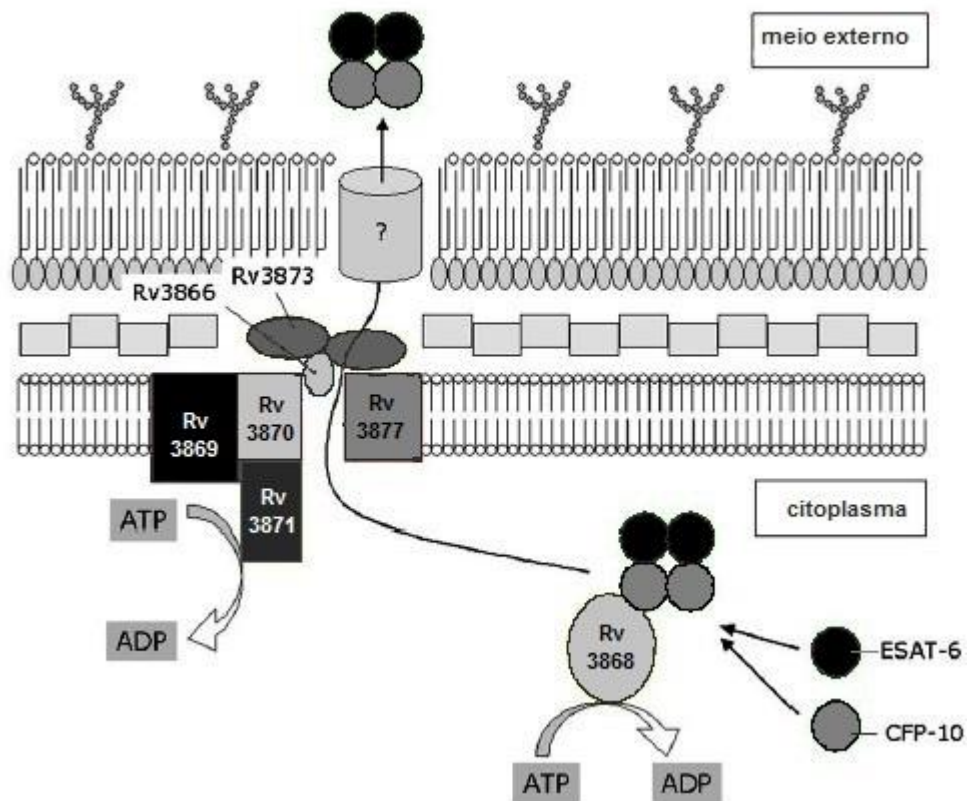


Figura 1: Modelo do sistema de secreção (ESX) composto por proteínas da região de diferença 1. Adaptado de: Teutschbein et al. (2009).

Baseado em análise genômica, um novo cenário evolutivo foi proposto para os membros do CMT, no qual identificaram-se 20 regiões de diferença (RD) no genoma dessas espécies. Foi descrito que 14 dessas regiões genômicas, denominadas RD1-RD14, apresentaram uma variação de 2 a 12,7 Kb que se mostraram ausentes no bacilo de Calmette-Guérin (BCG), quando comparada à cepa padrão H37Rv de *M. tuberculosis* (BROSCH et al., 2002; FORRELAD et al., 2013).

O diagnóstico diferencial e específico da tuberculose bovina, tem sido baseado principalmente nos antígenos codificados por genes da região de diferença 1 (RD1), composto por 10 genes (Rv3868-Rv3877) (TEUTSCHBEIN et al., 2009), que corresponde a um segmento de DNA de 9,5 Kb, justamente por estarem presentes nas

cepas virulentas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* e ausentes na cepa vacinal (BCG) e *M. avium* (FIGURA 2) (MAHAIRAS et al., 1996; PHILIPP et al., 1996). Isto significa que, ou um ou mais genes da RD1 desempenham papel fundamental na virulência ou os genes codificados pela RD1 regulam outros genes envolvidos na virulência das micobactérias patogênicas, uma vez que a cepa BCG não possui sequência homóloga a RD1 e apresenta um fenótipo atenuado (MAHAIRAS et al., 1996).

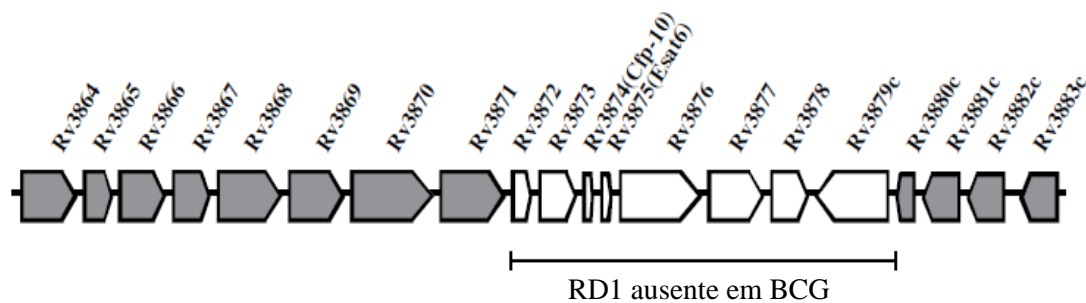


Figura 2: Representação dos genes codificados pela região de diferença 1 (RD1), presentes nas cepas virulentas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* que foram deletados do Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Adaptado de: Ganguly et al. (2008).

Entre as proteínas codificadas pelos genes da RD1, as mais bem caracterizadas são a ESAT-6 (*early secretory antigenic target 6 kDa*) e a CFP10 (*culture filtrate protein 10 kDa*) que são proteínas naturalmente imunodominantes do CMT e são reconhecidas como forte estimuladoras de células T em animais infectados (MUSTAFA et al., 2002). Os genes que as codificam são *esxA* e *esxB*, respectivamente (HEMATI et al., 2011), e as duas proteínas formam um complexo heterogêneo 1:1, estável, secretado e que atua como uma molécula de sinalização (RENSHAW et al., 2005).

A proteína TB10.4 também apresenta diversos epítomos distribuídos por toda a proteína, os quais são fortemente reconhecidos por linfócitos T e estimulam a produção de IFN- γ . Ela é codificada pelo gene *esxH* que pertence a uma subfamília dentro da

família de ESAT-6, constituída por três proteínas altamente homólogas, TB10.3, TB10.4 e TB12.9. Essa subfamília está presente no CMT, enquanto em micobactérias atípicas, apenas um dos genes (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. marinum*) ou nenhum dos genes (*M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. szulgai*) está presente (SKJØT et al., 2002). Assim, TB10.4 tem a capacidade de aumentar a sensibilidade do teste intradérmico, mas pode causar uma perda na especificidade (XIN et al., 2013).

As PE e PPE correspondem a uma grande família de proteínas, composta por mais de 160 membros em *M. bovis* e *M. tuberculosis* (GARNIER et al., 2003). Suas funções apesar de não serem bem definidas, são atribuídas à virulência e variação antigênica micobacteriana, com polimorfismos nos genes que codificam para as proteínas PE35, PPE33, PPE51 e PPE55 que mostram variação na expressão entre as cepas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* (GOLBY et al., 2007).

A MPB70 e a MPB83 são proteínas altamente homólogas entre si, com aproximadamente 70% de identidade em muitas espécies de micobactérias, como *M. bovis* e *M. tuberculosis* (AAGAARD et al., 2006). MPB70 é uma das principais proteínas secretadas de *M. bovis* (WIKER, 2009) e MPB83 é uma lipoproteína de membrana (AAGAARD et al., 2006). Ambas estão relacionadas principalmente com a resposta imune humoral de animais infectados (LIU et al., 2007).

As respostas imunológicas induzidas nos bovinos, resultantes da interação com os antígenos de *M. bovis* são passíveis de serem detectadas por quantificação de IFN- γ (DE LA RUA DOMENECH et al., 2006; MUSTAFA et al., 2006; VUTLA et al., 2011), teste de imunoensaio (KOO et al., 2005; SOUZA et al., 2012) e tuberculinização intradérmica, demonstrando o potencial desses antígenos para o imunodiagnóstico e diferenciação entre bovinos vacinados e infectados (VAN PINXTEREN et al., 2000; VORDERMEIER et al., 2001; MUSTAFA et al., 2002; WHELAN, C., et al., 2010; WHELAN et al., 2010; STRAIN et al., 2011).

Em estudo de mapeamento de antígenos com potencial para o diagnóstico da tuberculose bovina em ensaio de produção de IFN- γ com linfócitos de bovinos

inoculados experimentalmente com *M. bovis*, foram identificadas as proteínas ESAT-6, CFP10, TB10.4, TB27.4 e TB16.2 (AAGAARD et al., 2003).

Utilizando ESAT-6 e CFP10 como peptídeos sintéticos para a dosagem de IFN- γ , Vordermeier et al. (2001) obtiveram uma sensibilidade de 77,9% na detecção de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis* e uma especificidade de 100% com amostras de bovinos vacinados com *M. bovis* BCG.

ESAT-6:CFP10 como uma proteína de fusão, foi significativamente capaz de discriminar bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*, de bovinos infectados experimentalmente com *M. avium avium* e *M. avium paratuberculosis* na dosagem de IFN- γ , demonstrando sua alta especificidade para o diagnóstico diferencial entre micobactérias patogênicas e ambientais (WATERS et al., 2004).

Em um experimento avaliando-se os antígenos ESAT-6, CFP10, PE13, PE5, MPB70, TB10.4 e TB27.4 em provas de quantificação de IFN- γ em bovinos de regiões de baixa, média e alta prevalência de tuberculose, ESAT-6 e CFP10 foram os antígenos com melhor desempenho, sobretudo quando houve a combinação das duas proteínas, com precisão diagnóstica de 85%. Além disso, TB10.4, PE13 e PE5 apresentaram potencial para suplementar a cobertura diagnóstica fornecida por ESAT-6 e CFP10 (AAGAARD et al., 2006).

Um conjunto de peptídeos imunodominantes das proteínas ESAT-6, CFP10, Rv3873, Rv3879c, Rv0288 e Rv3019c foi testado como antígeno em teste de dosagem de IFN- γ , apresentando resultados significativamente superiores ao PPD na identificação de animais com tuberculose, mas com reação intradérmica negativa. A especificidade do teste não foi afetada por vacinação prévia com BCG (COCKLE et al., 2006).

Em estudo que avaliou a adição de RV3615c em um coquetel contendo ESAT-6/CFP10 para a dosagem de IFN- γ , foi observado o aumento da sensibilidade do diagnóstico de 77,9% para 91% quando realizado somente com ESAT-6 e CFP10, discriminando bovinos naturalmente infectados com *M. bovis* de vacinados e

identificando bovinos infectados que não haviam respondido anteriormente ao estímulo com ESAT-6 e CFP10 (SIDDERS et al., 2008).

Koo et al. (2005) compararam os ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA), imunocromatografia e aglutinação em látex, para o diagnóstico da tuberculose bovina utilizando a proteína MPB70 recombinante e peptídeo de ESAT-6 e obtiveram elevadas sensibilidades e especificidades para os três testes e com resultados similares entre os antígenos, indicando o potencial dessas proteínas quando aplicadas em provas de diagnóstico rápido.

Em um ensaio de ELISA indireto, uma proteína de fusão composta pelas proteínas ESAT-6:MPB70:MPB83 foi testada com amostras clínicas de bovinos com tuberculose, utilizando o teste intradérmico como método padrão. Os ensaios apresentaram uma concordância de 100% em relação aos animais negativos e 68,7% em relação aos animais positivos, indicando que o ELISA indireto com proteína de fusão pode ser utilizado como teste complementar a tuberculinização e como uma importante ferramenta epidemiológica (LIU et al., 2007).

Whelan et al. (2010) relataram uma sensibilidade e especificidade de 73,6% e 100%, respectivamente em teste intradérmico, utilizando um coquetel de proteínas recombinantes constituídos por ESAT-6/CFP10/MPB70/MPB83, na concentração de 10 µg de cada componente, com reações médias de pelo menos 5 mm inferiores as obtidas com o PPD em animais infectados com *M. bovis*, mas sem induzir resposta em bovinos vacinados e não infectados. Com a substituição de MPB70 por RV3615c no coquetel, a sensibilidade do teste aumentou para 100% e manteve o diâmetro médio das reações.

Jones et al. (2012) avaliaram um coquetel de peptídeos com ESAT-6/CFP10/Rv-3615c na concentração de 10 µg/peptídeo em teste de intradérmico, testando animais naturalmente infectados e obtiveram um aumento da sensibilidade de 75% para 87,5% com a adição de Rv3020c e avaliando animais não infectados e vacinados encontraram uma especificidade de 97,6%.

A avaliação de um coquetel das proteínas ESAT-6/CFP10 em ensaio intradérmico permitiu a identificação de uma importante proporção de animais naturalmente infectados com *M. bovis* que o ensaio com PPD não foi capaz de reconhecer, principalmente em animais oriundos de uma região de baixa prevalência para a doença. Além disso, o coquetel não induziu reações inflamatórias em animais não infectados e em infectados com paratuberculosis. Foi possível identificar também que, utilizando 20 µg/proteína no coquetel, a sensibilidade do teste diminuiu gradativamente, à medida que a linha de corte era estabelecida para um maior diâmetro (mm) das reações (FLORES-VILLALVA et al., 2012).

Xin et al. (2013) ao avaliarem a contribuição das proteínas TB10.4, Rv3872 e MPT63 para o diagnóstico da tuberculose bovina quando combinadas com ESAT-6 e CFP10, observaram que os coquetéis ESAT-6/CFP10/TB10.4 e ESAT-6/CFP10/Rv3872/MPT63 potencializaram as reações de hipersensibilidade tardia e a capacidade de identificar bovinos infectados em relação ao coquetel formado por apenas ESAT-6/CFP10, com boa correlação entre os coquetéis e entre os coquetéis e os testes de diagnóstico tradicionais como teste tuberculínico padrão com PPD bovino e o ensaio de IFN- γ . Além disso, o coquetel ESAT-6/CFP10/TB10.4 se mostrou capaz de diferenciar bovinos infectados com *M. bovis* de infectados com *M. avium*.

Como demonstrado nos trabalhos citados, a utilização de antígenos específicos de *M. bovis* tem sido diversificada, variando quanto à forma (peptídeos ou proteínas), concentração, combinação (coquetel, fusão ou individual), aplicação em diferentes ensaios que visam detectar a resposta imune celular ou a humoral. No caso específico do teste intradérmico, outras variáveis ainda são avaliadas como o tempo ideal para leitura das reações (24, 48, 72 e 96 horas) e a determinação da linha de corte para o diâmetro das reações de ≥ 1 mm até ≥ 10 mm para a interpretação dos resultados. Essas pesquisas têm gerado um grande avanço para o diagnóstico da tuberculose bovina e conseqüentemente um aprimoramento dos programas de controle da doença. Nesse sentido, são apresentados a seguir dois artigos produzidos com o intuito de contribuir para o progresso do diagnóstico e controle da tuberculose bovina: **Artigo 1 - Teste intradérmico com proteínas recombinantes de *Mycobacterium bovis* em**

Cavia porcellus (Normas do periódico: Pesquisa Veterinária Brasileira) e **Artigo 2 - Avaliação do uso de proteínas recombinantes de *Mycobacterium bovis* como antígenos no teste intradérmico em bovinos** (Normas do periódico: *Archivos de Medicina Veterinaria*).

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, C. et al. Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 3719-3728, 2003.
- AAGAARD, C. et al. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT-6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 4326-4335, 2006.
- AAGAARD, C. et al. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 96, n. 3-4, p. 161-169, 2010.
- ABALOS, P.; RETAMAL, P. Tuberculosis: una zoonosis re-emergente. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International Des Epizooties*, v. 23, n. 2, p. 583-594, 2004.
- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Balanço da pecuária. Disponível em: www.abiec.com.br/texto.asp?id=8. Acesso em: 29 de ago. 2013.
- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. *Archives of Veterinary Science*, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.
- ALEXANDER, K. A. et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 8, 2010.
- ÁLVAREZ, J. et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology*, v. 155, n. 1, p. 38-43, 2012.
- AMENI, G. et al. Cattle husbandry in Ethiopia is a predominant factor affecting the pathology of bovine tuberculosis and gamma interferon responses to mycobacterial antigens. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, n. 9, p. 1030–1036, 2006.

AMENI, G. et al. Effect of skin testing and segregation on the incidence of bovine tuberculosis, and molecular typing of *Mycobacterium bovis* in Ethiopia. *Veterinary Record*, v. 161, p. 782–786, 2007.

ANDRADE, M. R. M. et al. Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. *Biomed Central Microbiology*, v. 12, n. 166, p. 1-12, 2012.

ARANAZ, A. et al. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1785-1789, 2003.

ARAÚJO, C. P. et al. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from *post-mortem* inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 749-752, 2005.

BANERJEE, R. et al. Comparative genomics of cell envelope components in mycobacteria. *Plos One*, v. 6, 2011.

BERG, S. et al. The burden of mycobacterial disease in Ethiopian cattle: Implications for public health. *Plos One*, v. 4, 2009.

BIET, F. et al. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*, v. 36, n. 3, p. 411-436, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)*. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006, 188 p.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n.6, p. 3684-3689, 2002.

BUDDLE, B. M. et al. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *International Journal for Parasitology*, v. 33, p. 555-566, 2003.

BUDDLE, B. M. et al. Subcutaneous administration of a 10-fold lower dose of a commercial human tuberculosis vaccine, bacille Calmette-Guérin Danish, induced similar levels of protection against bovine tuberculosis and responses in the tuberculin intradermal test compared to a standard cattle dose. *Clinical and Vaccine Immunology*, doi:10.1128/CVI.00435-13, 2013.

CASAL, C. et al. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon- γ assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 105, p. 149-154, 2012.

CASSIDY, J. P. et al. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. *Journal of Comparative Pathology*, v. 121, p. 321-337, 1999.

CHAPINAL, N. et al. Agreement between the caudal fold test and serological tests for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in bison. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 105, n. 4, p. 326-30, 2012.

COAD, M. et al. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitization in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Veterinary Research*, v. 41, n. 14, 2010.

COCKLE, P. J. et al. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 12, p. 6996-7003, 2002.

COCKLE, P. J. et al. Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, p. 1119-1124, 2006.

COLLINS, D. M. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1-2, p. 83-84, 1994.

CORNER, L. A. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p. 53-63, 1994.

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, p. 162-171, 2012.

COUSINS, D. V. et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 53, n. 5, p. 1305-1314, 2003.

DE LA RUA-DOMENECH, R. 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, p. 190-210, 2006.

FACCIUOLO, A.; KELTON, D. F.; MUTHARIA, L. M. Novel secreted antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* as serodiagnostic biomarkers for Johne's disease in cattle. *Clinical e Vaccine Immunology*, v. 20, n. 12, p. 1783-1791, 2013.

FENTAHUM, T.; LUKE, G. Diagnostic techniques of bovine tuberculosis: A Review. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, v. 4, n. 6: 192-199, 2012.

FIFIS, T.; ROTHEL, J. S.; WOOD, P. R. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens:

Studies on their purification and immunological evaluation. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p. 65-81, 1994.

FIRDESSA, R. et al. High prevalence of bovine tuberculosis in dairy cattle in Central Ethiopia: Implications for the dairy industry and public health. *Plos One*, v. 7, p. 1-12, 2012.

FLORES-VILLALVA, S. et al. Tuberculin skin test specificity is modified by the use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP10 in *Mycobacterium bovis* naturally infected cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 19, p. 797-803, 2012.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013.

FRÁGUAS, S. A. et al. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 15, n. 3, p. 117-121, 2008.

FURLANETTO, L. V. et al. Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, p. 1138-1144, 2012.

GANGULY, N.; SIDDIQUI, I.; SHARMA, P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis*, v. 88, p. 510-517, 2008.

GARNIER, T. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 13, p. 7877-7.882, 2003.

GOLBY, P. et al. Comparative transcriptomics reveals key gene expression differences between the human and bovine pathogens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*, v. 153, p. 3323-3336, 2007.

GRANGE, J. M., YATES, M. D., KANTOR, I. N. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. World Health Organization. 2.ed. 23p. 1996.

HEMMATI, M. et al. Expression and purification of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* (TB) antigens, ESAT-6, CFP10 and ESAT-6/CFP10 and their diagnosis potential for detection of TB patients. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, v. 13, n. 8, p. 556-563, 2011.

HOGARTH, P. J.; HEWINSON, R. G.; VORDERMEIER, H. M. Development of vaccines against bovine tuberculosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 58, p. 749-757, 2006.

HUMBLET, M. F.; BOSCHIROLI, M.L.; SAEGERMAN, C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Veterinary Research*, v. 40, n. 50, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária, Junho de 2013, disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publ_completa.pdf. Acesso: 30 de ago. 2013.

JONES, G. J. et al. Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 19, n. 4, p. 620-622, apr. 2012.

JORGE, K. S. G. et al. Tuberculose bovina: epidemiologia e controle. In: ALMEIDA, R. F. C.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R. (Eds.). *Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004a. 95 p., p. 45-59.

JORGE, K. S. G. et al. Tuberculose bovina: diagnóstico. In: ALMEIDA, R. F. C.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R. (Eds.). *Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004b. 95 p., p. 61-80.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1-2, p. 5-14, 1994.

KANTOR, I. N. et al. Bovine tuberculosis in Latin American countries. Current situation and recommendations Workshop sponsored by OIE, 3rd Latin American Congress on Zoonoses. Buenos Aires, Argentina, June 19, 2008.

KANTOR, I. N.; LOBUE, P. A.; THOEN, C. O. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 14, n. 11, p. 1369-1373, 2010.

KHATRI, B. L. et al. A natural-transmission model of bovine tuberculosis provides novel disease insights. *Veterinary Record*, 2012.

KAUFMAN, S. H; ANDERSEN, P. Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *Chemical Immunology*, v. 70, p. 21-59, 1998.

KOO, H. C. et al. Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison of the enzyme-linked immunosorbent, immunochromatographic, and latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 9, p. 4498-4506, sept. 2005.

KORO, F. K. et al., First insight into the current prevalence of bovine tuberculosis in cattle slaughtered in Cameroon: the case of main abattoirs of Yaoundé and Douala. *British Microbiology Research Journal*, v. 3, n. 3, p. 272-279, 2013.

LIÉBANA, E. et al. Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunology*, v. 99, p. 23-29, 2000.

LIU, S. et al. A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 87, p. 212-217, 2007.

LYASHCHENKO, K. et al. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 8, p. 3936-3940, 1998.

MAHAIRAS, G. G. et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology*, v. 178, p. 1274-1282, 1996.

MARASSI et al. A multidisciplinary approach to diagnose naturally occurring bovine tuberculosis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 1, p. 15-20, jan. 2013.

MARCONDES, A. G. et al. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006.

MCNAIR, J.; WELSH, M.D.; POLLOCK, J.M. The immunology of bovine tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. *Vaccine*, v. 25, p. 5504-5511, 2007.

MEIKLE, V. et al. Identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 16, n. 9, p. 1352-1359, 2009.

MEIKLE, V. et al. Evaluation of pathogenesis caused in cattle and guinea pig by a *Mycobacterium bovis* strain isolated from wild boar. *Veterinary Research*, v. 7, n. 37, p. 1-7, 2011.

MENIN, A. et al. Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *Plos One*, v. 8, n. 1, 2013.

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, 2010.

- MOSAAD, A. A. et al. Sensitive and specific diagnostic assay for detection of tuberculosis in cattle. *Global Veterinaria*, v. 8, n. 6, p. 555-564, 2012.
- MONAGHAN, M. L. et al. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1-2, p. 111-124, 1994.
- MORRISON, W. I. et al. Pathogenesis and diagnosis of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Veterinary Record*, v. 146, p. 236-242, 2000.
- MUSTAFA, A. S. et al. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 region gene products in infected cattle. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 130, p. 37-42, 2002.
- MUSTAFA, A. S. et al. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle. *Infection Immunity*, v. 74, p. 4566-4572, 2006.
- NEILL, S. D. et al. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in Cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p. 41-52, 1994.
- NIEMANN, S. et al. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 9, p. 3231-3234, 2000.
- OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. 2013. Chapter 2.4.7. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2013. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf. Acessado em 3 de Junho de 2013.
- O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, v. 76, n. 1, p. 1-46, 1995.
- PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*, v. 112, n. 2-4, p. 181-190, 2006.
- PARRA, A. et al. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 127, p. 315-324, 2008.
- PEREZ, A. M.; WARD, M. P.; RITACCO, V. Modelling the feasibility of bovine tuberculosis eradication in Argentina. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International Des Epizooties*, v. 30, n. 2, p. 635-643, 2011.
- PIRSON, C. et al. Differential effects of *Mycobacterium bovis* - derived polar and apolar lipid fractions on bovine innate immune cells. *Veterinary Research*, v. 43, n. 54, 2012.

- PHILIPP, W. J. et al. Physical mapping of *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur reveals differences from the genome map of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and from *M. bovis*. *Microbiology*, v. 142, p. 3135-3145, 1996.
- POLLOCK, J. M. et al. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 81, n. 1-2, p. 103-107, 2001.
- POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. *The Veterinary Journal*, v. 163, p. 115-127, 2002.
- POLLOCK, J.M.; WELSH, M.D.; MCNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 108, n. 1-2, p. 37-43, 2005.
- POLLOCK, J. M. et al. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Veterinary Microbiology*, v. 112, n. 2-4, p. 141-150, 2006.
- PRODINGER, W. M. et al. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 10, p. 4984-4992, 2005.
- RAHIM, Z. et al. Characterization of *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoligotyping. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 8, n. 4, p. 706-713, 2007.
- RANGEN, S. A. et al. Is the gamma interferon assay in cattle influenced by multiple tuberculin injections? *The Canadian Veterinary Journal*, v. 50, p. 270-274, 2009.
- RENSHAW, P. S. et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP10 and ESAT-6. *The EMBO Journal*, v. 24, n. 14, p. 2491-2498, 2005.
- RIVERA, S. P.; JIMÉNEZ, J. F.; DEWARD, J. Valoración de las pruebas diagnósticas para tuberculosis bovina en un rebaño bovino ubicado en zona de alta incidencia del Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, v. 19, n. 6, p. 566-575, 2009.
- RITACCO, V. et al. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, v. 50, p. 365-367, 1991.
- ROCHA, V. C. F. et al. Molecular discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 13, n. 1, 2013.
- ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, n. 18, p. 101-108, 1997.
- RUGGIERO, A.P. et al. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. *Arquivo do Instituto Biológico*, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

SANI, M. et al. Direct visualization by cryo-em of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *Plos One*, v. 6, n. 3, 2010.

SCHILLER, I. et al. Bovine tuberculosis: Effect of the tuberculin skin test on *in vitro* interferon gamma responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 136, n. 1-2, p. 1-11, 2010.

SIDDERS, B. et al. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies RV3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infection Immunity*, v. 76, p. 3932-3939, 2008.

SKJØT, R. L. et al. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the *esat-6* gene family. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 10, p. 5446-5453, 2002.

SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. Técnicas imunoenzimáticas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. (Eds.). *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p. 145-178.

SOUZA, I. I. F. et al. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *Springler Plus*, v. 1, n. 77, p. 1-6, 2012.

STEWART, L. D. et al. Production and evaluation of antibodies and phage display-derived peptide ligands for immunomagnetic separation of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 5, p. 1598-1605, may. 2012.

STRAIN, S. A. J.; MCNAIR, J.; MCDOWELL, S. W. J. Bovine tuberculosis: A review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle. *Agri-food and Biociences Institute*, 2011.

THAKUR, A. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from cattle: possible public health relevance. *Indian Journal Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 289-291, 2012.

TEUTSCHBEIN, J. et al. A protein linkage map of the ESAT-6 secretion system 1(ESX-1) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological Research*, v. 164, p. 253-259, 2009.

THOEN, C. O.; LOBUE, P. A.; DONALD, A. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Veterinaria Italiana*, Teramo, v. 45, n. 1, p. 135-181, 2009.

TORRES-GONZALEZ, P. et al. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 4, p. 1-8, apr. 2013.

VALENTE, L. C. M.; VALE SÔNIA, M. L. R.; BRAGA, M. J. Determinantes do uso de medidas sanitárias de controle da brucelose e tuberculose bovina. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 49, n. 1, p. 215-232, 2011.

- VAN INGEN, J. et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 4, p. 653-655, 2012.
- VAN PINXTEREN, L. A. H.; RAVN, P.; MARIE, E. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 7, n. 2, p. 155-160, 2000.
- VARELO, K. et al. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 20, p. 164-169, 2008.
- VORDERMEIER, H. M. et al. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, n. 3, p. 571-578, 2001.
- VORDERMEIER, H. M. et al. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Veterinary Record*, v. 155, n. 2, p. 37-38, 2004.
- VORDERMEIER, H. M. et al. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*, v. 171, p. 229-244, 2006.
- VUTLA, J. B. et al. Cloning, expression and purification of ESAT-6 and CFP10 and their use in the detection of IFN- γ responses in tuberculosis infected cattle. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*, v. 1, n. 2, p. 255-264, 2011.
- XIN, T. et al., Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 20, n. 4, p. 482-490, 2013.
- WANGO, A. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gamma delta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of Comparative Pathology*, v. 133, p. 223-234, 2005.
- WATERS, W. R. et al. Use of recombinant ESAT-6:CFP10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 11, p. 729-735, 2004.
- WELSH, M. D. et al. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology, Oxford*, v. 114, n. 1, p. 101-111, 2005.

WHELAN, A. O. et al. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinate animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 9, p. 3176-3181, 2010.

WHELAN, C. et al. Performance of the enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 17, n. 5, p. 813-817, 2010.

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, 2011.

WIKER, H. G. MPB70 and MPB83 - major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 69, n. 6, p. 492-499, 2009.

WOOD, P. R.; JONES, S. L. BOVIGAM: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 181, n. 1-2, p. 147-155, 2001.

Artigo 1

**Teste intradérmico com proteínas recombinantes de *Mycobacterium bovis*
como antígenos em *Cavia porcellus***

Elaine S.P. Melo^{1*}, Ingrid I.F. Souza¹, Carlos A.N. Ramos², Ana Luíza A.R. Osório¹, Flávio R. Araújo²

Abstract. Melo E.S.P., Souza I.I.F., Ramos C.A.N., Osório A.L.A.R. & Araújo F.R. 2014. **Skin test with recombinant protein of *Mycobacterium bovis* as antigen in *Cavia porcellus*.** Teste intradérmico com proteínas recombinantes de *Mycobacterium bovis* como antígeno em *Cavia porcellus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00):00-00. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Muler, n. 2443, Cidade Universitária, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. Email: elainesp Melo@hotmail.com

The intradermal skin test for diagnosis of bovine tuberculosis has been used the purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium bovis*, that is able to induce a hypersensitivity reactions in infected animals. However, show (i.e. PPD) low specificity due to the occurrence of cross reactions with other mycobacteria. Thus, the aim of this study was to produce recombinant proteins (ESAT-6, PE13, PE5 and ESX-1) of *Mycobacterium bovis* and assess them as antigens in skin test using guinea pigs (*Cavia porcellus*) as a model, and check if the conditions employed in the purification (native or denaturing condition) interfere in the antigenic performance of these proteins. The proteins were tested in guinea pigs previously sensitized with inactivated *M. bovis* strain AN5, individually (160 µg), or as a mixed cocktail (40 µg each). The cocktail of proteins induced hypersensitivity reactions in sensitized animals significantly higher than those observed in non-sensitized animals, allowing differentiation. On the other hand, the proteins individually were not able to promote this differentiation. The conditions of solubilization and purification influenced the antigenic performance of the protein ESAT-6, since, when produced in denaturing condition triggered nonspecific reaction in non-sensitized animals. Whereas when produced under native conditions and used at low concentrations (6, 12, 24 and 48 µg) induced a significant response only in sensitized animals, confirming its potential as antigen.

Index terms: PPD bovine, skin test, bovine tuberculosis, solubility.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Senador Filinto Muler, n. 2443, Cidade Universitária, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. *Autor para correspondência: elainesp Melo@hotmail.com

² Laboratório de Imunologia, Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, n. 830, Zona Rural, CEP 70106-550, Campo Grande, MS, Brasil.

Resumo: O teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose bovina utiliza derivados proteicos purificados (PPD) de *Mycobacterium bovis* que são capazes de induzir reações de hipersensibilidade em animais infectados. No entanto, apresenta baixa especificidade devido à ocorrência de reações cruzadas com outras micobactérias. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi produzir as proteínas recombinantes (ESAT-6, PE13, PE5 e ESX-1) de *Mycobacterium bovis* e avaliá-las como antígenos em teste intradérmico utilizando *Cavia porcellus* como modelo, e verificar se as condições empregadas na purificação (nativa ou desnaturante) interferem no desempenho antigênico dessas proteínas. As proteínas foram testadas em *Cavia porcellus* previamente sensibilizados com cepa *M. bovis* AN5 inativada, individualmente (160 µg) e combinadas na forma de um coquetel (40 µg cada). O coquetel de proteínas induziu reações de hipersensibilidade nos animais sensibilizados significativamente superiores as observadas nos animais não sensibilizados, possibilitando diferenciação. No entanto, as proteínas isoladamente não foram capazes de promover essa diferenciação. As condições de solubilização e purificação influenciaram o desempenho antigênico da proteína ESAT-6, pois, quando produzida em condição desnaturante desencadeou reações inespecíficas nos animais não sensibilizados, enquanto que aquela produzida em condições nativas e aplicada em baixas concentrações (6, 12, 24 e 48 µg) induziu reações significativas apenas nos animais sensibilizados, confirmando o seu potencial como antígeno.

Termos de indexação: PPD bovino, teste intradérmico, tuberculose bovina, solubilidade.

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa de importância zoonótica, distribuída globalmente e causada principalmente pela bactéria *Mycobacterium bovis* (Michel et al. 2010). Essa enfermidade representa grande impacto na cadeia produtiva da carne devido aos prejuízos econômicos vinculados à redução gradativa dos índices zootécnicos e às condenações de carcaças em matadouros-frigoríficos sob inspeção sanitária (Brasil 2006). Além disso, torna os produtos provenientes da pecuária vulneráveis às barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional (Michel et al. 2010).

Não existe uma vacina eficaz para a tuberculose bovina (OIE 2009) e os programas de controle e erradicação da enfermidade realizados na maioria dos países (Álvarez et al. 2012), inclusive no Brasil (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal-PNCEBT), são baseados na detecção e remoção de animais infectados (teste-abate) do rebanho, por meio do teste intradérmico, que visa determinar a infecção espécie-específica por *M. bovis* diante da inoculação intradérmica de antígeno micobacteriano, que gera uma reação inflamatória local naqueles animais com infecção prévia pelo bacilo (Brasil 2006, Pollock et al. 2006).

O PPD utilizado no teste é composto por uma mistura complexa de proteínas, lipídios, açúcares e ácidos nucleicos, apresentando uma grande variedade de antígenos (Jonathan et al. 1994). Podem ser utilizados dois tipos de PPD: o PPD bovino que corresponde ao extrato antigênico de proteínas purificadas, derivadas de *M. bovis* cepa AN5 utilizada no teste cervical simples (TCS) e no teste da prega caudal (TPC) e o PPD aviário, purificado a partir de *M. avium* cepa D4, que em conjunto com o PPD bovino, pode ser utilizado no teste cervical comparativo (TCC) (Brasil 2006). No entanto, o teste intradérmico simples pode apresentar problemas relativos à especificidade devido às reações cruzadas com outras espécies de micobactérias, bem como a fatores inerentes ao hospedeiro (Álvarez et al. 2012). Dessa forma, torna-se necessária a realização de teste comparativo em reações inconclusivas, o que torna o diagnóstico mais demorado e com custos mais elevados (Neill & Pollock 2000, Schiller et al. 2010). Pois, os animais reagentes e inconclusivos só podem ser retestados pelo teste intradérmico cervical comparativo após um intervalo de 60 a 90 dias, ou podem ser considerados positivos e destinados ao abate sanitário (Brasil 2006). Este intervalo mínimo para repetição do teste visa evitar a ocorrência de resultados falso-negativos, uma vez que após o teste cutâneo pode ocorrer a dessensibilização do animal e este passa a ficar anérgico, estado no qual há uma diminuição na capacidade de responder a novos testes (Buddle et al. 2009). Dessa forma, testes diagnósticos sensíveis e mais específicos são necessários para o avanço na estratégia de controle em direção à erradicação da tuberculose bovina (Menin et al. 2013).

Diversos antígenos, principalmente aqueles envolvidos na resposta imune celular e humoral do hospedeiro, como as proteínas ESAT-6, CFP10, MPB70, MPB83 e RV3615c, têm sido propostos para utilização em diagnóstico da tuberculose bovina e humana, seja em

teste intradérmico ou quantificação de interferon- γ (Kalra et al. 2010, Whelan et al. 2010, Flores-Villalva et al. 2012). A proposta neste estudo foi produzir as proteínas recombinantes PE5, PE13, ESAT-6 e ESX-1 de *M. bovis*, envolvidas na resposta imune celular dos bovinos, avaliá-las como antígenos em teste intradérmico utilizando *Cavia porcellus* como modelo, e verificar se as condições empregadas na purificação (em condições nativas ou desnaturantes) interferem no desempenho antigênico dessas proteínas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amplificação dos genes. Os genes *pe5*, *pe13* e *esat-6* foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de DNA de *M. bovis* cepa AN5, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos desenhados e amplificados de acordo com Souza et al. (2012), exceto *esx-1* que foi amplificado com os primers (*forward*: 5' TATCAATTCGGGGACGTCGACGCTCACG 3' e *reverse*: 5' GGCGCTGTCGGTTTGTGCCATGTTGTTG 3') desenhados utilizando o programa *PrimerSelect* (DNASTAR).

Clonagem dos genes e produção das proteínas recombinantes. Os genes amplificados foram clonados em plasmídeo *pGEM-T Easy* (Promega), seguindo as instruções do fabricante e subclonados em plasmídeo *pET47b* (Novagen). A indução da expressão dos genes em *Escherichia coli* Rosetta foi realizada utilizando 1 mM/ml de isopropil- β -D-galactopiranosídeo (IPTG) em 500 ml de Luria-Bertani caldo contendo com 50 μ g/ml de cloranfenicol e 30 μ g/ml de canamicina, a 30°C durante 4 h a 200 rpm. A expressão dos genes foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e *Western-blot* com anticorpo monoclonal anti-6x-histidina (Sigma).

As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos e os sedimentos ressuspensos em tampão contendo n-lauril-sarcosil e triton X-100, ambos a 1% e incubados por uma hora em banho-maria a 37°C. A solução foi submetida à desrupção ultrassônica 6 vezes por 10 segundos e centrifugada conforme descrita anteriormente. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em resina de agarose-níquel utilizando as colunas de cromatografia *His-trap* HP (GE Healthcare) em condições nativas, ou seja, sem a utilização de agentes desnaturantes, seguindo as instruções do fabricante. Após purificação as proteínas foram dialisadas em tampão fosfato a 4°C por 72 horas, quantificadas por fluorometria em sistema *Qubit* (Invitrogen) e a purificação confirmada por SDS-PAGE.

Uma alíquota do sedimento de cultura de ESAT-6 também foi ressuspensa em tampão de lise (Na₂HPO₄ 20mM; NaCl 0,5M; guanidina HCl 6M) pH 8,0 e incubada por uma hora em banho-maria a 37°C. A purificação foi realizada utilizando o mesmo sistema de cromatografia descrito acima, mas em condições desnaturantes, empregando uréia (8 M)

nos tampões de lavagem e eluição. Após a purificação, a proteína foi dialisada e quantificada conforme descrito anteriormente.

Aspectos éticos. O uso de *Cavia porcellus* foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil (protocolo 321/11). O experimento foi realizado em conformidade com as normas e regulamentos internacionais para experimentação com animais.

Sensibilização com *Mycobacterium bovis*. Vinte e oito fêmeas da espécie *Cavia porcellus*, pesando entre 250 e 350 g, foram utilizados nesse estudo. Os animais foram mantidos com ração comercial (Nuvilab) e água *ad libitum*, em ambiente com ciclo claro/escuro controlado. Dezenove animais foram sensibilizados com *M. bovis* cepa AN5 (LANAGRO-MAPA, Brasil) inativada por calor (2 mg/ml) via intramuscular, na face interna da coxa direita, e nove animais receberam salina estéril e foram mantidos como controle negativo. Sete semanas após a sensibilização foi realizado o teste intradérmico.

Cavia porcellus foi utilizado como modelo nesse experimento devido ao fato de ser a espécie recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para a avaliação de potência do PPD produzido e comercializado (OIE, 2013).

Teste intradérmico Todos os animais foram tosqueados nas regiões intercostais e os sítios de inoculação distribuídos no sentido oral-caudal, nos flancos direito e esquerdo para realizar o teste intradérmico.

Dez animais, (7 sensibilizados e 3 não sensibilizados) foram utilizados para avaliar o desempenho das proteínas recombinantes em diferenciar animais sensibilizados com *M. bovis* de animais não sensibilizados (Fig. 1). Sete sítios de injeção intradérmica foram utilizados em cada animal. Todas as proteínas purificadas em condições nativas (PE5, PE13, ESAT-6 e ESX-1) foram administradas na concentração de 160 µg individualmente e como componente de um coquetel formado por 40 µg de cada proteína. PPD bovino (TECPAR, Curitiba, Brasil) na concentração de 5 µg e salina foram incluídos em cada teste.

Avaliação da influência das condições de purificação no desempenho antigênico das proteínas. Para verificar se as condições de purificação das proteínas influenciaram no seu desempenho em estimular reação de hipersensibilidade tardia foram utilizados 18 animais. Em 6 animais sensibilizados e 3 não sensibilizados foram aplicadas injeções intradérmicas com a proteína ESAT-6 purificada em condições nativas, em diluição seriada de 6, 12, 24 e 48 µg e os outros 6 animais sensibilizados e 3 não sensibilizados receberam a proteína ESAT-6 nas mesmas concentrações descritas acima, mas purificada em condições desnaturantes (Fig.1).

A posição dos inóculos foi alternada em cada animal para minimizar o efeito dos pontos de inoculação sobre as médias das reações e as leituras das reações (mm) foram realizadas com base na medida da reação após 24 horas da aplicação dos inóculos, conforme metodologia apresentada por OIE (2013).

O inoculador e os leitores não tinham informações sobre os inóculos, com o objetivo de evitar qualquer interferência consciente ou não nos resultados do experimento.

Análise estatística. A diferença entre as reações médias nos animais não sensibilizados e sensibilizados foram avaliadas pelo teste *t* de Student, com nível de significância de 5%, e a magnitude da reação induzida por diferentes concentrações de proteína foram avaliadas pela análise de variância 1 fator.

RESULTADOS

A inoculação do PPD bovino provocou reações intradérmicas em todos os animais sensibilizados, que variaram entre 15 a 21 mm e foram significativamente superiores ($p < 0,0001$) às observadas nos animais não sensibilizados.

As proteínas PE5, PE13, ESAT-6 e ESX-1 purificadas em condições nativas (160 μg), quando utilizadas isoladamente, não apresentaram reações médias significativamente superiores nos animais sensibilizados com relação aos não sensibilizados ($p < 0,05$). Apesar de ESAT-6 ter apresentado a maior reação média (9,3 mm) nos animais sensibilizados, também provocou reações (7 mm) inespecíficas relevantes nos animais não sensibilizados (Fig. 2). Mas quando as proteínas foram combinadas na forma de coquetel, composto por 40 μg de cada uma, elas foram capazes de diferenciar os animais sensibilizados dos não sensibilizados ($p = 0,002$).

Diferentemente das proteínas utilizadas individualmente e em forma de coquetel, que geraram reação inespecífica nos animais não sensibilizados, o PPD bovino só induziu reação de hipersensibilidade tardia nos animais sensibilizados.

O teste intradérmico com a proteína ESAT-6 recombinante, purificada em condições nativa e desnaturante (Fig. 3A e 3B), gerou reação cutânea média de 10,25 mm nos animais sensibilizados, em leitura realizada após 24 horas. Não houve diferença significativa ($p=0,063$) entre a magnitude das reações induzidas pela proteína administrada nas concentrações de 6, 12, 24 e 48 μg (Fig. 4).

Os animais não sensibilizados também desenvolveram reação média de 10,25 mm, mas somente em resposta as quatro concentrações testadas da proteína ESAT-6 purificada em condições desnaturantes, pois o mesmo não foi observado quando da utilização do PPD de *M. bovis*, salina e com as diferentes concentrações de ESAT-6 purificada em condição nativa.

A especificidade da proteína ESAT-6 em estimular reação cutânea nos animais foi influenciada pela condição de solubilização e purificação. Pois, ao comparar a utilização dos detergentes n-lauril-sarcosil e triton X-100 para solubilizar os agregados proteicos e purificação em condição nativa, em relação ao emprego de hidrocloreto de guanidina para solubilização e purificação em condição desnaturante utilizando uréia, foi observado que as

proteínas que foram submetidas a esse último método induziram reações inflamatórias locais nos animais não sensibilizados, com as quatro concentrações de proteína testadas (6, 12, 24 e 48 µg).

DISCUSSÃO

Estudos prévios têm demonstrado que a utilização de antígenos específicos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) em teste intradérmico podem proporcionar um diagnóstico mais específico e sensível (Whelan et al. 2010).

Nesse estudo, avaliamos o potencial de ESAT-6 que é uma proteína naturalmente imunodominante entre as espécies do CMT (Mustafa et al. 2002), a ESX-1 e as proteínas da família das PEs, PE5 e PE13, que juntas são responsáveis pela interação com as células do hospedeiro, modulação da resposta imunológica e persistência da infecção (Sani et al. 2010).

A aplicação desses antígenos tem variado e os resultados mais promissores têm sido observados quando combinações de antígenos em coquetéis são utilizadas em comparação com o PPD bovino (Whelan et al. 2010, Jones et al. 2012, Flores-Villalva et al. 2012). Assim como nesse estudo, em que o coquetel com as proteínas PE5, PE13, ESAT-6 e ESX-1 foi capaz de induzir resposta inflamatória nos animais sensibilizados, superiores as desencadeadas nos animais não sensibilizados. O que não pôde ser observado quando as mesmas proteínas foram aplicadas individualmente.

Em avaliação semelhante, utilizando as proteínas ESAT-6, CFP10, MPB70, MPB83 e Rv3615c para teste intradérmico em bovinos, Whelan et al. (2010) observaram que as proteínas MPB70, MPB83 e RV3615c testadas isoladamente apresentaram pouca capacidade de induzir a produção de interferon-gama *in vitro*, se comparado com ESAT-6 e CFP10, assim como não foram capazes de detectar bovinos naturalmente infectados em teste intradérmico. A combinação dessas proteínas por outro lado, foi capaz de diferenciar animais infectados de não infectados no teste intradérmico. No entanto, a exclusão destas proteínas do coquetel diminuiu significativamente a sensibilidade do teste. O que indica que as proteínas subdominantes estão envolvidas no processo de hipersensibilidade tardia induzindo o recrutamento de células T antígeno-específicas que potencializam a ação das proteínas imunodominantes ESAT-6 e CFP10. O que leva a concluir que todos os antígenos desempenham papel fundamental na resposta contra *M. bovis* e conseqüentemente são importantes para serem testados no teste intradérmico.

Assim, considerando a importância da interação proteína-proteína e a interferência imunológica entre os vários componentes de coquetéis multiantigênicos, as reações de hipersensibilidade tardia devem ser investigadas usando várias combinações de proteínas em comparação com o PPD bovino (Kalra et al. 2010).

A proteína ESAT-6 confirmou seu potencial para o diagnóstico da tuberculose bovina, devido à capacidade demonstrada nesse estudo, quando purificada em condição nativa, em diferenciar os animais sensibilizados experimentalmente daqueles não sensibilizados, mesmo quando utilizada a menor concentração de 6 µg. Além disso, os resultados demonstraram não haver diferença significativa na magnitude das reações estimuladas por ESAT-6 nas concentrações de 6, 12, 24 e 48 µg, indicando que não foi possível observar uma relação de dose dependência, assim como observado por Xin et al. (2013), ao testar as concentrações de 20, 50 e 70 µg de ESAT-6 juntamente com CFP10 e TB10.4 em teste intradérmico em bovinos. Por outro lado, Aggerbeck & Madsen (2006) ao avaliarem ESAT-6 recombinante em teste cutâneo em animais, observaram uma reação proporcional ao aumento da concentração das proteínas de 0,01, 0,1 e 1 µg, mas que só foi verificado após sucessivas aplicações de seis doses da proteína no mesmo animal, o que estimulou a potencialização da resposta de hipersensibilidade.

As reações observadas nos animais não sensibilizados, induzidas pelas proteínas, podem estar relacionadas a subprodutos do processo de lise para ruptura da célula bacteriana e liberação das proteínas e do método de solubilização e purificação das proteínas recombinantes, que são expressas na maioria das vezes na forma de corpúsculos de inclusão. Esses corpúsculos são compostos por agregados proteicos, geralmente na forma inativa e insolúvel, que se acumulam no interior da bactéria produtora, devido ao estresse por elevadas temperaturas ou superexpressão gênica (Singh & Panda 2005). Além desses agregados homólogos, podem ser formados também agregados heterólogos de proteínas com lipídeos, polissacarídeos e com outros componentes de membrana (Fifis et al. 1994).

As proteínas produzidas nessas condições não podem ser purificadas de forma eficiente diretamente do cultivo celular, sem antes receberem um tratamento para a lise celular e solubilização dos agregados. Para esse procedimento, além das técnicas de lise mecânica como a desrupção ultrassônica e método físico como o choque térmico (congelamento/descongelamento), é necessário lançar mão do processo de lise química utilizando agentes caotrópicos como a uréia e o hidrócloro de guanidina que rompem as interações não covalentes, aumentam a solubilidade das substâncias apolares e desfazem as interações hidrofóbicas desnaturando as proteínas. No entanto, se levarmos em consideração que a imunotoxicidade é a questão mais importante a cerca dos reagentes utilizados para o diagnóstico intradérmico que depende de uma resposta imunológica (Du et al. 2013), esses agentes desnaturantes precisam ser totalmente removidos das amostras proteicas por apresentarem toxicidade celular. Contudo, o processo de diálise de 72 h empregado nesse estudo parece não ter sido suficiente para completa remoção desses reagentes das amostras proteicas.

Uma alternativa para solubilizar os corpúsculos de inclusão é a utilização dos surfactantes, como o sarcosil que é um detergente iônico e o triton X-100 um detergente não iônico que solubilizam os agregados proteicos devido à formação de complexo proteína/detergente sob condições normalmente não-desnaturantes, preservando a forma biologicamente ativa da proteína (Bhairi & Mohan 2007). Apesar de o triton X apresentar massa micelar média de 80.000 Da, que não permite sua remoção por diálise, a sua

utilização em baixa concentração (1%), que foi adicionada no início do processo de purificação, somada as baixas concentrações de proteína (6, 12, 24 e 48 µg), se mostrou atóxico no teste cutâneo animais, permitindo a indução de reações inflamatórias específicas pelas proteínas. Além disso, esse detergente ajuda a remover as endotoxinas provenientes da parede celular da bactéria *E. coli* na qual as proteínas foram produzidas, pois elas podem ativar a resposta imune e interferir nas reações induzidas pelas proteínas de *M. bovis*. Dessa forma, pode-se destacar que a utilização da proteína ESAT-6 isoladamente em uma concentração maior (160 µg), provocou reações semelhantes tanto nos animais sensibilizados experimentalmente quanto nos não sensibilizados, o que indica que com o aumento da concentração da proteína, mais resíduos do detergente foi administrado no inóculo, o que levou a indução de reações inespecíficas.

Nesse sentido, Aggerbeck & Madsen (2006) relatam que a rota de administração e a dose do antígeno influenciam a ocorrência de reações locais mesmo em animais não sensibilizados, pois observaram reações cutâneas de 6 mm em resposta a aplicação de 100 µg da proteína ESAT-6 em animais *naives*, semelhante ao encontrado quando 1% de tween 20 foi injetado. Porém, quando 10 µg de ESAT-6 foi aplicada, não foram observadas reações nesses animais. Dessa forma, as reações inespecíficas desenvolvidas foram atribuídas aos resíduos do detergente tween 20 presente no tampão utilizado para a purificação da proteína.

CONCLUSÃO

O coquetel de proteínas (PE5, PE13, ESAT-6 e ESX-1) produzidas em condições nativas induziu resposta intradérmica em *Cavia porcellus* sensibilizados com *M. bovis* inativado. Assim como a proteína ESAT-6, em condições nativas. Tais respostas, embora presentes, ainda não fazem com que essas proteínas recombinantes representem uma alternativa ao teste intradérmico com PPD bovino.

Agradecimentos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado, ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-SP) pelo fornecimento de *Cavia porcellus*, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Embrapa Gado de Corte pelo financiamento.

REFERÊNCIAS

- Aggerbeck H. & Madsen S.M. 2006. Safety of ESAT-6. *Tuberculosis*. 86:363-373.
- Álvarez J., Perez A., Bezos J., Marqués S., Grau A., Saez J.L., Mínguez O., Juan L. & Domínguez L. 2012. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet. Microbiol.* 155:38-43.
- Bhairi S.M. & Mohan C. 2007. Detergents - A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Calbiochem - Novabiochem Corporation. La Jolla. 42p.
- Brasil. 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA. 188p.
- Buddle B.M., Livingstone P.G. & Lisle G.W. 2009. Advances in *ante-mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle. *N. Z. Vet. J.* 57:173-180.
- Du W.X., Chen B.W., Lu J.B., Gao M.Q., Shen X.B., Yang L., Su C., Wang G.Z., Sun Q.F. & Xu M. 2013. Preclinical study and phase I clinical safety evaluation of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 19:146-152.
- Fifis T., Rothel J.S. & Wood P.R. 1994. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation. *Vet. Microbiol.* 40:65-81.
- Flores-Villalva S., Suárez-Güemes F., Espitia C., Whelan A.O., Vordermeier H.M. & Gutiérrez-Pabello J.A. 2012. Tuberculin skin test specificity is modified by the use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP10 in *Mycobacterium bovis* naturally infected cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 19:797-803.
- Jones G.J., Whelan A., Clifford D., Coad M. & Vordermeier H.M. 2012. Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. *Clin. Vaccine Immunol.* 19:620-622.
- Kalra M., Khuller G.K., Sheikh J.A. & Verma I. 2010. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* specific RD antigens for delayed type hypersensitivity responses in guinea pig. *Indian J. Exp. Biol.* 48:117-123.
- Menin A., Fleith R., Reck C., Marlow M., Fernandes P., Pilati C. & Báfica A. 2013. Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *Plos One.* 8.

- Michel A.L., Müller B. & van Helden P.D. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Vet. Microbiol.* 140:371-381.
- Monaghan M.L., Doherty M.L., Collins J.D., Kazda J.F. & Quinn P.J. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40:111-124.
- Mustafa A.S., Cockle P.J., Shaban F., Hewinson R.G. & Vordermeier H.M. 2002. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 region gene products in infected cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 130:37-42.
- Neill S.D. & Pollock J.M. 2000. Testing for bovine tuberculosis-more than skin deep. *Vet. J.* 160:3-5.
- OIE. 2013. Chapter 2.4.7. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf>. Acessado em 3 de Junho de 2013.
- Pollock J.M., Rodgers J.D., Welsh M.D. & McNair J. 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Vet. Microbiol.* 112:141-150.
- Sani M., Houben E.N.G., Geurtsen J., Pierson J., Punder K., Zon M.V., Wever B., Piersma S.R., Jiménez C.R., Daffé M., Appelmelk B.J., Bitter W., van der Wel N. & Peters P.J. 2010. Direct visualization by cryo-em of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *Plos One.* 6.
- Schiller I., Vordermeier H.M., Waters W.R., Whelan A.O., Coad M., Gormley E., Buddle B.M., Palmer M., Thacker T., McNair J., Welsh M., Hewinson R.G., Oesch B. 2010. Bovine tuberculosis: Effect of the tuberculin skin test on *in vitro* interferon gamma responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136:1-11.
- Singh S.M. & Panda A.K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 99:303-310.
- Souza I.I.F., Melo E.S.P., Ramos C.A.N., Farias T.A., Osório A.L.A.R., Jorge K.S.G., Vidal C.E.S., Silva A.S., Silva M.R., Pellegrin A.O., Araújo F.R. 2012. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *SpringlerPlus.* 1:1-6.
- Xin T., Jia H., Ding J., Li P., Yang H., Hou S., Yuan W., Guo X., Wang H., Liang Q., Li M., Wang B., Zhu H. 2013. Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 20:482-490.
- Whelan A.O., Clifford D., Upadhyay B., Breadon E.L., McNair J., Hewinson G.R., Vordermeier M.H. 2010. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinate animals. *J. Clin. Microbiol.* 48:3176-3181.

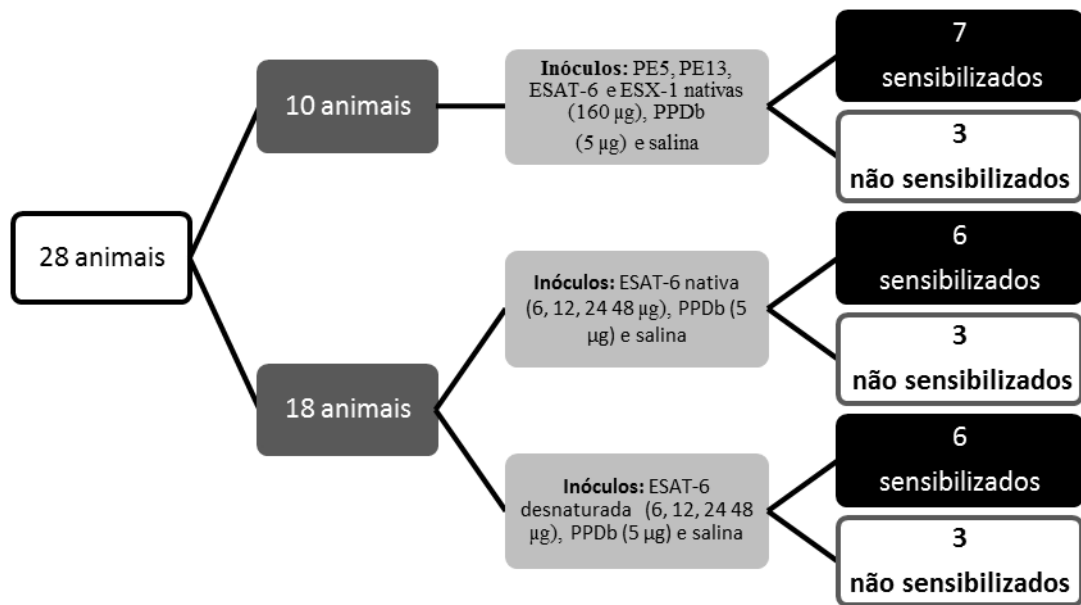


Fig. 1. Fluxograma da distribuição dos animais (*Cavia porcellus*) nos grupos experimentais e os respectivos inóculos aplicados via intradérmica.

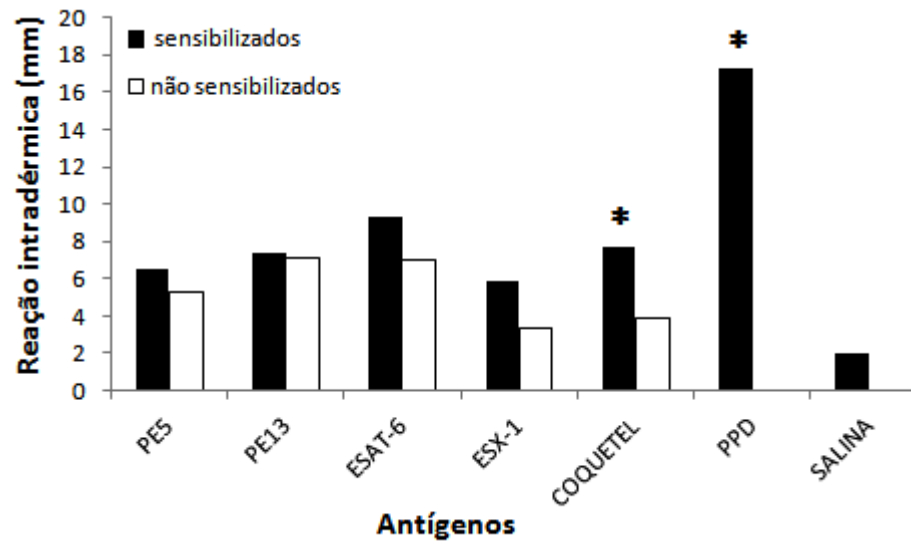


Fig.2. Tamanho médio das reações intradérmicas em *Cavia porcellus* sensibilizados e não sensibilizados com *Mycobacterium bovis*, utilizando as proteínas PE5, PE13, ESAT-6 e ESX-1 recombinantes purificadas em condições nativas (160 μ g) e coquetel (40 μ g de cada). * Diferença significativa entre animais sensibilizados e não sensibilizados pelo teste *t* de Student.

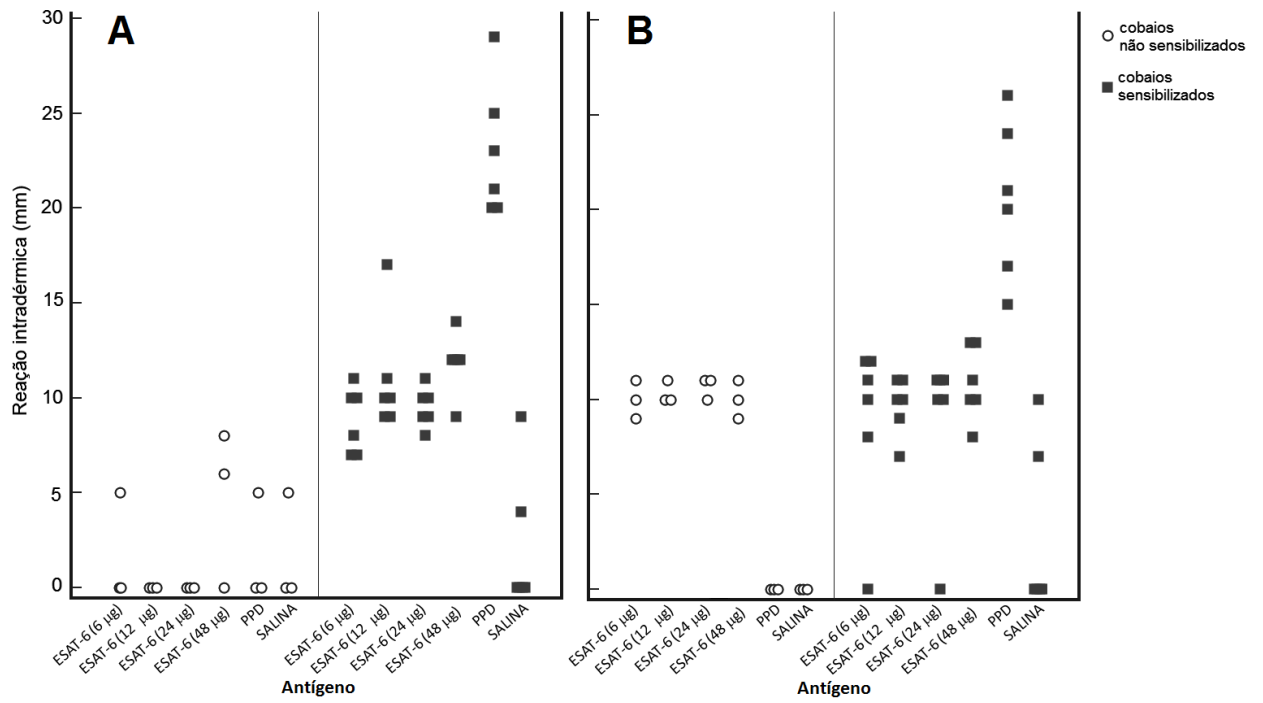


Fig.3. Comparação do desempenho da proteína ESAT-6 submetida a duas condições de purificação em estimular reação no teste intradérmico. **A:** Proteína purificada em condições nativas; **B:** Proteína purificada em condições desnaturantes.

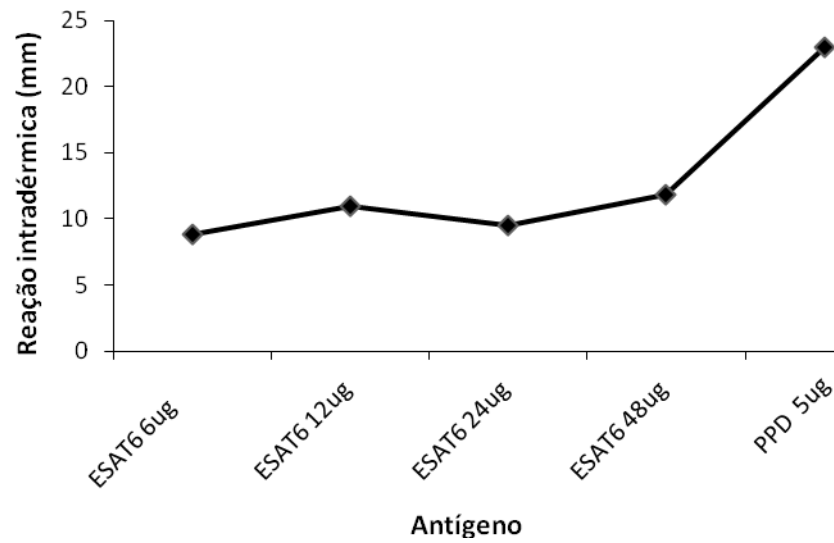


Fig.4. Comparação entre as reações intradérmicas médias (mm) desencadeadas pelas diferentes concentrações da proteína ESAT-6 (6, 12, 24, 48 μ g) purificada em condições nativas quando aplicadas em teste intradérmico em *Cavia porcellus* sensibilizados com *M. bovis*.

Artigo 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

Avaliação do uso de proteínas recombinantes de *Mycobacterium bovis* como antígenos no teste intradérmico em bovinos[#]

ESP Melo^{a*}, IIF Souza^a, CAN Ramos^b, ALAR Osório^a, NV Verbisck^c, FR Araújo^c

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

^b Bolsista DTI CNPq, Embrapa Gado de Corte, Brasil.

^c Embrapa Gado de Corte, Brasil.

[#] Suporte Financeiro: CNPq (proc. 505837/2008-0) e EMBRAPA MP2 02.08.06.004.

^{*} Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Muler, n. 2443, Cidade Universitária, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. Email: elainesp Melo@hotmail.com

1 RESUMO

2

3 O teste intradérmico com derivados proteicos purificados (PPD) de *Mycobacterium bovis* tem sido
4 utilizado para o diagnóstico da tuberculose bovina. No entanto, devido a problemas relacionados
5 principalmente a especificidade desta mistura de proteínas, a busca por melhores antígenos e mais
6 específicos é necessária. No presente estudo as proteínas recombinantes de *M. bovis* ESX-1,
7 Mb0143, PE5 e PE13 foram avaliadas como antígenos no teste intradérmico pela primeira vez em
8 bovinos. Vinte e quatro animais sensibilizados e cinco não sensibilizados com a cepa AN5
9 inativada de *M. bovis* foram injetados, simultaneamente, com cada proteína recombinante, um
10 coquetel com todas as proteínas, PPD *M. bovis*, PPD *M. avium* e salina. Apenas as proteínas ESX-
11 1, Mb0143 e PE5 foram capazes de diferenciar bovinos sensibilizados e não sensibilizados quando
12 320 µg de proteína foi utilizada e a leitura realizada em 24 horas após a injeção. ESX-1 e PE5
13 exibiram níveis de sensibilidade de 83,33% e especificidade de 100% e 80%, respectivamente. Os
14 resultados do presente estudo sugerem que as proteínas recombinantes têm potencial para serem
15 avaliadas como antígenos em ensaios de teste intradérmico em bovinos.

16

17 *Palavras chave:* tuberculose bovina, teste intradérmico, proteínas recombinantes

18 *Key words:* bovine tuberculosis; skin test, recombinant proteins

19

20

21

22

23

24

1 INTRODUÇÃO

2

3 A tuberculose bovina é uma doença de importância econômica e zoonótica causada por
4 membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em particular por *Mycobacterium bovis*
5 (Wobeser 2009, Michel *et al* 2010). Programas de controle e erradicação dessa enfermidade
6 envolvem a detecção e eliminação de animais infectados (Brasil 2006, Álvarez *et al* 2012), com
7 base principalmente na resposta imune mediada por células (McNair *et al* 2007, Good e Duignan
8 2011), avaliada por meio de teste intradérmico e detecção de interferon gama (IFN- γ) (Rothel *et al*
9 1992).

10 O teste intradérmico envolve a mensuração do aumento da espessura da dobra de pele 72 h
11 após a injeção intradérmica de extratos micobacterianos, denominados derivados proteicos
12 purificados (PPD). No entanto, devido à complexidade destes reagentes e o compartilhamento de
13 componentes antigênicos entre micobactérias patogênicas e não patogênicas, o PPD nem sempre
14 permitem a discriminação entre bovinos infectados com *M. bovis* e não infectados, sensibilizados
15 por micobactérias ambientais e *Mycobacterium avium* subsp. *avium* ou *M. avium* subsp.
16 *paratuberculosis* (Waters *et al* 2004, Pollock *et al* 2005, Schiller *et al* 2010). Assim, a comparação
17 com a resposta ao PPD *M. avium* é frequentemente utilizada para facilitar a discriminação entre
18 animais infectados por *M. bovis* e aqueles expostos a micobactérias ambientais (Pollock *et al*
19 2005).

20 Apesar da ampla utilização deste ensaio, os relatos de sensibilidade variam de 68 a 95%, ao
21 passo que a especificidade (para o teste cervical comparativo) varia de 96 a 99% (Monaghan *et al*
22 1994, Whelan *et al* 2004, De la Rua-Domenech *et al* 2006). Além disso, há sugestões de que as
23 inoculações de PPD podem sensibilizar os animais afetando o resultado de testes intradérmicos
24 subsequentes (Thom *et al* 2004, Coad *et al* 2010). A complexidade do PPD, a presença de
25 componentes de reação cruzada e a baixa especificidade estimularam a pesquisa por novos
26 antígenos e ensaios de diagnóstico específicos para *M. bovis* (Pollock *et al* 2005, Aagaard *et al*
27 2010).

28 Nos últimos anos, um grande número de proteínas de *M. bovis* foram purificadas e
29 caracterizadas (Harboe *et al* 1996, Wiker *et al* 1998, Rhodes *et al* 2000, Mustafa *et al* 2006,

1 Sidders *et al* 2008, Jones *et al* 2010). No entanto, apenas algumas foram avaliadas como antígenos
2 em teste intradérmico em bovinos, tais como ESAT-6 (Pollock *et al* 2003, Whelan *et al* 2010,
3 Flores-Villalva *et al* 2012), CFP10, MPB70 e MPB83 (Whelan *et al* 2010). Embora resultados
4 promissores tenham sido observados com o uso de ESAT-6 e CFP10, individualmente (Pollock *et*
5 *al* 2003), ou em combinações (Whelan *et al* 2010, Casal *et al* 2012), não há evidências suficientes,
6 até o presente, para justificar a substituição do PPD tradicional por estas proteínas recombinantes,
7 principalmente devido a problemas relacionados com sensibilidade (Pollock *et al* 2003, Whelan *et*
8 *al* 2010). Jones *et al* (2012) relataram um nível de sensibilidade de 87,5% e especificidade de
9 97,6%, utilizando um coquetel de ESAT-6/CFP10/Rv3615c com a adição de Rv3020c. Whelan *et*
10 *al* (2010) relataram uma sensibilidade e especificidade de 73,6% e 100%, respectivamente,
11 utilizando um coquetel de proteínas recombinantes constituídos por ESAT-
12 6/CFP10/MPB70/MPB83. Assim, existe uma necessidade de avaliar outras proteínas
13 recombinantes de *M. bovis* em testes cutâneos em bovinos.

14 O objetivo do presente estudo foi avaliar as proteínas ESX-1, Mb0143, PE5, PE13 e
15 TB10.4 recombinantes como antígenos na diferenciação de bovinos experimentalmente
16 sensibilizados por *M. bovis* de animais não sensibilizados.

17

18 MATERIAL E MÉTODOS

19

20 *Aspectos éticos*

21 O uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade
22 Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil (protocolo 321/11). Todos os experimentos foram
23 realizados em conformidade com as normas e regulamentos internacionais para experimentação
24 com animais.

25

26

1 *Sensibilização dos bovinos*

2 Foram utilizados bovinos da raça Caracu (n = 29), com cerca de 24 meses de idade, peso
3 médio de 408 kg, criados na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil. Os animais
4 foram selecionados a partir de um rebanho sem história clínica ou patológica de tuberculose e
5 negativos em ELISA com base nos antígenos recombinantes P27 e MPB70 de *M. bovis*, de acordo
6 com o descrito por Farias *et al* (2012). Vinte e quatro animais foram sensibilizados por via
7 subcutânea na região do pescoço com 10 mg de extrato de *M. bovis* AN5 (LANAGRO - MAPA,
8 Brasil) inativado por calor (96 - 105° C durante 30 min). Além disso, os cinco animais restantes
9 foram inoculados apenas com solução salina estéril. A fim de evitar qualquer possibilidade de
10 sensibilização dos animais experimentais, os mesmos não foram submetidos ao teste intradérmico.

11

12 *Amplificação dos genes*

13 DNA de *M. bovis* (AN5) foi extraído a partir de culturas em meio Stonebrink, utilizando kit
14 comercial (Blood DNA Easy & Tissue Kit, Qiagen). Foram utilizados os primers que amplificam
15 para os genes, *mb0143*, *pe5*, *pe13* e *tb10.4* conforme descrito por Souza *et al* (2012) e os primers
16 (*forward*: 5' TATCAATTCGGGGACGTCGACGCTCACG 3' e *reverse*: 5'
17 GGCGCTGTCGGTTTGTGCCATGTTGTTG 3') para o gene *esx-1*, desenhado usando o
18 programa *PrimerSelect* (DNASTAR).

19 As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em volume final de 25 µl
20 contendo 20 mM de Tris HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 250 mM de cada
21 dNTP, 100 µg de cada primer, 0,2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 50 µg de DNA de *M.*
22 *bovis*. O protocolo de amplificação foi o seguinte: 95°C por 4 minutos, seguidos de 30 ciclos a
23 95°C por 1 minuto (desnaturação), anelamento por 30 segundos a 56°C (*pe5*), 58°C (*pe13*, *tb10.4*),
24 64°C (*mb0143*) e 65°C (*esx-1*), extensão por 30 segundos a 72°C. Uma etapa de extensão final foi
25 realizada a 72°C por 4 min.

26

27

1 *Clonagem dos genes, produção e avaliação das proteínas recombinantes.*

2 Após amplificação, os genes foram clonados inicialmente no plasmídeo *pGEM-T Easy*
3 (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente os genes foram subclonado em
4 *pET47-b* (Novagen), exceto *tb10.4*, que foi subclonado em *pET28-a* (Novagen) em sítio de *EcoRI*.

5 *Escherichia coli* Rosetta foi utilizada como célula hospedeira para todas as construções de
6 DNA. A indução da expressão dos genes foi realizada utilizando 1 mM/mL de isopropil-β-D-
7 galactopiranosido (IPTG) em 500 ml de Luria-Bertani caldo contendo 50 µg/ml de cloranfenicol e
8 30 µg/ml de canamicina, a 30 °C durante 4 h a 200 rpm. A expressão dos genes foi confirmada por
9 eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western-
10 blot com anticorpo monoclonal anti-6x-histidina (Sigma).

11 As proteínas recombinantes foram solubilizadas com 6 M de guanidina HCl e purificadas
12 em condições desnaturantes por cromatografia de afinidade, utilizando resina de agarose-níquel
13 His-trap HP (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. As proteínas recombinantes
14 foram dialisadas com PBS a 4 °C durante 72 h e as concentrações foram determinadas por
15 comparação com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina em SDS-PAGE, utilizando
16 o *software* de análise de imagem *LabImage* v.3.3.2 (Loccus, Brasil).

17 As massas moleculares das proteínas recombinantes foram analisadas por espectrometria
18 de massas (MALDI-TOF) utilizando espectrômetro Autoflex III (Bruker Daltonics). Para tanto, as
19 proteínas foram homogeneizadas com a matriz 2,5-di-hidroxibenzóico (Sigma-Aldrich) e os
20 espectros foram adquiridos após 1000 disparos de laser no modo linear positivo sob calibração
21 externa com calibradores *ProteoMass* (Sigma).

22 As proteínas recombinantes utilizadas neste estudo, com exceção de ESX-1, foram
23 previamente avaliadas por ELISA e foram reconhecidas por anticorpos (IgG - Sigma) de bovinos
24 naturalmente infectados por *M. bovis*, de acordo com o descrito por Souza *et al* (2012).

25

26

27

1 *Teste intradérmico*

2 Sessenta dias após a sensibilização, os bovinos foram separados em três grupos. Dois
3 grupos compostos por 12 bovinos sensibilizados cada e um terceiro grupo constituído por cinco
4 animais não sensibilizados. Todos os animais receberam uma inoculação intradérmica de 100 µg
5 de PPD de *M. bovis* (3250 UI) e 50 µg de PPD de *M. avium* (2500 IU) em volume de 0,1 ml, de
6 acordo com o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose
7 e Tuberculose Animal (PNCBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil
8 2006). Todos os PPDs foram fornecidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR
9 (Curitiba, Brasil).

10 O primeiro grupo de animais sensibilizados recebeu 160 µg de cada proteína recombinante
11 (ESX-1, Mb0143, PE5, PE13 e TB10.4), um coquetel contendo 32 µg de cada proteína e salina
12 estéril em volume final de 0,16 ml. O segundo grupo de bovinos sensibilizados recebeu 320 µg de
13 cada proteína recombinante, um coquetel contendo 64 µg de cada proteína e salina em volume
14 final de 0,32 ml. Três animais não sensibilizados receberam todos os inóculos de proteínas em
15 volume final de 0,16 ml e dois em volume final de 0,32 ml. As concentrações de proteínas
16 utilizadas neste experimento foram estabelecidas com base em avaliações anteriores em *Cavia*
17 *porcellus* (dados não mostrados).

18 Nove pontos de inoculação intradérmica foram estabelecidos em cada animal, quatro em
19 um lado e cinco no outro lado do pescoço, com uma distância de aproximadamente 15 cm entre os
20 locais de inoculação. Os pontos de inoculação foram alternados sistematicamente em cada animal
21 para minimizar qualquer viés relacionado ao local da inoculação.

22 Os resultados foram expressos como a diferença na espessura da dobra da pele, em
23 milímetros (mm), entre a pré e pós-inoculação, em intervalos de 24, 48 e 72 h após as inoculações
24 intradérmicas. Os técnicos que realizaram as inoculações e medições não receberam quaisquer
25 informações sobre a natureza dos inóculos e a identidade dos pontos de inoculação durante as
26 medições. O teste intradérmico cervical comparativo foi interpretado com base nas normas
27 técnicas do PNCBT / Brasil (reações positivas = Δ espessura da dobra da pele para PPD *M. bovis* –
28 PPD *M. avium* ≥ 4 mm).

1 *Análise estatística*

2 O aumento da espessura da dobra da pele (em mm) de cada combinação (proteína /concentração /
3 tempo de leitura pós-inoculação) foi comparada com as respectivas medições nos animais não
4 sensibilizados utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Diferenças na espessura da
5 dobra cutânea entre os animais não sensibilizados inoculados com 0,16 ml ou 0,32 ml também
6 foram analisadas usando o teste de *Mann-Whitney*. A sensibilidade e especificidade das melhores
7 combinações (proteína /concentração /tempo de leitura), resultando em diferença significativa
8 entre os bovinos sensibilizados e não sensibilizados, foram interpretados usando um ponto de corte
9 ≥ 1 mm, conforme utilizado por Whelan *et al* (2010), também em experimento com proteínas
10 recombinantes em bovinos. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente
11 significantes. A análise estatística foi realizada utilizando BioEstat version 5.0 (*Sociedade*
12 *Mamirauá*, Belém, Brasil).

13

14 RESULTADOS

15

16 A expressão dos genes *mb0143*, *pe5*, *pe13*, *tb10.4* e *esx-1* foi determinada por SDS-PAGE
17 e *Western blot*. No *Western blot*, todas as proteínas recombinantes foram reconhecidas pelo
18 anticorpo monoclonal anti-6x-histidina, confirmando, assim, a expressão dos genes. As massas
19 moleculares das proteínas recombinantes foram confirmadas por espectrometria de massas
20 (MALDI-TOF), revelando massa de 18,4, 20,4, 15,8, 17,3 e 13,9 kDa para as proteínas ESX-1,
21 Mb0143, PE5, PE13 e TB10.4, respectivamente.

22 Os animais sensibilizados por *M. bovis* utilizados neste experimento apresentaram elevada
23 resposta cutânea ao PPD *M. bovis* (mediana = 17,75 milímetros; intervalo interquartil = 16,8-
24 21,0). Todos foram considerados positivos ao teste intradérmico cervical comparativa,
25 interpretados com base na atual legislação brasileira (Brasil, 2006). Os bovinos não sensibilizados
26 apresentaram uma resposta fraca a PPD *M. bovis* (mediana = - 0,6 mm; intervalo interquartil = -
27 1,2 a 1,0) e todos foram negativos com base nos mesmos critérios de interpretação (Δ espessura da
28 dobra da pele ≥ 4 mm, 72 h após a inoculação). As respostas ao PPD *M. avium* mostraram um

1 aumento médio da espessura da dobra de pele de 0,4 mm (intervalo interquartil = -0,85 a 0,95) nos
2 animais não sensibilizados e de 3,5 mm (intervalo interquartil = 2,5 a 4,2) nos bovinos
3 sensibilizados. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os não sensibilizados, inoculados
4 com 0,16 ou 0,32 ml. Deste modo, estes animais foram analisados como um grupo único.

5 Diferenças significativas no aumento da dobra da pele entre bovinos sensibilizados por *M.*
6 *bovis* (n = 12) e não sensibilizados (n = 5) foram observadas apenas com as proteínas ESX-1 (p =
7 0,039, IC 95% -0,136 a 2,036), Mb0143 (p = 0,039, 95% CI 0,054-1,409) e PE5 (p = 0,030, IC
8 95% 0,727-2,781), quando 320 µg de proteína foi utilizada e a leitura realizada após 24 horas
9 (Figura 1).

10 A Tabela 1 mostra a sensibilidade e a especificidade dos antígenos ESX-1, Mb0143 e PE5
11 (320 µg / 24 h) no teste intradérmico em comparação com o PPD bovino para diferenciar entre
12 animais sensibilizados e não sensibilizados, com base em critério de interpretação ≥ 1 mm.

13 A Figura 2 mostra a comparação de tamanho das reações cutâneas para PPD *M. bovis*
14 (leitura após 72 horas) e ESX-1, Mb0143 e PE5 (leitura após 24 h). Diferenças significativas (p =
15 0,001) foram encontradas entre a espessura da dobra da pele produzida por PPD *M. bovis* em
16 relação às proteínas recombinantes.

17 Ao final do experimento todos os animais utilizados foram abatidos e lesões sugestivas de
18 tuberculose bovina não foram encontradas durante inspeção de carcaças em abatedouro oficial.

19

20 DISCUSSÃO

21

22 ESAT-6 e CFP10 são duas proteínas importantes para o diagnóstico da tuberculose bovina
23 por meio do teste intradérmico e IFN- γ (Vordermeier *et al* 2001, Aagaard *et al* 2003; Waters *et al.*,
24 2004; Aagaard *et al* 2006, Whelan *et al* 2010, Casal *et al* 2012). Apesar dos resultados
25 promissores obtidos através da utilização de ESAT-6 e combinações de ESAT-6 e CFP10 em
26 estudos anteriores (Pollock *et al* 2003, Whelan *et al* 2003, Whelan *et al* 2010, Casal *et al* 2012),
27 não há nenhuma evidência suficiente até o momento que apoie a substituição do PPD tradicional

1 por essas proteínas recombinantes, demonstrando que é necessário avaliar outras proteínas como
2 antígeno.

3 No presente estudo, as proteínas ESX-1, Mb0143, PE5, PE13 e TB10.4 foram avaliadas
4 pela primeira vez em teste intradérmico em bovinos. E apenas ESX-1, Mb0143 e PE5 (320 µg / 24
5 h) induziram diferenças significativas entre os bovinos sensibilizados e não sensibilizados.
6 Leituras realizadas após 48 e 72 horas não possibilitaram diferenciação entre animais
7 sensibilizados e não sensibilizados por *M. bovis*. Estes resultados indicam a possibilidade de
8 realizar o teste intradérmico em um tempo menor do que o praticado com PPD *M. bovis*,
9 considerando as recomendações do PNCBT (Brasil 2006). No entanto, os animais utilizados neste
10 experimento foram sensibilizados artificialmente com a cepa AN5 inativada de *M. bovis* e a
11 resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) pode ser diferente da resposta observada nos bovinos
12 infectados naturalmente, especialmente na fase crônica da infecção (Cockle *et al* 2006).

13 Em avaliações anteriores de proteínas recombinantes como antígenos em teste
14 intradérmico em bovinos, apenas animais infectados experimentalmente (Pollock *et al* 2003), ou
15 naturalmente infectados (Whelan *et al* 2010, Casal *et al* 2012) foram utilizados. No presente
16 estudo, foram utilizados pela primeira vez animais sensibilizados. Embora a realização do teste de
17 reação cutânea em bovinos infectados experimentalmente com *M. bovis* virulento seja o ideal, o
18 modelo utilizando a sensibilização com uma inoculação subcutânea da cepa inativada AN5 de *M.*
19 *bovis* foi adequada, uma vez que uma intensa resposta foi observada contra PPD de *M. bovis* em
20 todos os animais sensibilizados. Este método representa uma alternativa interessante para a
21 triagem de antígenos em testes de reação cutânea em bovinos.

22 No presente estudo, ESX-1 e PE5 exibiram níveis de sensibilidade de 83,3% (10/12), e
23 especificidade de 100% (5/5) e 80% (4/5), respectivamente, utilizando um ponto de corte ≥ 1 mm.
24 Com base nos mesmos critérios de interpretação, Whelan *et al* (2010) relataram um nível de
25 sensibilidade de 73,6% e especificidade de 100%, utilizando um coquetel de proteínas (ESAT-6,
26 CFP10, MPB70 e MPB83) em bovinos naturalmente infectados por *M. bovis*, enquanto que Jones
27 *et al* (2012) relataram 75% e 87,5% de sensibilidade, utilizando uma combinação de peptídeos no
28 coquetel ESAT-6/CFP10/Rv3615c e ESAT-6/CFP10/Rv3615c/Rv3020c respectivamente e 97,6%
29 de especificidade com ambos os coquetéis. Recentemente, Xin *et al* (2013) relataram uma
30 sensibilidade e especificidade de 94,02% e 95,2% respectivamente, usando o mesmo critério de

1 interpretação (ponto de corte ≥ 1 mm) e um coquetel de proteínas composto por CFP10/ESAT-
2 6/TB10.4.

3 Embora animais artificialmente sensibilizados tenham sido utilizados no presente estudo, e
4 como mencionado acima, a resposta imunológica possa ser diferente de bovinos infectados
5 naturalmente, os parâmetros de sensibilidade e especificidade observados para ESX-1 e PE5 foram
6 muito semelhantes aos observados em outros ensaios de reatividade cutânea com proteínas
7 recombinantes (Whelan *et al* 2010, Jones *et al* 2012). Estes resultados são muito interessantes,
8 uma vez que ESX-1 é uma proteína secretada, membro da família da ESAT-6 (*M. tuberculosis*
9 subfamília 9.9) (Jones *et al* 2012), e talvez, a sua inclusão em um coquetel de proteínas,
10 juntamente com ESAT-6 e CFP10 possa melhorar a sensibilidade e especificidade do teste
11 intradérmico para diagnóstico da tuberculose bovina. Por outro lado, PE5 é um membro da
12 família de PE que se encontra presente na parede celular micobacteriana, e é considerada,
13 juntamente com TB10.4 e PE13 um antígeno altamente específico em testes de IFN- γ (Aagaard *et*
14 *al* 2006). Embora Mb0143 também seja considerado um antígeno satisfatório em ensaios de IFN-
15 γ , para identificar bovinos infectados experimentalmente (Meikle *et al* 2009), os níveis de
16 sensibilidade apresentados no presente estudo para testes de reatividade cutânea em bovinos não
17 foram satisfatórios.

18 No presente estudo, a combinação de antígenos em um coquetel não favoreceu a
19 diferenciação entre bovinos sensibilizados e não sensibilizados, embora algumas proteínas
20 individualmente tenham permitido tal diferenciação. Uma explicação definitiva para estes
21 resultados não é conhecida. No entanto, a quantidade de cada proteína injetada na forma de
22 coquetel (32 ou 64 μg / proteína), em contraste com a quantidade utilizada individualmente (160
23 ou 320 μg / proteína) pode ter influenciado estes resultados. Além disso, Kalra *et al* (2010)
24 propuseram que a interação proteína-proteína e a sua imunocompatibilidade, em termos de
25 reconhecimento por diferentes alelos do complexo de imunocompatibilidade principal (MHC)
26 devem ser consideradas antes de combinar dois ou mais antígenos.

27 Resultados inconsistentes têm sido observados em diferentes estudos com relação à
28 quantidade de proteína necessária para produzir uma resposta de hipersensibilidade tardia
29 perceptível em bovinos. A utilização de 10 μg (Whelan *et al* 2010) até 400 μg (Pollock *et al* 2003)
30 de proteína recombinante têm sido relatadas. No presente estudo, a quantidade de proteína

1 avaliada (160 e 320 µg) foi baseada em uma avaliação anterior em *Cavia porcellus* e diferenças
2 significativas na espessura da pele entre sensibilizados e não sensibilizados por *M. bovis* foram
3 observadas apenas quando 320 µg de ESX-1, Mb0143 ou PE5 foram utilizados.

4 Apesar da diferença significativa entre a espessura da dobra de pele produzida pelo PPD *M.*
5 *bovis* em relação às proteínas recombinantes, foi possível diferenciar sensibilizados e não
6 sensibilizados com as proteínas ESX-1 e PE5, com níveis satisfatórios de sensibilidade e
7 especificidade. Diferenças significativas na magnitude das reações induzidas por PPD *M. bovis* e
8 proteínas recombinantes também têm sido relatadas em outros estudos (Pollock *et al* 2003,
9 Whelan *et al* 2010), e conseqüentemente, pontos de corte de apenas alguns milímetros, tem sido
10 utilizados para interpretar as reações por proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos (Pollock
11 *et al* 2003, Whelan *et al* 2010, Casal *et al* 2012, Jones *et al* 2012). No presente estudo, a mediana
12 do aumento da espessura da dobra da pele nas reações ao antígeno Mb0143 foi de apenas 0,5 mm
13 (intervalo interquartil = 0,25 a 1mm), enquanto que os valores médios foram de 1,2 mm (intervalo
14 interquartil = 0,87 e 1,82 mm) para ESX-1, e 1,95 mm (intervalo interquartil = 1,15 - 2,52 mm)
15 para PE5. Embora uma completa explicação para estes resultados não esteja clara, os componentes
16 não proteicos (lipídeos e carboidratos) da parede celular micobacteriana (Pollock *et al* 2003) e até
17 mesmo o solvente do PPD devem exercer uma grande influência sobre a discrepância entre as
18 reações. Uma alternativa possível para resolver este problema seria a utilização de um adjuvante
19 para aumentar a magnitude das respostas contra as proteínas recombinantes.

20 Em experimentos com proteínas recombinantes produzidas em *E. coli*, a contaminação por
21 endotoxinas deve ser considerada como um possível indutor de reações cutâneas inespecíficas.
22 Embora os níveis de endotoxina nas amostras de proteínas recombinantes utilizadas nesse estudo
23 não tenham sido quantificados, a influência desta toxina nas reações cutâneas observadas não foi
24 importante. A espessura da dobra de pele induzida pelas proteínas recombinantes ESX-1, Mb0143
25 e PE5 (24 h pós-injeção) em animais não sensibilizados não apresentaram diferenças
26 significativas, ao teste de Mann-Whitney, em relação às reações induzidas por salina.

27 Os resultados desta comparação sugerem que as reações observadas nos animais
28 sensibilizados são específicas para as proteínas recombinantes e não devido a endotoxinas ou outra
29 contaminação por proteínas de *E. coli*. Além disso, reações não específicas devidas à
30 sensibilização com micobactérias ambientais são também pouco prováveis, uma vez que, a reação

1 cutânea induzida por PPD *M. avium* nos animais não sensibilizados foi insignificante. As reações
2 entre os animais sensibilizados foram consistentes com os resultados de Almeida *et al* (2006)
3 (mediana = 6,15 mm, intervalo interquartil = 3,87 - 7,77 mm) em bovinos sensibilizados por *M.*
4 *bovis* AN5 inativado e não reativos para *M. avium* no teste de IFN- γ .

5 Outro ponto importante nos resultados obtidos no presente estudo está relacionado com o
6 momento em que as reações induzidas pelas proteínas recombinantes atingiram seu pico (24 h pós-
7 injeção). O aumento na espessura da dobra da pele induzida por PPD normalmente atinge um pico
8 após 72 h e tem sido observado que a proteína recombinante ESAT-6 também (Pollock *et al* 2003,
9 Whelan *et al* 2010). Isto não foi observado para qualquer das proteínas utilizadas no presente
10 estudo. Imunologicamente, uma resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) é uma reação
11 inflamatória local mediada por células T que se desenvolve durante 24-72 h e DTH em bovinos
12 com pico máximo em 24 h tem sido relatada (Hernández *et al* 2005). Portanto, não é possível
13 excluir a hipótese de que as reações observadas no presente estudo foram reações de
14 hipersensibilidade tardia. No entanto, uma confirmação incontestável apenas seria possível através
15 da realização da análise histológica dos locais de inoculação.

16 O estudo com bovinos sensibilizados experimentalmente com *M. bovis* inativado,
17 utilizados pela primeira vez nesse estudo, representou uma alternativa segura para estudos
18 relacionados a tuberculose bovina por empregar bacilo inativado e permitiram a triagem de
19 proteínas recombinantes com potencial para antígeno em teste intradérmico. Dentre as proteínas
20 recombinantes avaliadas como antígeno, ESX-1 e PE5 induziram reações cutâneas que permitiram
21 a diferenciação de bovinos sensibilizados artificialmente de não sensibilizados em teste
22 intradérmico. Recomendamos que as proteínas ESX-1 e PE5 sejam avaliadas em animais
23 naturalmente infectados em estudos futuros para verificar o desempenho das mesmas em bovinos
24 com diferentes estágios da tuberculose.

25

26 AGRADECIMENTOS

27 Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
28 Superior (CAPES), Embrapa Gado de Corte (CNPGC) e Conselho Nacional de Desenvolvimento
29 Científico e Tecnológico (CNPq).

1 ABSTRACT

2

3 The skin test with purified protein derivatives (PPDs) from *Mycobacterium bovis* has been used
4 for the diagnosis of bovine tuberculosis. However, due to the suboptimal specificity of this protein
5 mixture, improved tests based on defined specific antigens are needed. In the present study,
6 recombinant proteins from *M. bovis* were evaluated as antigens in the skin test. Among these
7 proteins, ESX-1, Mb0143, PE5, and PE13 are antigens tested for the first time in skin test on
8 cattle. Sensitized and non-sensitized cattle to the inactivated AN5 strain of *M. bovis* were
9 simultaneously injected with each recombinant protein, a cocktail with all recombinant proteins,
10 *M. bovis* PPDs, *M. avium* PPDs and saline. Only the proteins ESX-1, Mb0143 and PE5 were able
11 to differentiate sensitized and non-sensitized cattle when 320 µg of protein was used and the
12 reading done 24 hours post-injection. ESX-1 and PE5 exhibited a sensitivity level of 83.33% and
13 specificity of 100% and 80% respectively. The results of the present study suggest that the
14 recombinant proteins have potential to be assessed as antigens in skin tests in cattle.

15

16 REFERÊNCIAS

17

18 Aagaard C, M Govaerts, LM Okkels, P Andersen, JM Pollock. 2003. Genomic approach to
19 identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *J Clin Microbiol* 41, 3719-
20 3728.

21

22 Aagaard C, M Govaerts, V Meikle, AJ Vallecillo, JA Gutierrez-Pabello, F Suarez-Guemes, J
23 McNair, A Cataldi, C Espitia, P Andersen, JM Pollock. 2006. Optimizing antigen cocktails
24 for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine
25 tuberculosis: ESAT-6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *J Clin*
26 *Microbiol* 44, 4326-4335.

27

- 1 Aagaard C, M Govaerts, V Meikle, JA Gutiérrez-Pabello, J McNair, P Andersen, F Suarez-
2 Guemes, J Pollock, C Espitia, A Cataldi. 2010. Detection of bovine tuberculosis in herds with
3 different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-
4 6/CFP10 specificity. *Prev Vet Med* 96, 161-169.
5
- 6 Almeida RFC, CR Madruga, CO Soares, MC Fernandes, NM Carvalho, KSG Jorge, ALAR
7 Osório. 2006. Specific immune response of cattle to experimental sensitization by inactivated
8 *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*. *Braz J Vet Res* 26, 195-200.
9
- 10 Álvarez J, A Perez, B Javier, S Marqués, A Grau, JL Saez, O Mínguez, L Juan, L Domínguez.
11 2012. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in
12 naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet Microbiol* 155, 38-43.
13
- 14 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária -
15 Departamento de Saúde Animal. 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da
16 Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 188.
17
- 18 Casal C, J Bezos, A Díez-Guerrier, J Álvarez, B Romero, L Juan, S Rodriguez-Campos, M
19 Vordermeier, A Whelan, RG Hewinson, A Mateos, L Domínguez, A Aranaz. 2012.
20 Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP10 and Rv-3615c in the intradermal test
21 and the interferon- γ assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Prev Vet Med* 105, 149-154.
22
- 23 Coad M, D Clifford, SG Rhodes, RG Hewinson, HM Vordermeier, AO Whelan. 2010. Repeat
24 tuberculin skin testing leads to desensitization in naturally infected tuberculous cattle which is
25 associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Vet Res* 41,
26 14.
27
- 28 Cockle PJ, SV Gordon, RG Hewinson, HM Vordermeier. 2006. Field evaluation of a novel
29 differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clin Vac*
30 *Immunol* 13, 1119-1124.
31

- 1 De La Rua-Domenech R, AT Goodchild, HM Vordermeier, RG Hewinson, KH Christiansen, RS
2 Clifton-Hadley. 2006. *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the
3 tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 81,
4 190-210.
5
- 6 Farias TA, FR Araújo, ALAR Osório, KSG Jorge, CAN Ramos, IIF Souza, A Azambuja, CO
7 Soares, MR Silva, AO Pellegrin. 2012. ELISA based on recombinant MPB70 and P27 for
8 detection of antibodies against *Mycobacterium bovis*. *Rev Pat Trop* 41, 155-162.
9
- 10 Flores-Villalva S, F Suárez-Güemes, C Espitia, AO Whelan, HM Vordermeier, JA Gutiérrez-
11 Pabello. 2012. Tuberculin skin test specificity is modified by the use of a protein cocktail
12 containing ESAT-6 and CFP10 in *Mycobacterium bovis* naturally infected cattle. *Clin Vac*
13 *Immunol* 19, 797-803.
14
- 15 Good M, A Duignan. 2011. Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in
16 bovine TB eradication. *Vet Med Int*. doi:10.4061/2011/410470.
17
- 18 Harboe M, T Oettinger, HG Wiker, I Rosenkrands, P Andersen. 1996. Evidence for occurrence of
19 the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for
20 its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 64, 16–22.
21
- 22 Hernández A, JA Yager, BN Wilkie, KE Leslie, BA Mallard. 2005. Evaluation of bovine
23 cutaneous delayed-type hypersensitivity (DTH) to various test antigens and a mitogen using
24 several adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 104, 45-58.
25
- 26 Jones GJ, RG Hewinson, HM Vordermeier. 2010. Screening of predicted secreted antigens from
27 *Mycobacterium bovis* identifies potential novel differential diagnostic reagents. *Clin Vac*
28 *Immunol* 17, 1344-1348.
29
- 30 Jones GJ, A Whelan, D Clifford, M Coad, HM Vordermeier. 2012. Improved skin test for
31 differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. *Clin*
32 *Vac Immunol* 19, 620-622.

- 1 Kalra M, GK Khuller, JA Sheikh, I Verma. 2010. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis*
2 specific RD antigens for delayed type hypersensitivity responses in guinea pig. *Indian J. Exp*
3 *Biol* 48, 117-123.
4
- 5 McNair J, MD Welsh, JM Pollock. 2007. The immunology of bovine tuberculosis and progression
6 toward improved disease control strategies. *Vaccine* 25, 5504-5511.
7
- 8 Meikle V, A Alito, AS Llera, A Gioffré, A Peralta, BM Buddle, A Cataldi. 2009. Identification of
9 novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions. *Clin Vac*
10 *Immunol* 16, 1352-1359.
11
- 12 Michel AL, B Müller, PD van Helden. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface:
13 A problem, or not? *Vet Microbiol* 140, 371-381.
14
- 15 Mustafa AS, YA Skeiky, R Al-Attayah, MR Alderson, RG Hewinson, HM Vordermeier. 2006.
16 Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Mycobacterium bovis* BCG-
17 vaccinated and *M. bovis*-infected cattle. *Infect Immun* 74, 4566-4572.
18
- 19 Monaghan ML, ML Doherty, JD Collins, JF Kazda, PJ Quinn. 1994. The tuberculin test. *Vet*
20 *Microbiol* 40, 111-124.
21
- 22 Pollock JM, J McNair, H Bassett, JP Cassidy, E Costello, H Aggerbeck, I Rosenkrands, P
23 Andersen. 2003. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify
24 tuberculosis-infected cattle. *J Clin Microbiol* 41, 1856-1860.
25
- 26 Pollock JM, MD Welsh, J McNair. 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new
27 strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 37-43.
28
- 29 Rhodes SG, D Gavier-Widen, BM Buddle, AO Whelan, M Singh, RG Hewinson, HM
30 Vordermeier. 2000. Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 68,
31 2573-2578.
32

- 1 Rothel JS, SL Jones, LA Corner, JC Cox, PR Wood. 1992. The gamma-interferon assay for
2 diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-
3 interferon in whole blood culture. *Aust Vet J* 69, 1-4.
4
- 5 Schiller I, HM Vordermeier, WR Waters, AO Whelan, M Coad, E Gormley, BM Buddle, M
6 Palmer, T Thacker, J McNair, M Welsh, RG Hewinson, B Oesch. 2010. Bovine tuberculosis:
7 Effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses. *Vet Immunol*
8 *Immunopathol* 136, 1-11.
9
- 10 Sidders B, C Pirson, PJ Hogarth, RG Hewinson, NG Stoker, HM Vordermeier, K Ewer. 2008.
11 Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies RV3615c as a useful differential
12 diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Immun* 76, 3932-3939.
13
- 14 Souza, IIF, ESP Melo, CAN Ramos, TA Farias, ALAR Osório, KSG Jorge, CES Vidal, AS Silva,
15 MR Silva, AO Pellegrin, FR Araújo. 2012. Screening of recombinant proteins as antigens in
16 indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *Springler Plus*, 1, 1-6.
17
- 18 Thom M, JH Morgan, JC Hope, B Villarreal-Ramos, M Martin, CJ Howard. 2004. The effect of
19 repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following
20 experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 399-412.
21
- 22 Vordermeier HM, A Whelan, PJ Cockle, L Farrant, N Palmer, RG Hewinson. 2001. Use of
23 synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP10 for differential diagnosis of
24 bovine tuberculosis in cattle. *Clin Diag Lab Immunol* 8, 571-578.
25
- 26 Xin T, H Jia, J Ding, P Li, H Yang, S Hou, W Yuan, X Guo, H Wang, Q Liang, M Li, B Wang, H
27 Zhua. 2013. Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a
28 double-blind field test in cattle. *Clin Vaccine Immunol* 20, 482-490.
29
- 30 Waters WR, BJ Nonnecke, MV Palmer, S Robbe-Austermann, JP Bannantine, JR Stabel, DL
31 Whipple, JB Payeur, DM Estes, JE Pitzer, FC Minion. 2004. Use of recombinant ESAT-
32 6:CFP10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and

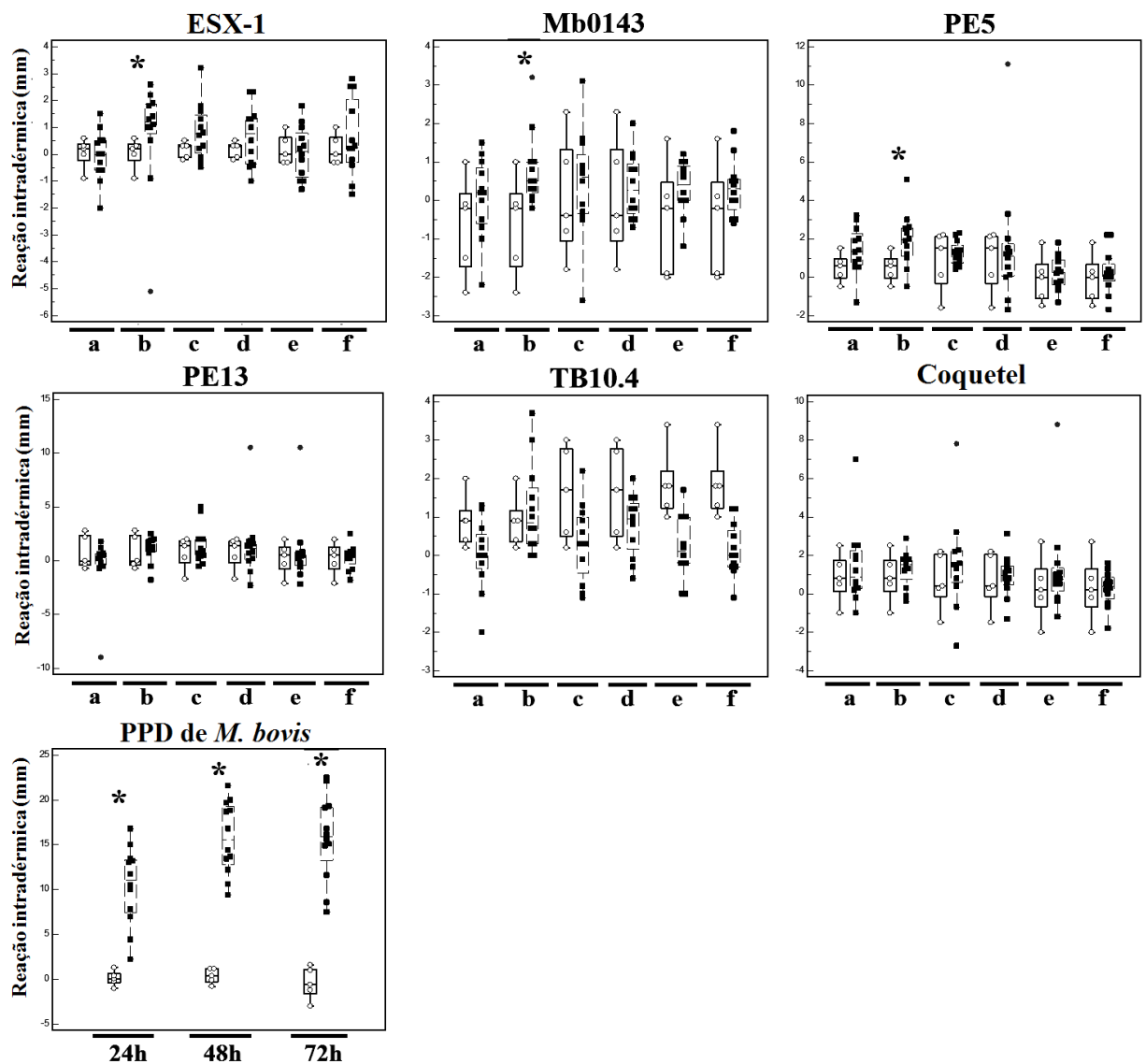
- 1 by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Diag Lab*
2 *Immunol* 11, 729-735.
- 3
- 4 Whelan AO, JC Hope, CJ Howard, D Clifford, RG Hewinson, HM Vordermeier. 2003.
5 Modulation of the bovine delayed-type hypersensitivity responses to defined mycobacterial
6 antigens by a synthetic bacterial lipopeptide. *Infect Immun* 71, 6420-6425.
- 7
- 8 Whelan AO, M Coad, ZA Peck, D Clifford, RG Hewinson, HM Vordermeier. 2004. Influence of
9 skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet*
10 *Rec* 155, 204-206.
- 11
- 12 Whelan AO, D Clifford, B Upadhyay, EL Breadon, J McNair, GR Hewinson, MH Vordermeier.
13 2010. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from
14 vaccinate animals. *J Clin Microbiol* 48, 3176-3181.
- 15
- 16 Wiker HG, KP Lyashchenko, AM Aksoy, KA Lightbody, JM Pollock, SV Komissarenko, SO
17 Bobrovnik, IN Kolesnikova, LO Mykhalsky, ML Gennaro, M Harboe. 1998. Immunochemical
18 characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infec Immun*
19 66, 1445-1452.
- 20
- 21 Wobeser G. 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: An updated history. *Can Vet J* 50,
22 1169-1176.
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32

1 Tabela 1. Sensibilidade e especificidade a um ponto de corte específico para as
 2 proteínas recombinantes (ESX-1, Mb0143, PE5) e PPD em teste intradérmico
 3 em bovinos.
 4

Antígeno	Sensibilidade	Especificidade	Ponto de corte (mm)
ESX-1	83,33%	100%	≥ 1
Mb0143	33,33%	80%	≥ 1
PE5	83,33%	80%	≥ 1
PPD bovino*	100%	100%	$\geq 4,0^{**}$

5 *PPD *M. bovis* utilizado em teste intradérmico cervical comparativo

6 **Ponto de corte padrão PNCBT-Brasil.
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Figura 1. Resposta cutânea as proteínas recombinantes de *M. bovis*, utilizadas individualmente ou em coquetel e PPD de *M. bovis*; resposta mensurada em animais sensibilizados por *M. bovis* (■) e não sensibilizados (○); as letras representam as quantidades de proteína inoculadas e o tempo de leitura: a) 160 µg/ 24 h; b) 320 µg/ 24 h; c) 160 µg/ 48 h; d) 320 µg/ 48 h; e) 160 µg/ 72 h; f) 320 µg/ 72 h; (●) representam *outliers*; (*) indicam diferença significativa entre bovinos sensibilizados e não sensibilizados por *M. bovis*.

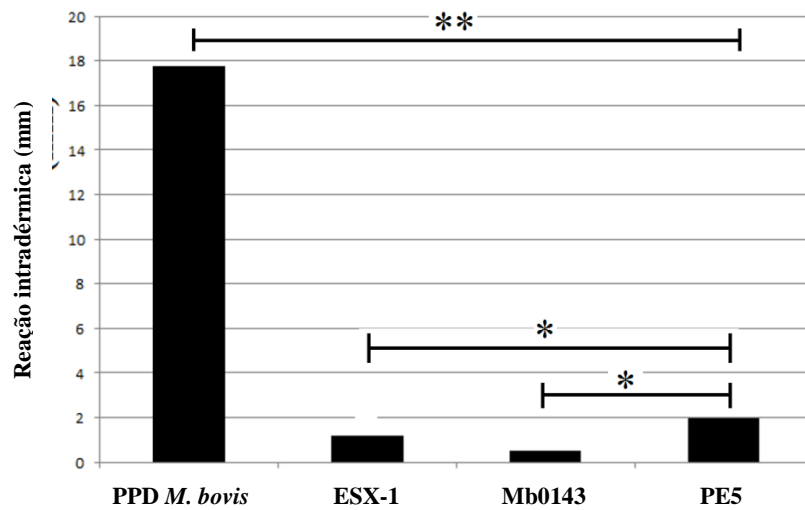


Figura 2. Comparação da mediana das respostas cutâneas induzidas por PPD bovino, ESX-1, Mb0143 e PE5 recombinantes em 12 bovinos sensibilizados por *M. bovis* AN5 inativado. A diferença estatística entre os antígenos foi determinada pelo teste de Mann-Whitney (*P <0,05; **P <0,001).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18