

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETERMINAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE PROTEÍNAS DE
Mycobacterium bovis ISOLADOS DE BOVINOS NATURALMENTE
INFECTADOS NO ESTADO DE GOIÁS**

Cinthya Marques Fortes Fleury
Orientadora: Dr^a Ana Paula Junqueira Kipnis

GOIÂNIA
2010



**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações
Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTC/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a): Cinthya Marques Fortes Fleury			
CPF: 597.943.211-68		E-mail: cinthyaflortes@gmail.com	
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo Empregativo do autor: Bolsista			
Agência de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior			
Sigla: CAPES	País: Brasil	UF: Goiânia-GO	CNPJ: 00869304/0001-08
Título: Determinação da imunogenicidade de proteínas de <i>Mycobacterium bovis</i> isolados de bovinos naturalmente infectados no estado de Goiás			
Palavras-chave: Eletroforese, diagnóstico, tuberculose bovina, proteínas			
Título em outra língua: Immunogenic characterization of <i>Mycobacterium bovis</i> samples isolated from naturally infected bovines from Goiás State - Brazil			
Palavras-chave em outra língua: electrophoresis, diagnosis, bovine tuberculosis, proteins			
Área de concentração: Sanidade, Higiene e Tecnologia de Alimentos			
Data defesa: (08/02/2010)			
Programa de Pós-Graduação: Em Ciência Animal			
Orientador(a): Ana Paula Junqueira Kipnis E-mail: apkipnis@gmail.com			
Co-orientador(a): André Kipnis E-mail: akipnis@qmp.ufg.br			
Co-orientador(a): Maria Clorinda Soares Fioravanti E-mail: clorinda@vet.ufg.br			

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização? ☒ total ☐ parcial

☐ Capítulos. Especifique: -

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do(s) autor(a)

Goiânia, 02 de outubro de 2011

CINTHYA MARQUES FORTES FLEURY

**DETERMINAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE PROTEÍNAS DE
Mycobacterium bovis ISOLADOS DE BOVINOS NATURALMENTE
INFECTADOS**

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária da Universidade
Federal de Goiás.

Área de Concentração:
Sanidade, Higiene e
Tecnologia de Alimentos

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Junqueira Kipnis – IPTSP/ UFG

Comitê de Orientação:

Prof.^oDr. André Kipnis – IPTSP/ UFG

Prof.^a Dr.^a Maria Clorinda Soares Fioravanti – EV/UFG

GOIÂNIA
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

F618d Fleury, Cinthya Marques Fortes.
Determinação da imunogenicidade de proteínas de
Mycobacterium bovis isolados de bovinos naturalmente infectados
no Estado de Goiás [manuscrito] / Cinthya Marques Fortes Fleury.
- 2010.
xv, 50 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Junqueira Kipnis; Co-
orientadores: Prof. Dr. André Kipnis, Prof^ª. Dr^ª. Maria Clorinda
Fioravante.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária e Zootecnia, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas, tabela e quadro.

Anexo.

1. Bovinos – Tuberculose. 2. Proteínas – Imunogenicidade. 3.
Western Blot . I. Título.

CDU:636.2:616.24-002

CINTHYA MARQUES FORTES FLEURY

Dissertação defendida e aprovada em 08/02/2010, pela Banca
aminadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Ana Paula Juriquena Kipnis – IPTSP/UFG
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto – USP/SP



Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho – EMVEV/UFG

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Paulo, pelo seu amor, companheirismo, incentivo e paciência. Às minhas “estrelinhas brilhosas”, Beatriz e Laura por perdoarem a minha ausência. Aos meus pais por terem me conduzido ao caminho que chegasse até aqui.

A vocês, minha família querida, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de aprimoramento intelectual e crescimento espiritual permitindo-me vivenciar experiências tão enriquecedoras.

À prof^a Dr^a Ana Paula Junqueira Kipnis, minha orientadora, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho. Tenho muito a agradecer-lá. “Obrigada por ter me aceitado mesmo sendo “de campo”, sem qualquer familiarização com as técnicas desenvolvidas em seu laboratório e ter me ensinado, mais do que as técnicas, a busca pelo conhecimento de forma crítica, analítica e diversificada. Hoje enxergo a ciência de outra forma, pois você me fez refletir em cada etapa da realização deste trabalho, se preocupando não só com a qualidade do conhecimento que é transmitido, mas com a formação dos alunos que orienta. Com certeza você é um exemplo profissional. Muito obrigada pela oportunidade”.

Aos professores da escola de veterinária, com os quais convivi durante esse período, por me proporcionarem novas formas de conhecimento.

Aos colegas do Laboratório de imunopatologia por compartilharem comigo seus conhecimentos, contribuindo em vários momentos para a realização deste trabalho: Mayara, Michelle, Eduardo, Adeliâne, Aline, Fernando, Bruna, Loanda, e especialmente o Bruno pela dedicação do seu tempo ao meu experimento. “Obrigada por tudo que fizeram por mim”.

Aos colegas do laboratório de microbiologia: Camila, Yves, Esther e Lorena; pela convivência.

À Joyce por ter sido sempre prestativa quando precisei da sua ajuda. “Obrigada”.

À Jenny Ferrales, pela ajuda no laboratório, pela companhia nas fazendas e pela amizade que fizemos nesse pouco tempo de convivência. “Obrigada”.

Ao Hermínio por compartilhar seus conhecimentos científicos em prol da realização deste trabalho. “Meus agradecimentos”.

À prof^a Dr^a Miriam, do IPTSP pela colaboração.

À Dr^a Ediane, por plantar a “semente” da minha pesquisa. “Obrigada”.

Ao Franklin por sua amizade e disposição em me acompanhar por estas “estradas de Goiás”.

Ao prof. Dr. José Soares por me abrir as portas do seu laboratório possibilitando a realização de uma parte tão importante da minha pesquisa. “Obrigada”.

À Viviane Cambuí pela simpatia com que me recebeu na USP e por compartilhar seu tempo e seus conhecimentos comigo. “Obrigada”.

Ao prof. Dr. André Kipnis, pela atenção dispensada ao meu experimento e pelas sugestões que possibilitaram o aprimoramento das atividades realizadas nesta pesquisa. “Muito obrigada”.

À prof^a Dr^a Maria Clorinda, pela força e pelo apoio que recebi antes e depois de ingressar na pós-graduação. “Você muitas vezes foi mais do que professora. Obrigada por tudo”.

Ao meu irmão Rogério, e à minha irmã Patrícia, quantas lutas..., obrigada por compartilharem comigo as minhas dificuldades e as minhas realizações. “Amo vocês”.

EPÍGRAFE

*“Recebei como obrigação sagrada o
dever de ajudar os animais na escala progressiva de
suas posições variadas no planeta. Estendei até eles a
vossa concepção de solidariedade e o vosso coração
compreenderá mais profundamente os grandes
segredos da evolução, entendendo os maravilhosos
e doces mistérios da vida”.*

Emmanuel

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Tuberculose bovina: Aspectos gerais.....	2
2.2. Agente etiológico.....	3
2.2.1. Parede celular.....	4
2.3. Proteínas antigênicas de <i>M. bovis</i>	7
2.4. Aspectos epidemiológicos.....	9
2.5. Aspectos relacionados à patogenicia.....	12
2.6. Considerações sobre resposta imune.....	14
2.7. Diagnóstico	16
2.7.1. Isolamento do agente	16
2.7.2. Métodos Imunológicos	17
2.7.3. Métodos moleculares	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Local de realização do estudo	24
4.2. Origem das amostras de soro	24
4.3. Isolamento e cultivo do agente.....	24
4.4. Caracterização molecular.....	25
4.4.1. Extração do DNA.....	25
4.4.2. Spoligotyping.....	26
4.5. Purificação do antígeno.....	27
4.5. SDS-PAGE.....	27
4.6. Western Blot	28
4.7. Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema das principais diferenças entre <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> (H37Rv). As linhas azuis e vermelhas representam a parede celular do bacilo humano e bovino respectivamente.....	6
Figura 2	Principais fatores de risco para tuberculose em animais, rebanhos regiões/países	11
Figura 3	Documentação radiográfica do padrão de hibridização dos quatro isolados de <i>Mycobacterium bovis</i>	31
Figura 4	Gel de poliacrilamida da eletroforese, corado com azul de comassie, evidenciando a separação das proteínas totais de <i>Mycobacterium bovis</i>	32
Figura 5	Imunoblot representativo das amostras de soro dos animais PPD-positivos	34
Figura 6	Imunoblot representativo das amostras de animais PPD negativos	34
Figura 7	Imunoblot das amostras de soro dos animais provenientes de região livre da tuberculose dos EUA	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa (%) das bandas expressas pelos animais PPD positivos e PPD negativos evidenciadas no imunoblot	35
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Síntese dos modelos experimentais que reproduzem a infecção por <i>M. bovis</i> em rebanhos bovinos	13
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Arabinogalactana
Ag85	Antígeno 85
AM	Arabinomanana
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo <i>Calmette-Guérin</i>
CFP10	Proteína de filtrado de cultura de 10kDa
CMI	Imunidade mediada por células
CTAB	Brometo de cetilmetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleosídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ESAT-6	Antígeno de secreção primária de 6kDa
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomanana
MAPA	Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MAPIA	Imunoensaio de multi antígenos impressos
MPB64	Proteína de <i>M. bovis</i> de 24kDa
MPB70	Proteína de <i>M. bovis</i> de 22kDa
MPB83	Proteína de <i>M. bovis</i> de 26kDa
NK	Natural Killer
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão Fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDIM	fenolftiocerol-dimicocerosato
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto

PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	Derivado protéico purificado
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T $\gamma\delta$	Linfócito T gama-delta
TACO	Proteína contendo Triptofano-aspartato
TCD4	Linfócito T com conjunto de diferenciação celular 4
TCD8	Linfócito T com conjunto de diferenciação celular 8
TDM	Dimicolato de trealose
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Th	Linfócito T auxiliar
TLCK	Tosil-L-fenilalanina clorofenilcetona
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TWC1	Linfócito T com marcador de superfície WC1

RESUMO

Com o objetivo de contribuir com pesquisas em novos testes de diagnóstico para a tuberculose bovina, foi realizado um estudo baseado na identificação de proteínas imunogênicas de *Mycobacterium bovis* isolado de bovinos infectados à campo. Para isso, proteínas totais extraídas de *M. bovis* caracterizado geneticamente por *Spoligotyping*, foram inicialmente fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida e posteriormente identificados por Western Blot utilizando soro de animais reagentes e não reagentes ao teste de diagnóstico intradérmico com derivado protéico purificado (PPD). A imunogenicidade das proteínas foi avaliada conforme o perfil do peso molecular das bandas expressadas. Foram testadas um total de 93 amostras de soro de animais PPD positivos e negativos provenientes do estado de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e região livre de tuberculose dos Estados Unidos. Pela técnica de Western Blot pode-se identificar a proteína de 26kDa como a mais imunogênica dentre os animais PPD-positivos testados.

Palavras-chave: eletroforese, diagnóstico, tuberculose bovina, proteínas.

ABSTRACT

The purpose of this work is to contribute to the research in new diagnostic tests for bovine tuberculosis. To this end a study was performed to identify *Mycobacterium bovis* immunogenic proteins isolated from bovines in the field. Total extracted protein, were initially fractioned by electrophoresis in a polyacrylamide gel and then identified by Western Blotting, using serum from reagent and non-reagent animals to the purified protein derivate (PPD) intradermal diagnostic test. Protein immunogenicity was assessed according to the molecular weight profile of the positive bands. 93 serum samples were tested from PPD positive and PPD negative animals from Goiás, Distrito Federal and Minas Gerais, as well as tuberculosis free regions of the USA. By means of the Western Blotting technique it was possible to identify the 26kDa protein as the most immunogenic among the positive PPD tested animals.

Keywords: electrophoresis, diagnosis, bovine tuberculosis, proteins.

1 INTRODUÇÃO

Apesar de ser uma das enfermidades mais antigas da civilização, a tuberculose nos bovinos assume ainda hoje um importante papel na saúde pública principalmente devido ao seu caráter zoonótico.

O *Mycobacterium bovis*, agente etiológico da tuberculose em rebanhos, é responsável por perdas econômicas consideráveis em várias partes do mundo, vinculadas principalmente à restrição ao comércio de produtos agropecuários e ao custo dispensado a implementação de programas de erradicação da doença.

A estratégia atual de controle da enfermidade baseado no teste preconizado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) tem falhado em identificar todos os bovinos doentes e medidas adicionais são necessárias para melhorar a detecção da tuberculose nos rebanhos e prevenir que os animais sadios de se tornem expostos ao agente.

Muitos esforços estão sendo feitos no sentido de se encontrar novas formas de diagnóstico e apesar de estudos mostrarem uma relação inversa entre a imunidade celular e a humoral durante a progressão da doença, testes de diagnóstico baseado em anticorpos têm sido amplamente pesquisados, principalmente por auxiliar na detecção de animais PPD negativos, anérgicos devido ao estágio da doença ou ainda para elucidar o status sanitário da fazenda onde o teste com PPD foi inconclusivo.

Segundo LYASHCHENKO et al (1998), ensaios sorológicos poderiam ser úteis ao diagnóstico da tuberculose por serem geralmente simples, rápidos e de baixo custo, mas para que sejam eficazes, seria necessária a utilização de antígenos estritamente relacionados ao agente etiológico afim de melhorar a especificidade do ensaio.

Visando contribuir para o controle da doença nos rebanhos, a presente dissertação apresenta a identificação de proteínas imunogênicas de *Mycobacterium bovis* isolados no estado de Goiás, com potencial de serem utilizadas em pesquisas de diagnóstico sorológico da tuberculose nos bovinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tuberculose bovina: aspectos gerais

A tuberculose bovina é uma doença bacteriana crônica causada pelo *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) considerada em muitos países a principal doença infecciosa entre rebanhos e animais selvagens e que pelo fato de ser transmissível ao homem, faz com que a enfermidade seja importante na saúde pública (ABRAHÃO, 1999; OIE, 2009).

Historicamente, a correlação entre a doença nos bovinos e humanos começou a ser estudada quando Carmichael em 1810 observou relação entre o desenvolvimento de escrófula (linfadenopatia) em crianças e a ingestão de leite de vaca, concluindo de forma equivocada que a doença seria desencadeada por fatores nutricionais. Em 1865, Villeman conseguiu provar a transmissibilidade da doença inoculando coelhos com material humano infectado. Finalmente em 1882, Robert Koch descobriu o agente causador da infecção corando-o com a fuccina-anilina e cultivando-o em meio de cultura. Somente em 1897, Theobald Smith nos EUA, descreveu a diferenciação entre o bacilo bovino, humano e aviário. Por volta de 1900 eram tantas as dúvidas com relação à doença e seu aspecto zoonótico que foi criada na Inglaterra a *Royal Comission on Tuberculosis* formada por especialistas que desenvolveram um extenso programa de pesquisa nessa área (PRITCHARD, 1988).

KANTOR & RITACO, (1994), afirmaram que a tuberculose bovina seria a principal doença de rebanho na América do Sul, sendo que a maior prevalência seria encontrada no Brasil e Argentina. Atualmente no Brasil, a prevalência da doença não está bem caracterizada, mas dados oficiais de 1988 a 1998, indicam 1,3% do rebanho como contaminado (BRASIL, 2006).

Deve-se considerar que rebanhos infectados além de infectar o homem e outros rebanhos, servem de fonte de contaminação também para animais silvestres, podendo atuar como reservatórios acarretando sérios problemas epidemiológicos (POLLOCK et al, 2005). Cita-se como hospedeiros de

manutenção os texugos no Reino Unido e Irlanda, gambás e possivelmente os furões na Nova Zelândia além dos bisões e dos alces no Canadá (CFSPH, 2009).

Atualmente, a doença ameaça um terço da população humana mundial que se encontra infectada sendo que a magnitude do problema foi alterada principalmente nos anos 90 devido à disseminação da AIDS e o crescimento populacional. Estima-se que serão infectadas mais de 1 bilhão de pessoas até 2020, sendo que destas, 70 milhões virão à óbito (WHO, 2009). Uma vez que a real incidência de *Mycobacterium bovis* em humanos permanece subestimada, visto que a distinção entre as espécies de *Mycobacterium* não é sistematicamente realizada, torna-se essencial o avanço de pesquisas visando a erradicação da tuberculose bovina em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento que apresentam deficiências nas medidas de controle e/ou prevenção (HUMBLET et al., 2009).

No Brasil atualmente, encontra-se em vigor o Programa de controle e erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) desde 2001, que tem por objetivo diminuir o impacto negativo dessa zoonose e promover uma maior competitividade da pecuária nacional (MAPA, 2009).

Assim, muitos esforços são gerados na busca pelo desenvolvimento de técnicas seguras que permitam um controle eficaz da doença em bovinos em todo o mundo, quer seja através de pesquisas na criação de vacinas para rebanhos ou por meio de métodos de diagnósticos efetivos.

2.2 Agente etiológico

A tuberculose em bovinos tem como agente etiológico um bacilo Gram-positivo, o *Mycobacterium bovis* pertencente à família *Mycobacteriaceae* e à ordem *Actinomycetales* e tem a capacidade de infectar uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem. É parte integrante do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* o qual fazem parte também o *M. tuberculosis*, agente causador da vasta maioria dos casos de tuberculose humana; o *M. africanum*, encontrado em humanos na África; o *M. microti*, reponsável pela doença em roedores e o

M. cannetii, que é raramente encontrado, mas causa doença em humanos (GRANGES & YATES, 1994; COLE, 2002).

Os bacilos da espécie *M. bovis* são curtos, intracelulares facultativos, aeróbicos, imóveis, não esporulados nem flagelados e apresentam-se na forma de bastonete reto ou encurvado de 0,3 a 0,6 micrômetros de tamanho. São álcool-ácido resistentes (BAAR), ou seja, uma vez corados pela fuccina, não se descoram na presença de uma mistura de álcool e ácido clorídrico; numa técnica denominada de Ziel-Neelsen. Esta característica pode ser também observada em bactérias do gênero *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* (ROXO, 1997).

Como propriedades microbiológicas, as colônias de *M. bovis*, assim como as de *M. tuberculosis*, são menos rugosas do que as de *M. bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) que tendem a ser mais elevadas e compactas (COLE, 2002). Crescem em meio a base de ovos contendo piruvato de sódio e ausência de glicerol (Stonebrink), à temperatura de 37°C por 60 dias (AMBROSIO et al., 2008).

O *M. bovis* é moderadamente resistente ao calor, permanecendo viável em pastos e esterco por até dois anos, em água por até um ano e por até 10 meses em produtos de origem animal contaminados. O bacilo também apresenta resistência à desinfetantes compostos por amônia quaternária e clohexidine. Entretanto, é sensível à exposição solar direta em ambiente seco, combatido pela pasteurização do leite e por produtos como hipoclorito de sódio, desde que observada a concentração correta (ROXO, 1996).

2.2.1 Parede celular

Os componentes da parede celular das micobactérias têm sido amplamente estudados uma vez que estão diretamente relacionados com a imunogenicidade do bacilo.

O bacilo da tuberculose possui um envelope celular altamente impermeável apresentando um elevado conteúdo lipídico (50-60%) o que confere um caráter hidrofóbico e o torna refratário à atividade enzimática. Apresenta componentes como o ácido micólico responsável pela característica de ácido-resistência, glicolípideos como a molécula inflamatória lipoarabinomanana (LAM),

policetídeos como fenolftiocerol que com ácido micocerosato formam o fator de virulência ftiocerol-dimicocerosato (PDIM) e polissacarídeos como a arabinogalactana (AG) e arabinomanana (AM) (COLE, 2002; LEE et al., 2004).

Estima-se que 25% do peso das micobactérias corresponda a lipídeos ou glicolipídeos e destes, 40% refere-se às moléculas de ácidos micólicos ligadas à trealose. A trealose é um antígeno presente em várias moléculas micobacterianas e quando é acetilado forma o dimicolato de trealose (TDM) ou fator corda (trealose 6,6-dimicolato), responsável pela forma agregada semelhante a cordões na qual esses microorganismos se apresentam no meio de cultivo. O fator corda é altamente imunogênico e favorece a inflamação crônica ocasionando formação granulomatosa nos pulmões (GOROCICA et al, 2005).

Recentemente, HOFFMAN et al., (2008) investigando a parede celular de *M. bovis* BCG (Bacilo de *Calmette* e *Guérin*) através de criomicroscopia eletrônica, demonstraram a existência de uma dupla camada lipídica envolvendo a membrana celular externa, contestando a crença de que as micobactérias possuam uma única camada externa formada por ácidos lipídicos covalentemente ligados conforme citado por LEE et al, (2004).

A parede celular das micobactérias patogênicas apresenta também uma grande variação em sua composição macromolecular e proteica, podendo refletir uma pressão seletiva das estruturas que a compõe. GARNIER, et al., (2003) comparando entre o bacilo tuberculoso humano e bovino, citam que o maior grau de variação entre eles está nos genes que codificam as proteínas de parede celular e as secretadas, cita-se como exemplo, aqueles que codificam as lipoproteínas de membrana como o *LppO*, *LppT* e *LpqG* presentes em *M. tuberculosis* e o *LpqR* e o *LpqA* (apresentado como cópia duplicada) presentes em *M. bovis*. Diferenças também são vistas nos genes que codificam a síntese e o transporte de policetídeos e complexos lipídicos da parede celular que induzem patogenia no hospedeiro, como os genes *MmpSL6* e *MmpL13* presentes em *M. bovis*, e os genes *MmpL9* e *MmpL1* presentes em *M. tuberculosis*. Pesquisando genes que codificam a expressão de proteínas antigênicas de parede celular, REHREN et al (2007) encontraram baixa expressão de genes das famílias PE/PPE em *M. bovis* (somente três genes) comparados aos 18 genes identificados no bacilo humano. Genes destas famílias, como por exemplo, o

2.3 Proteínas antigênicas de *M. bovis*

Durante o processo de infecção, tanto *M. tuberculosis* quanto *M. bovis* estão expostos a diferentes condições de *stress* que incluem acidificação do pH da vesícula endocítica, exposição à reativos de oxigênio e restrição de nutrientes. Esses fatores fazem com que as micobactérias expressem proteínas que favoreçam a sua sobrevivência dentro do hospedeiro (GOLBY et al 2007).

Muitos estudos têm se focado na expressão das proteínas antigênicas de *M. bovis* na tentativa de identificar antígenos candidatos a serem utilizados em testes de diagnóstico ou em vacinas de rebanho (FIFIS et al, 1994; VORDERMEIER et al., 2001; POLLOCK et al, 2003).

CATALDI et al, (1994), estudaram o padrão de reconhecimento de antígenos por anticorpos do soro de 62 animais tuberculosos (confirmados por cultura) provenientes de abatedouro, visando identificar proteínas em diferentes fases da doença. Para isso, foi avaliado o extrato celular total e o sobrenadante de cultura de *M. bovis* por Western blot. O resultado deste trabalho, indicou a proteína de 28kDa como sendo o principal antígeno encontrado em estágios avançados da doença.

Duas proteínas amplamente estudadas são a ESAT-6 (do inglês *early secretory antigenic target*) de 6kDa e a CFP10 (do inglês *culture filtrate protein*) de 10kDa, que fazem parte de uma grande família de proteínas secretadas pelas micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* e que estão amplamente relacionadas com a patogenia da doença (RENSHAW et al., 2005). Os mesmos autores, pesquisando fatores de virulência da tuberculose, relataram um possível papel de sinalização das proteínas CFP10 e ESAT-6 quando ligadas à superfície celular, o que levaria a uma modulação do comportamento da célula do hospedeiro. Ambas as proteínas são codificadas pela região RD1 do genoma do *M. tuberculosis* e *M. bovis*, região esta ausente em cepas de *M. bovis* BCG (indicando que a deleção deste locus contribuiu para a atenuação da virulência do bacilo) (HARBOE et al., 1996). A vacina BCG é utilizada em humanos e foi obtida a partir de cepas de *M. bovis* atenuadas após centenas de passagens seriadas em laboratório, tornando-as avirulentas (SKEIKY & SADOFF, 2006).

VORDERMEIER et al., (2001) utilizaram uma mistura de peptídeos sintéticos de ESAT-6 e CFP10 para discriminar animais experimentalmente infectados e animais vacinados com BCG, os resultados indicaram sensibilidade de 77% no ensaio com animais tuberculosos e especificidade de 100% no grupo dos animais BCG-vacinados e não tuberculosos.

Pesquisas citam as proteínas ESAT-6 e CFP10, como as principais indutoras de Interferon-gama (IFN- γ) no estágio inicial da infecção pelo *M. bovis* tanto em bovinos naturalmente como em experimentalmente infectados (POLLOCK & ANDERSEN, 1997a), por isso essas duas proteínas são particularmente estudadas em ensaios de diagnóstico baseado na dosagem dessa citocina.

Várias pesquisas têm sido realizadas visando também à caracterização de dois antígenos homólogos citados como os maiores antígenos expressos por *M. bovis*, que são o MPB70 e o MPB83 (FIFIS et al, 1991, HARBOE et al, 1998, WIKER et al, 1998, McNAIR et al, 2001; WIKER et al, 2009).

O MPB70 é uma proteína solúvel secretada de 22kDa que foi inicialmente identificada como sendo altamente expressa pela cepa *M. bovis* BCG. Estudos com filtrado de cultura de BCG mostraram a indução de reação de hipersensibilidade tardia em porquinhos da Índia imunizados com algumas cepas, mas pouca reatividade era vista com a utilização de outras cepas de BCG, esta e outras observações formaram a base da divisão das cepas de *M. bovis* BCG em dois principais grupos; aqueles que expressam altos níveis de MPB70 como, por exemplo, as cepas BCG Tokyo, Moreau, Rússia e Suécia, e aqueles que expressam em baixos níveis como BCG Pasteur e *Beijing* (WIKER et al, 2009).

O MPB83 é um antígeno glicosilado, lipoproteico e de massa molecular de 26kDa, codificado pelo gene *mpb83* e associado à parede celular da micobactéria. Sua importância tem sido demonstrada por estudos que visam sua utilização em métodos de diagnóstico, visto que a resposta de anticorpos para esse antígeno foi observada precocemente no curso da infecção por *M. bovis* (McNAIR et al, 2001, O'LOAN et al, 1994).

Tanto o MPB70 quanto o MPB83 são altamente expressos por cepas virulentas de *M. bovis*, mas a expressão destes antígenos em *M. tuberculosis* é reduzida. SAIID-SALIM et al.,(2006) demonstraram que mutações no gene

Rv0444c, que codifica o regulador anti-sigma K (*sigK* é um gene regula positivamente a expressão de MPB70 e MPB83), seria o responsável pelos altos níveis de expressão dessas proteínas em *M. bovis*, quando comparadas aos diferentes membros do complexo *M. tuberculosis*.

Alguns estudos também são realizados com a proteína MPB64, um antígeno secretado de massa molecular de 24kDa que foi citado como sendo restrito à bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* sendo expresso em *M. bovis*, mas não em todas as cepas de *M. bovis* BCG (FIFIS et al, 1991; BUDDLE et al, 1999). Sua expressão segue o mesmo padrão do MPB70, no entanto, o MPB64 é altamente expresso em *M. tuberculosis* (WIKER, 2009).

O complexo antígeno 85 (Ag85) é membro da família micolil-transferase e compreendem um grupo de proteínas secretadas (85A, 85B, e 85C) que são altamente homólogas, de massa molecular de 30-32 kDa presentes em *M. bovis* e *M. bovis* BCG. O complexo Ag85 tem sido testado na forma de vacina de DNA visando impulsionar o efeito protetor da vacina BCG em rebanhos (NOL, et al., 2009).

FIFIS et al, (1994) avaliaram durante 36 meses a resposta celular dos antígenos de 12, 19, 22, 24, 25, 30, 32, 39 e 70 kDa expressos por *M. bovis* mostrando uma alteração no perfil de imunodominância dos mesmos com o progresso da infecção.

2.4 Aspectos epidemiológicos

A tuberculose bovina possui distribuição mundial concentrando-se principalmente nos países em desenvolvimento e em criações intensivas como em bovinos leiteiros (ROXO, 1996).

Existem várias vias nas quais os rebanhos podem se tornar infectados com *M. bovis*, entretanto a inalação é a principal rota de infecção, sendo que pastos, água e fômites contaminados são consideradas vias secundárias à aerógena (POLLOCK & NEILL, 2002). Ocasionalmente bezerros podem adquirir a doença através da ingestão de leite de vacas com mastite tuberculosa (NEILL et al., 1994). Humanos podem adquirir a infecção por *M. bovis* através da ingestão

ou inalação dos microorganismos. Lesões extra-pulmonares podem ocorrer associadas ao consumo de leite contaminado e infecções aéreas são encontradas principalmente em trabalhadores rurais e da indústria de carne e frigoríficos (THOEN et al., 2006).

O *Mycobacterium bovis* é também patogênico para vários animais domésticos e silvestres. Dentre os animais domésticos pode-se citar alguns como os cães, gatos e suínos e entre os animais selvagens os elefantes, os macacos, os gambás, os cervos, os javalis, os leões e as lhamas. Atualmente tem sido ressaltada a importância dos animais silvestres como reservatório da doença uma vez que estes possibilitam a persistência e a disseminação da tuberculose bovina em todo o mundo, reintroduzindo a doença em rebanhos livres da infecção. A contaminação do ambiente pelo *M. bovis* também é significativa na transmissão da doença dos animais silvestres para os rebanhos. (ABRAHÃO, 1999).

Segundo HUMBLET et al., (2009) existem alguns fatores de risco que influenciam a cadeia epidemiológica da tuberculose bovina, e estes podem ser divididos em três níveis de classificação: 1. Animal: Fatores relacionados à idade, raça, condição corporal, status imune, resistência ou susceptibilidade genética, transmissão vertical e auto-contaminação; 2. Rebanho: Relacionados ao histórico de surto de tuberculose, tamanho do rebanho e manejo, que inclui o sistema de criação, tratamento de dejetos, suplementação alimentar (importante na rota de transmissão oral), ausência de testes de diagnóstico, introdução de novos animais no rebanho ou por aquisições ou movimentação, taxa de abate, contato com animais domésticos ou silvestres e persistência do agente no ambiente influenciado principalmente por fatores climáticos; 3. Região/países: Relativos à antecedentes e prevalência da doença em bovinos numa determinada região, comércio internacional e movimentação de gado entre países vizinhos, migração internacional de pessoas (principalmente vindas de países em que há consumo de leite não pasteurizado) e animais silvestres. O conjunto desses fatores é ilustrado na Figura 2.

Um fator a ser considerado no processo epidemiológico é o período de latência, uma vez que no estágio inicial da infecção pode haver uma excreção regular do bacilo através do muco nasal, até que a excreção se torne intermitente, embora a dose infectante possa variar significativamente entre os animais

principalmente devido ao seu *status* imunológico. Além disso, reatores ao teste intradérmico deveriam sempre ser considerados como foco potencial de disseminação da doença, até que se prove o contrário (MENZIES & NEILL, 2000).

A despeito dos fatores citados, muitos países desenvolvidos têm realizado controle epidemiológico efetivo com medidas como teste de tuberculinização intradérmica e abate de animais reatores, bem como pasteurização do leite (HUMBLET et al, 2009). Cita-se como países livres da tuberculose bovina a Austrália, Finlândia, Áustria, Dinamarca, Canadá e Luxemburgo; programas de erradicação estão em andamento em países como Nova Zelândia, México, Estados Unidos e alguns países da Europa Central e América do Sul (CFSPH, 2009).

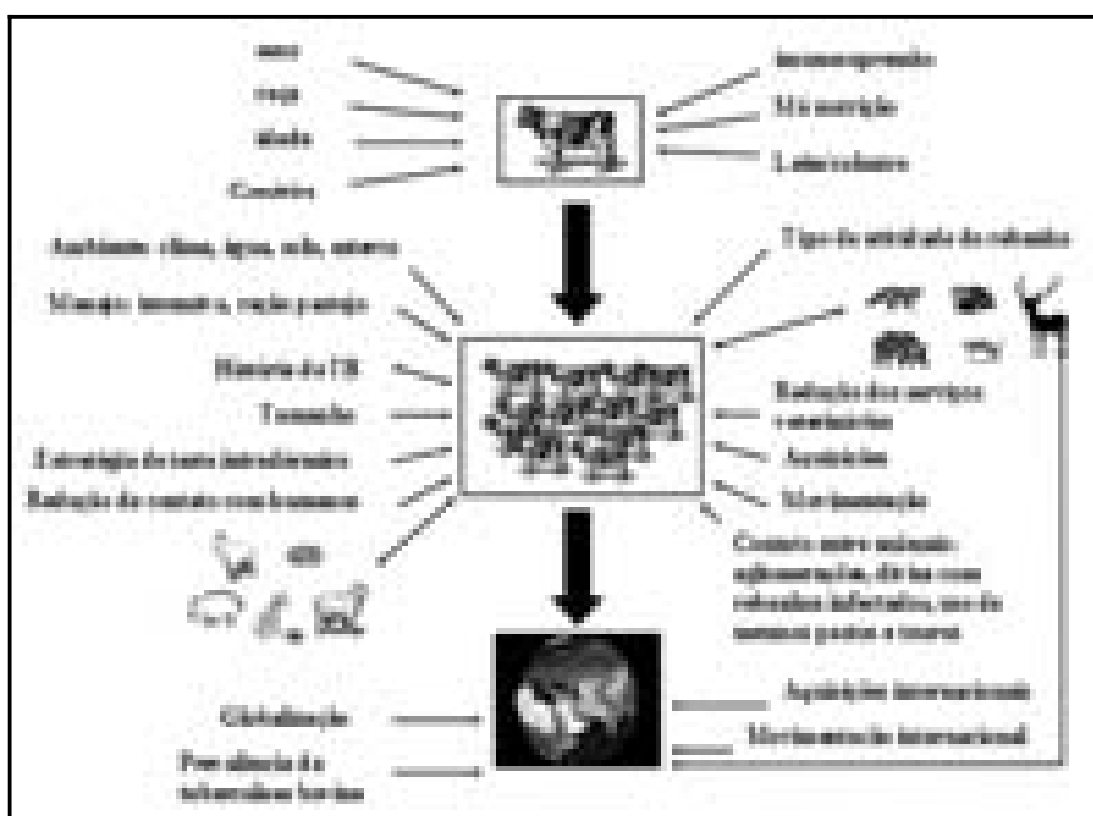


FIGURA 2 – Principais fatores de risco para tuberculose em animais, rebanhos e regiões/países. Adaptado de HUMBLET (2009).

2.5 Aspectos relacionados à patogenicidade

A patogenicidade da tuberculose é o produto da interação entre a virulência da bactéria e a resposta imune do hospedeiro que são duas variáveis distintas e independentes (COOPER, 2008).

Por ser primariamente uma infecção do sistema respiratório, alterações patológicas nos bovinos ocorrem principalmente nos pulmões e associadas à linfonodos, mas o trato respiratório superior também está envolvido em alguns casos (POLLOCK et al, 2006). CASSIDY et al, (1998) estudando bezerros experimentalmente infectados pela via intranasal, encontrou graves lesões nessa região após 14 dias de infecção.

POLLOCK et al (2006) em uma metanálise, refere-se às principais rotas de infecção em rebanhos, mostrando pesquisas baseadas na inoculação experimental do agente via subcutânea ou intravenosa, entretanto, apesar dessas rotas serem altamente eficazes para o processo infeccioso, a patologia verificada não era condizente com aquelas induzidas à campo. Da mesma forma ocorria com experimentos de inoculação de altas doses por via oral. Isso mostra que tanto a dose como a via de infecção têm influência significativa na localização das lesões observadas. Tais observações do autor foram resumidas conforme mostrado no Quadro 1.

Quando a doença se dá pela via respiratória além dos pulmões, os linfonodos regionais também são afetados, há formação de nódulos caseosos com expectoração de material bacilífero. Se o animal afetado estiver imunossuprimido geralmente ocorre a disseminação do agente pelo parênquima pulmonar ou pela via hematogênica promovendo metástase em outros órgãos. Assim ocorre no foco inicial um infiltrado celular e uma necrose de caseificação fazendo com que a lesão se torne circunscrita o que pode evoluir para resolução ou calcificação. À presença do nódulo calcificado e/ou a linfadenite regional, dá-se o nome de complexo primário. Nestes locais os bacilos podem permanecer por período indeterminado, se multiplicando ou sob a forma de “dormência” (ROXO, 1996).

As lesões de aspecto caseoso são mais observadas nos linfonodos da cabeça, pescoço, mediastínicos e mesentéricos, intestinos, pulmões, baço, pleura

e peritônio. Os sinais e sintomas podem demorar meses para se desenvolver em rebanhos. A infecção pode se tornar latente durante anos e se reativar durante algum período de stress ou em idade avançada (CFSPH, 2009)

QUADRO 1. Síntese dos modelos experimentais que reproduzem a infecção por *M. bovis* em rebanhos bovinos.

Via de infecção	Dose desafio (cfu)	Patologia observada	Eficácia da via de infecção	observações
Intravenosa	10^7	Tuberculose sistêmica generalizada	Alta	Patologia induzida atípica à de campo
Subcutânea	$10^6 / 10^8$	Tuberculose sistêmica generalizada	Alta	Patologia massiva, atípica à de campo
Oral	10^7	Tuberculose sistêmica generalizada	Alta	Patologia intestinal e abdominal atípica
Intranasal	$10^2/10^4/10^6$	Trato respiratório superior e inferior; e associado aos tecidos	Boa em altas doses, não infecciosa em baixa dose	Patologia similar aos casos de campo com tendência ao trato respiratório superior
Intratraqueal	$10^2/10^5$	Tuberculose generalizada em alta dose, na maioria restrita ao trato respiratório superior	100% de infecção em alta dose	Patologia induzida por baixa dose, similar à de campo
Aerosol	$10^3/10^5$	Trato respiratório superior e inferior. Sistêmica para 10^5	alta	Baixas doses induzem patologia similar aos casos de campo, mas em altas doses, patologia atípica
Contato 1	Animais infectados $10^4/10^7$	Trato respiratório superior e inferior	Variável, 33% e 66% tornaram-se infectados pelas doses de 10^4 e 10^7 respectivamente	Patologia similar à de campo
Contato 2	Animais positivos ao teste intradérmico	Trato respiratório superior e inferior	Baixa, menos de 50% dos contatos desenvolveram lesões	Patologia similar à de campo

Fonte: Adaptado de POLLOCK et al., (2006)

2.6 Considerações sobre a resposta imune

A infecção do hospedeiro pelo *Mycobacterium bovis* é iniciada após a inalação de partículas (aerosol) contendo o bacilo. Uma vez no pulmão, os bacilos são fagocitados por macrófagos residentes e alveolares. A internalização da bactéria ocorre após a interação do agente com o hospedeiro por meio de diferentes receptores como os TLRs (do inglês *toll like receptors*), receptores de manose, receptores de complemento e receptores Fc seguida de invaginação e formação do fagossomo (PIETERS, 2008). Macrófagos apropriadamente ativados transferem a bactéria para o lisossoma onde serão destruídas. Entretanto, alguns bacilos apresentam características peculiares de infecção como capacidade de inibir a fusão fagolisossômica; cita-se o recrutamento ativo da molécula de proteína contendo triptofano aspartato (TACO) e a inibição da acidificação fagossomal, através do impedimento da bomba de próton dependente da adenosina trifosfato vacuolar (V-H⁺ ATPase) (AÍNSA et al, 2001; KAUFFMAN, 2001).

Como parte da resposta imune antimicobacteriana, o desenvolvimento da imunidade mediada por células (CMI) baseada em linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) promove a liberação de citocinas como a interleucina 12 (IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), essenciais na ativação das vias microbidas dos macrófagos para a produção de óxido nítrico e reativos intermediários de nitrogênio (RNI) para efetiva destruição do bacilo (FLYNN & CHAN, 2001; WELSH et al, 2005).

Outras células podem estar envolvidas na resposta inicial frente ao desafio micobacteriano, como as *Natural Killers* (NK) produtoras de IFN- γ , que podem ser citolíticas para as células-alvo infectadas, já o papel dos neutrófilos na tuberculose bovina ainda não está muito bem caracterizado (POLLOCK & NEILL, 2002).

É geralmente aceito que a CMI seja essencial no controle de patógenos intracelulares como o *M. bovis* (FLYNN & CHAN, 2001; COOPER, 2009).

Nas infecções tuberculosas existe uma complexa interação entre patógeno e hospedeiro o que dificulta o estudo de rebanhos infectados à campo,

por essa razão a maioria das pesquisas baseadas em resposta imune se utilizam de modelos de infecção experimental (CASSIDY et al, 1998; BUDDLE et al, 2005; WELSH et al, 2005).

Infecções experimentais têm demonstrado que todas as principais subclasses de células T ($\gamma\delta$, CD4+ e CD8+) estão envolvidas no progresso da doença. O papel da subpopulação de células TCD4+ durante a infecção é principalmente definida como produtoras de IFN- γ , citocina essencial para a ativação de macrófagos e controle do agente. A subpopulação TCD8+ também têm se mostrado produtoras dessa citocina a qualquer momento no curso da infecção (SERBINA et al, 1999). Um importante papel desempenhado pelas células TCD8+ é a capacidade em atuar como linfócito T citotóxico envolvido não só na lise de células-alvo específicas, mas também na liberação de moléculas como a granulicina uma proteína responsável por alterar diretamente a integridade da membrana do bacilo levando-o à morte (STENGER et al, 1998).

Em ruminantes as células T gama-delta ($T\gamma\delta$) compreendem a maior porção da população de células mononucleares de sangue periférico e estão envolvidas no estágio inicial da doença bem como no início da formação das lesões relacionadas à contenção bacteriana (POLLOCK et al 2006). Em bezerros estas células correspondem a 70% dos linfócitos circulantes e em animais adultos diminuem para 10 a 15%. A maioria dessas células $T\gamma\delta$ circulantes nos ruminantes expressam uma molécula de superfície de 215kDa denominada WC1 que não é expressa nem por células humanas nem por modelos murinos. Alguns estudos sugerem que as células TWC1+ estejam envolvidas no recrutamento celular e desenvolvimento de granuloma tuberculoso nos bovinos (POLLOCK et al, 2001)

Embora a resposta mediada por células tenha o potencial de controlar a infecção, a interação macrófago-hospedeiro e o resultado do balanço de citocinas e quimiocinas produzidas podem levar a infecção à diferentes progressões. O agente pode ser morto e eliminado do hospedeiro, pode permanecer na forma latente, pode promover uma doença ativa, ou ser reativado da forma latente em algum momento no futuro (WELSH, et al, 2005).

Estudos mostram que no estágio inicial da infecção micobacteriana a CMI dominante é a do tipo Th1 produzindo IFN γ e IL-2, com a progressão da

doença pode haver uma alteração dessa dominância de Th1 para Th2, com diminuição da resposta celular e o desenvolvimento da resposta humoral (CATALDI et al., 1994; POLLOCK & NEIL, 2002).

WELSH et al, (2005) analisando a produção de citocinas por clones de células TCD4+, citam que alterações no balanço entre a resposta celular e humoral estão diretamente relacionadas ao progresso da doença. Com isso, afirmam que a manutenção da resposta Th1 (IL2+/IFN γ +) está claramente associada com a capacidade de conter a infecção, enquanto que a evolução desta, rumo a um perfil imune tipo Th0 (resposta de anticorpos isotipo IgG1 na presença de resposta IFN γ +) esteja associada com o aumento da patogenia. Segundo esses autores, não é sabido se a tendência de Th1 para Th0 represente uma forma de abrandar a resposta inflamatória do hospedeiro, a fim de limitar danos teciduais ou se é uma estimulação de citocinas imunossupressoras por antígenos. Na tuberculose humana, a comutação da resposta de anticorpos IgM para IgG1, antígeno-específica, tem sido considerada um evento crítico na progressão da doença e o aumento dos níveis de IgG1 pode ser indicativo de tendência da alteração da resposta Th0 para Th2 (HUSSAIN et al., 2000).

Outros estudos sugerem que anticorpos para vários componentes imunogênicos de *M. bovis* possam estar presentes em diferentes estágios da infecção (O'LOAN et al., 1994).

O estudo da resposta imune humoral é particularmente importante em certas circunstâncias como, por exemplo, em países com deficiência de programas efetivos de controle da doença, onde esta progride a estágios avançados e a resposta de anticorpos é mais prevalente (POLLOCK et al, 2001).

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Isolamento do agente

O isolamento do agente é considerado padrão-ouro como forma de diagnóstico da tuberculose e é realizado a partir de lesões oriundas de animais doentes, porém apresenta como fator limitante o tempo requerido para seu crescimento em meio de cultura, além da necessidade de caracterização

bioquímica, o que requer um longo período até a conclusão definitiva do diagnóstico.

Um fator a ser considerado é que as técnicas utilizadas no isolamento revelam baixa sensibilidade, levando a perdas consideráveis tanto nos processos de descontaminação como na conservação das amostras enviadas ao laboratório. As lesões devem ser mantidas à uma temperatura de 4° a 6°C e cultivadas entre 24 e 48 h após a colheita, caso isso não seja possível, devem ser congeladas a uma temperatura de -20°C, até serem processadas (CORNER, 1994).

O método de visualização das micobactérias (método bacteriológico) através da coloração de Ziehl-Nielsen, apesar de barato e rápido não permite distinguir entre os membros da família *Mycobacteriaceae* e outros organismos como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* que também apresentam as mesmas características tintoriais (PRITCHARD, 1988).

2.7.2 Métodos imunológicos

A) Reação de hipersensibilidade tardia

A OIE referencia como método de diagnóstico da tuberculose bovina, o teste de tuberculina intradérmico, baseado na imunidade mediada por células com a apresentação de uma reação de hipersensibilidade tardia, utilizando um derivado protéico purificado (PPD). Entretanto, o PPD apresenta baixa especificidade, pois é composto por uma complexa mistura de proteínas de *Mycobacterium bovis* e nem sempre permite discriminar entre rebanhos infectados por *M. bovis* daqueles sensibilizados por micobactérias ambientais, visto que os componentes da amostra compartilham proteínas antigênicas comum à espécies patogênicas e não patogênicas (POLLOCK, 2003). Este é o principal motivo do surgimento de reações inespecíficas, que tornam o teste pouco acurado (FIFIS, et al 1991). Além disso, pelo fato de se basear em reação celular, qualquer alteração no balanço imunológico do animal poderia afetar a performance do diagnóstico.

Tal diagnóstico é realizado por meio de medição do aumento da espessura da prega cutânea 72 h após a inoculação intradérmica do PPD. Fatores como imunossupressão, infecções recentes, estágios finais de gestação e

desnutrição podem ocasionar resultados falso-negativos. Além disso, animais em estado avançado da infecção podem apresentar-se anérgicos ao PPD, assim como animais recém avaliados podem apresentar uma menor capacidade de responder a novos testes de hipersensibilidade tardia, apresentando um quadro de desensibilização (ROXO, 1996).

Os testes tuberculínicos podem ser simples, quando se utiliza apenas a tuberculina bovina (teste realizado na prega caudal ou na região cervical) ou podem ser comparativos, quando se utiliza as tuberculinas bovina e aviária de forma simultânea. A tuberculinização comparada deve ser usada como teste confirmatório, visando minimizar diagnósticos falso-positivos por reações desencadeadas por micobactérias ambientais como as do complexo MAC (Complexo *Mycobacterium avium*) (BRASIL, 2006). No teste intradérmico comparado, para que o animal possa ser classificado como reator positivo, a resposta ao PPD bovino precisa ser maior do que a resposta paralela ao PPD aviário definida por escala (POLLOCK et al, 2003).

Para avaliar a utilização de antígenos específicos para o teste de hipersensibilidade tardia, POLLOCK et al, (2003) investigaram a utilização antígeno ESAT-6 recombinante como teste de diagnóstico intradérmico devido ao fato deste ser altamente específico para infecções tuberculosas, seus resultados apresentaram uma especificidade de 100%, mas uma sensibilidade de 82% comparada com a do PPD que foi de 86%, sugerindo que mais investigações são necessárias visando aumentar a sensibilidade do teste com ESAT-6 somente ou combinado com outros antígenos.

B) Dosagem de IFN γ

Este ensaio realizado *in vitro* é baseado na análise da resposta celular específica contra os antígenos micobacterianos, onde os níveis de IFN- γ produzidos por linfócitos de animais infectados podem ser quantificados através de ensaio imunoenzimático (RANGEN et al, 2009). O Kit comercial para realização desse exame é patenteado com o nome o de BOVIGAM[®] e é realizado em duas etapas. Na primeira, uma amostra de sangue total heparinizado é incubada durante 12 horas com PPD bovino ou aviário para estimular a produção

de IFN- γ pelos linfócitos dos animais infectados. Após a incubação, uma alíquota do plasma retirado após centrifugação da amostra, é aquecida e utilizada na segunda etapa que é a realização do ensaio imunoenzimático. Desde 1988, O BOVIGAM[®] tem sido testado em vários países como Austrália, Brasil, Irlanda, Itália, Nova Zelândia, Espanha e Estados Unidos apresentando sensibilidade entre 81,8% e 100% em tuberculose bovina confirmada por cultura e especificidade entre 94% e 100% (WOOD & JONES, 2001).

Pela sua condição de induzir a produção de IFN- γ , ESAT-6 foi utilizada na forma recombinante para testar a viabilidade do teste de dosagem de IFN- γ , mostrando seu potencial em discriminar rebanhos infectados daqueles sensibilizados por micobactérias ambientais, uma vez que esse antígeno está ausente em mais de 90% das micobactérias ambientais (POLLOCK & ANDERSEN, 1997a, 1997b). Outros pesquisadores também se beneficiaram do uso de proteínas específicas, como a ESAT-6 e a CFP10 com o objetivo de melhorar a especificidade desse tipo de teste. Os resultados demonstraram que a utilização de antígenos definidos tornou o teste baseado na dosagem do IFN- γ mais específico, principalmente quando comparado àqueles que utilizam o PPD (POLLOCK et al, 2000; BUDDLE et al, 2001; VORDERMEIER et al, 2001; BUDDLE et al., 2003).

BUDDLE et al, (2009) sugerem que esse método de diagnóstico com antígenos definidos, como os acima citados, deva ser utilizado juntamente com o teste intradérmico para aumentar o índice de detecção de rebanhos realmente infectados por *M. bovis* e reduzir o abate desnecessário de animais falso-positivos.

C) Testes baseado em anticorpos

Pesquisas de diagnóstico baseados na resposta imune celular são avaliadas como descrito anteriormente. Entretanto, alguns animais podem apresentar uma resposta humoral na ausência da CMI particularmente quando a carga bacteriana é alta, por isso o teste sorológico de ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) tem sido descrito para detecção da tuberculose nos bovinos. Mas apesar de confiável para a detecção de anticorpos circulantes contra o bacilo, o teste de ELISA tem sido considerado de baixa especificidade, o que demonstra a necessidade de se identificar novas proteínas de *M. bovis*

visando o aumento da eficiência do ensaio sorológico (McNAIR et al, 2001). Neste sentido, muitos pesquisadores têm focado seus estudos na utilização de proteínas imunogênicas com o potencial de serem utilizadas num teste de ELISA.

AMADORI et al, (2002), testaram a especificidade do ELISA indireto utilizando um painel de nove antígenos recombinantes de micobactérias (ESAT6, proteína de 14kDa, MPT63, MPB70, MPB64, MPT51, MPB59, MTSA10 e MPB83). As amostras de soro testadas foram provenientes de quatro grupos de animais: 1. bovinos naturalmente expostos à *M. avium* e experimentalmente infectados por *M. bovis*; 2. provenientes de rebanhos livres da doença; 3. naturalmente expostos ao *M. bovis* e reatores ao teste de IFN- γ ; 4. infectados por *M. avium* subsp *paratuberculosis*. Resultados do ELISA mostrou que 57% dos animais naturalmente infectados (terceiro grupo) apresentaram reação para no mínimo uma das proteínas testadas. Melhor especificidade foi encontrada no grupo 4 (com paratuberculose) que apresentaram níveis consideráveis de anticorpos contra a proteína MPB59, um componente do complexo Ag85 de micobactérias e que é citado em *M. paratuberculosis*.

Recentemente o laboratório Chembio Diagnostic Systems® (NY-EUA) lançou no mercado o kit VetTB STAT-PAK®, um rápido ensaio imunocromatográfico (também conhecido como tecnologia de fluxo lateral) para detectar anticorpos do tipo, IgM e IgG contra antígenos micobacterianos em várias espécies de hospedeiros tais como bovinos, elefantes, macacos, camelos, lhamas e outros. Esse kit utiliza uma mistura de antígenos de *M. tuberculosis* e *M. bovis* e um sistema de detecção de sinal baseado em grânulos de látex azul. O dispositivo descartável é pronto para uso e composto por um cassete plástico contendo uma tira de uma membrana de nitrocelulose impregnada com antígenos e laminada com várias almofadas de fibra de vidro e celulose. 30 μ L de soro e três gotas de diluente da amostra são adicionados, sequencialmente, ao bloco da amostra. Como a amostra teste diluída migra pelo bloco conjugado, as partículas de látex conjugadas ao antígeno se ligam aos anticorpos, se presentes, criando assim um complexo imunológico colorido. Impulsionado por forças capilares esse fluxo cruza lateralmente a membrana de nitrocelulose impregnada com antígenos específicos e se liga ao antígeno imobilizado produzindo uma banda (faixa) azul visível na janela do teste. Na ausência de anticorpos específicos nenhuma banda

é visualizada na janela do teste. O líquido então continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma faixa azul semelhante na área de controle do dispositivo independente da presença de anticorpos específicos na amostra testada, demonstrando que os imunoreagentes estão funcionando perfeitamente. Os resultados são visualizados em 20 minutos e qualquer banda visível na área do teste é considerado positivo.

WATERS et al, (2006), testaram a eficiência do teste citado, para a detecção precoce da doença em bezerros de seis meses de idade experimentalmente infectados. Uma fraca resposta foi detectada três semanas após serem desafiados pela via intranasal (IgM-específica). Utilizando o teste após 6 semanas do desafio, foi verificada maior intensidade da cor da banda no dispositivo. O kit também mostrou resultado positivo em cinco de seis animais, após cinco semanas de inoculação intratraqueal, e em todos os seis animais após 16 semanas do desafio. Para os animais desafiados pela via intratonsilar o teste não se mostrou eficiente.

Outro teste baseado em anticorpos é o MAPIA (*Multi-antigen Print immunoassay*), que consiste num diagnóstico sorológico baseado também em uma mistura de antígenos. No MAPIA, uma máquina imprime, através de microaeralização, antígenos específicos horizontalmente numa membrana de nitrocelulose, após a impressão a membrana é cortada em tiras perpendiculares às bandas de antígenos. Essas tiras são incubadas com amostras de soro teste e um conjugado anti-IgG bovino. A ligação de anticorpos é então detectada pelo desenvolvimento de um padrão cromógeno (LYASHCHENKO et al, 2000; WATERS et al, 2006).

2.7.3 Métodos moleculares

A) Spoligotyping (do inglês *Spacer Oligonucleotide typing*)

É uma técnica que detecta polimorfismos de DNA encontrados dentro de regiões de repetição direta (DR) presente somente em bactérias do Complexo *M. tuberculosis*. O locus DR consiste de múltiplas sequências repetidas de 36pb (pares de base) intercaladas por espaços de sequência não repetitivas. As cepas variam em número de DR e na presença ou ausência dos espaços particulares

podendo ser agrupadas nos chamados espoligotipos (KAMERBEEK et al, 1997, RODRÍGUEZ et al, 2009).

Esse método detecta justamente a presença ou a ausência desses espaçadores do locus DR do genoma do *Mycobacterium bovis*. Esses espaços são amplificados por PCR e detectados pela hibridização do produto da PCR marcado com biotina, com uma membrana de *nylon* contendo oligonucleotídeos derivados de sequências espaçadoras conhecidas ligadas anteriormente à membrana. Após a hibridização, a membrana é incubada com streptavidina-peroxidase que reage com a biotina marcada nos produtos da PCR. O resultado dessa hibridização é verificado por quimioluminescência, uma vez que a peroxidase catalisa a reação resultando na presença de luz que pode ser detectada por filme de raio x (ARANAZ et al., 1996).

O *Spoligotyping* permite a detecção, a identificação e a diferenciação de estirpes de *M. bovis* de forma simultânea além de ser considerada a técnica de escolha para se discriminar cepas que apresentem baixo número de cópias do elemento de inserção IS6110 como é o caso do *M. bovis* (KAMERBEEK et al., 1997; BAUER et al., 1999; VAN SOOLINGEN, 2001).

B) Biomarcadores moleculares

Atualmente alguns pesquisadores têm focado seus esforços na detecção precoce da tuberculose bovina através da identificação de biomarcadores protéicos específicos ao *M. bovis*.

SETH et al., (2009) realizaram um estudo proteômico para detecção precoce de *M. bovis*. Para isso utilizaram iTRAQ (*tag* isobárico para quantificação relativa e absoluta) uma técnica de espectrometria e cromatografia de massa que permite a identificação e a quantificação simultânea de peptídeos proteicos entre múltiplas amostras agrupadas. Esses pesquisadores coletaram amostra de soros de animais experimentalmente infectados ou por *M. bovis* ou por *M. paratuberculosis* bem como de controle não infectados; para descobrirem potenciais biomarcadores de infecção durante o curso da doença. Encontraram níveis de marcadores como o microglobulina α -1, glicoproteína α -1 ácido, glicoproteína α -1B e fetuína exclusivamente no soro de animais infectados por *M. bovis*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a imunogenicidade das proteínas totais extraídas de *Mycobacterium bovis* isolados de linfonodos de bovinos reatores ao teste de tuberculinização à campo.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização molecular de quatro amostras sugestivas de *Mycobacterium bovis* isoladas no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG;
- Caracterizar o extrato protéico total de *M. bovis* utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante
- Identificar proteínas imunogênicas de *Mycobacterium bovis* por meio da técnica de *Western Blot*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas Bacterianas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) em Goiânia.

A caracterização molecular das amostras isoladas no Laboratório de imunopatologia do IPTSP foi realizada no Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) na cidade de São Paulo, no período de 18 a 22 de dezembro de 2008.

4.2 Origem das amostras de soro

Foi utilizado um painel de 93 amostras de soro bovino, sendo 53 provenientes de animais PPD-positivos de fazendas localizadas nos estados de Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais e 40 provenientes de animais PPD-negativos, sendo que deste grupo 20 amostras vieram de região livre de tuberculose dos Estados Unidos e 20 provenientes da mesma região do grupo dos PPD-positivos. Com exceção das originadas dos EUA todas as outras amostras de soro dos bovinos foram enviadas pelo Centro de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CENARGEN) e mantido sigilo quanto às propriedades rurais de origem.

As amostras de soro coletadas após o teste de tuberculina intradérmico comparado (PPD-*bovis* e PPD-*avium*) estavam aliquotadas e estocadas à temperatura de -20°C no laboratório de imunopatologia do Instituto de Patologia tropical e Saúde Pública da UFG quando do início deste experimento.

4.3 Isolamento e cultivo do agente:

Quatro colônias BAAR (bacilos álcool-ácido resistentes) sugestivas de *M. bovis* que foram isoladas de linfonodos submandibulares e subescapulares de bovinos adultos eutanasiados após diagnóstico positivo ao teste intradérmico, já se encontravam em meio de cultivo (meio Stonebrink) no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG quando do início deste experimento.

4.4 Caracterização molecular

4.4.1 Extração do DNA

A técnica de extração do DNA foi realizada conforme citado por VAN SOOLINGEN et al., (1994).

Para extração do DNA genômico das culturas isoladas, foram colocadas amostras das quatro culturas em quatro tubos de 1,5 mL previamente identificados em seguida foi adicionado 400µL de tampão TE (10mM Tris-HCl ; 1mM EDTA) e 120µg de lisozima (20mg/mL) (Sigma Aldrich - Switzerland) em cada tubo. As amostras foram então homogeneizadas e colocadas em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. Após, foi acrescentado 70µL de SDS10% (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) e 12µL de proteinase K (20mg/ml) (Invitrogen - Germany). Incubou-se o sistema a 56°C por 15 minutos. Foi adicionado 100µL de cloreto de sódio 5,0M e 80µL de solução CTAB (brometo de cetilmetilamônio) /NaCl (10% CTAB; 0,73M NaCl) (ICN Biomedicals Inc.- Ohio). Os tubos foram lentamente agitados até que atingissem um aspecto leitoso e em seguida as amostras foram incubadas por 10 minutos a 65°C e acrescidas de 650µL de clorofil (clorofórmio- álcool isoanílico 24:1 v/v) seguida de agitação por 30 segundos. Foram centrifugadas a 12.000g por cinco minutos e o sobrenadante das amostras foi transferido para outro tubo. Adicionou-se 400µL de isopropanol e o sistema foi então homogeneizado e incubado por 24h a -20°C. O DNA precipitado foi coletado por centrifugação a 1200rpm/20 minutos. Os tubos foram lavados com álcool etílico a 70% e colocados em posição invertida para que o

álcool pudesse ser totalmente escoado e evaporado. Os sedimentos foram ressuspensos em água miliQ.

4.4.2 *Spoligotyping*

A técnica de *spoligotyping* foi realizada conforme protocolo da Universidade de São Paulo, citado por ROSALES et al, (2005).

Foram realizadas reações em 50µL, contendo Água ultra pura, tampão de reação, dNTP (1,25mM), 10pmol de cada oligonucleotídeo, 50mM de MgCl, 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), iniciador (DRa 5'-GGGTTTGGGTCTGACGAC-3' biotinado em DRb 5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC -3'), TAQ polimerase (1,25 unidades) e 1µL DNA.

O ciclo empregado na PCR foi: desnaturação à 96° C por 3 minutos, 30 vezes do ciclo de amplificação, 96° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72° C por 30 segundos, seguido de um ciclo de extensão final de 72° C por 10 minutos. Após a amplificação, 20µL do produto de PCR foi adicionado em 170µL de 2X SSPE/0,1% SDS (20X SSPE: 0,2M NaHPO₄, 3,6 M de NaCl, 20Mm de EDTA) a desnaturação é realizada a 99° C por 15 minutos e colocado em gelo imediatamente para evitar re-associação das bandas.

A membrana foi sensibilizada lavando-a com 2X SSPE 0,1% SDS a 60° C durante 5 minutos e ajustada no miniblatter de modo a ficar com a linha de aplicação de sondas perpendicular à aplicação das amostras.

Após a aplicação das amostras, foi feita a hibridização por 60 minutos a 60° C, logo após realizou-se a aspiração dos fluidos do miniblatter e lavou-se a membrana por duas vezes com 2X SSPE/0,5% SDS por 10 minutos a 60° C. A membrana foi então resfriada em uma bolsa de hibridização onde foi incubada com conjugado streptavidina-peroxidase diluída em 2X SSPE/0,5% (esta etapa foi realizada a 42° C/60 minutos).

A membrana foi lavada duas vezes em 2X SSPE/0,5% SDS por 10 minutos a 42° C seguido de mais duas lavagens em temperatura ambiente com 2XSSPE. Incubou-se então a membrana com reagentes de quimioluminescência (ECL[®] Amersham Pharmacia) por cinco minutos. A documentação foi feita em

filme radiográfico e a revelação foi realizada com reagentes para radiografia, seguindo a indicação do fabricante. Os controles positivos usados foram DNA cromossomal de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG.

4.5 Purificação do antígeno:

As bactérias foram raspadas do meio de cultura e maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino (sempre mantidas congeladas por N₂); o produto foi transferido para um tubo falcon contendo 2mL de Tris-EDTA 20mM, com os inibidores de protease TLCK (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), PMSF (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) (20µL de cada) e alfafenotróina (60µL) e em seguida homogeneizado. A mistura antigênica foi alíquotada (800µL/tubo), acrescida de tampão de amostra contendo 2-mercaptoethanol, conforme Anexo 1 (200µL/tubo), inativadas a 85°C/20 minutos; em seguida conservadas à temperatura de - 20°C.

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE):

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada sob condições redutoras, sendo utilizados um gel de corrida a 30% e um gel de empilhamento a 12%. Os géis foram preparados com uma solução de acrilamida (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), bis-acrilamida (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), água destilada, solução Trizma-Base (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) 0.75M pH 8.8, para gel de corrida e Trizma 0.25M pH 6.8 para o gel de empilhamento; solução de SDS 10% (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), persulfato de amônio a 10% e tetrametiletlenodiamina (TEMED, Sigma Aldrich, St Louis, EUA) conforme Anexo 2 e 3. A eletroforese foi realizada utilizando o sistema Mini-Protean[®] 3 cell (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

Após o preparo dos géis, uma alíquota do extrato antigênico total foi centrifugada por 10 minutos a 6000 rpm, e em seguida aquecida a 96°C /5

minutos; 150 µL do sobrenadante da amostra foi distribuído no gel de empilhamento. Foi colocada na cuba do sistema uma solução tampão de corrida à base de Trizma base, SDS, água destilada e glicina conforme Anexo 4, e na sequência, este foi submetido a um campo elétrico inicial de 70 Volts até a entrada das amostras no gel de corrida, em seguida, o campo elétrico do foi alterado para 100 Volts. O tempo total estimado para a separação das proteínas foi de aproximadamente 130 minutos. Utilizou-se padrão dual color de peso molecular (*Precision Plus Protein*, Bio Rad, USA) durante a corrida. Esta foi feita em duplicata, sendo que um gel foi corado (utilizado como controle) e o outro foi transferido para a membrana de nitrocelulose.

4.7 Western Blot

A amostra antigênica fracionada por SDS-PAGE foi transferida para uma membrana de nitrocelulose como descrito por Towbin et al.(1979), a eficiência da transferência foi avaliada corando-se a membrana com corante *Ponceu Red* (ácido acético 10%, 0,2g de *Ponceau Red* e 90mL de água qsp) evidenciando a presença de bandas marcadas. A membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras e estas foram bloqueadas com solução de leite desnatado em pó a 5% (1,25g do leite para cada 25mL de solução PBS) por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as tiras foram incubadas com as amostras de soro dos bovinos utilizando a diluição 1:100, em solução de leite em pó desnatado à 2% por 2 horas à 37°C (0,5g de leite em pó para cada 25mL de solução PBS). Em seguida a membrana foi lavada por cinco vezes com solução PBS *Tween* 20 a 0,05% (10 minutos cada lavagem). Posteriormente à lavagem, as tiras foram incubadas com anticorpo secundário conjugado peroxidase anti-IgG bovino (Jackson Immuno Research Laboratories, West Groove, USA) na proporção de 1:5000, diluído em solução de leite em pó a 2% por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse procedimento as tiras foram lavadas novamente com solução PBS *Tween* 20 a 0,05% (5 lavagens de 10minutos cada) e então colocadas com a solução reveladora (0,005g Diaminobenzidina; 10µl H₂O₂ e 35mL de PBS). Todas as etapas foram realizadas sob agitação.

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos no presente estudo são qualitativos e indicaram a presença ou ausência do reconhecimento das proteínas por anticorpos de animais PPD-positivos e PPD-negativos.

A frequência absoluta e relativa de reconhecimento de cada uma das bandas foi calculada baseado no número de amostras avaliadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As quatro cepas isoladas em Goiás foram analisadas pela técnica molecular de *spoligotyping* para verificação da espécie e correlação genética entre elas.

Por meio desta técnica, concluiu-se que as quatro amostras isoladas no IPTSP-UFG eram de *Mycobacterium bovis* e apresentavam o mesmo padrão de hibridização; de código binário: 1100000101111110111101111000011111111100000 (sendo 1 a presença da região espaçadora e 0 a ausência dessa região). A documentação radiográfica do padrão de hibridização obtido pode ser visto na figura 3.

Baseado no código binário citado, as quatro cepas foram identificadas como espoligotipo SB1145, conforme catalogado no banco de dados do [site mbovis.org](http://mbovis.org).

ROSALES et al., (2005) foram os primeiros a identificarem por *spoligotyping* a presença dessa cepa no Brasil, que denominaram à princípio de BR21, cepa essa encontrada em apenas um dos animais avaliados em um estudo epidemiológico que realizaram no estado de São Paulo. Posteriormente, essa cepa foi cadastrada como SB1145 no banco de dados do [site mbovis.org](http://mbovis.org). O mesmo padrão foi encontrado por RODRIGUEZ et al., (2009) que realizando um estudo epidemiológico da tuberculose bovina na Espanha no período de 1992 a 2007 encontraram uma prevalência de 0,06% deste espoligotipo (SB1145) entre os animais avaliados e concentrados na região central do país.

A utilização da técnica molecular de *spoligotyping* para caracterização das cepas de *M. bovis* isoladas no IPTSP-UFG, foi importante para o estudo epidemiológico da tuberculose bovina em Goiás, pois demonstrou a existência de uma cepa que parece, até o momento, ser compartilhada entre o Brasil e a Europa, uma vez que o espoligotipo SB1145, conforme a literatura foi citado somente no Brasil entre os estados de São Paulo e Goiás, e na Europa na parte central da Espanha (Madri e Castile e Léon), demonstrando relações epidemiológicas entre essas regiões. Entretanto, sugere-se um estudo mais abrangente da tuberculose bovina no estado de Goiás, como os realizados nas

outras regiões citadas, uma vez que a quantidade de isolados avaliados, não permite concluir a origem da cepa.

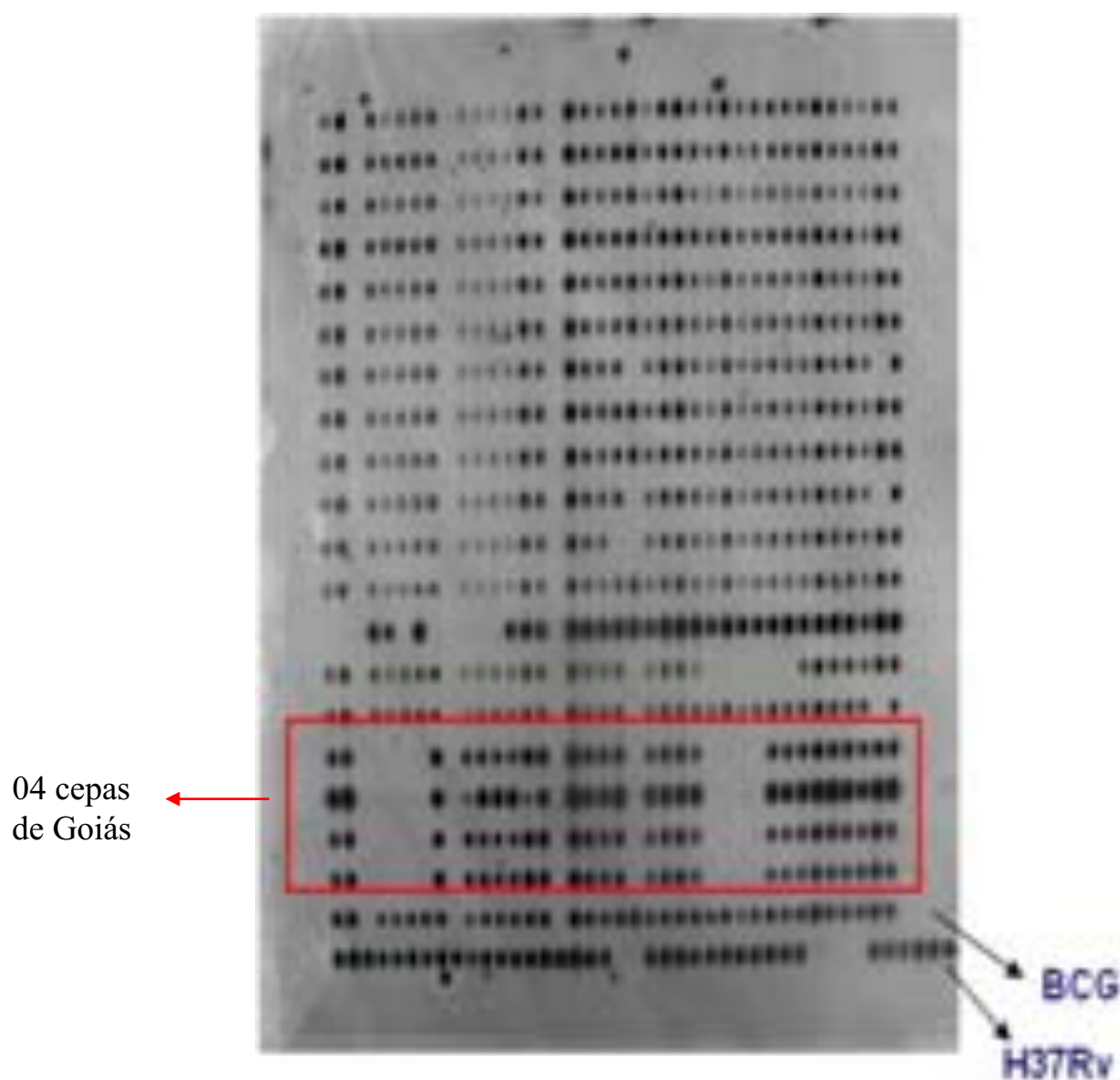


FIGURA 3 – Documentação radiográfica do padrão de hibridização dos quatro isolados de *Mycobacterium bovis*

Após a clonalidade dos isolados de *M. bovis*, a caracterização das proteínas foi realizada em apenas um dos isolados.

A análise do gel de poliacrilamida estabilizado pelo corante comassie azul, resultou em três frações antigênicas evidentes, que são as de aproximadamente 16, 26 e 40kDa como apresentado na figura 4.

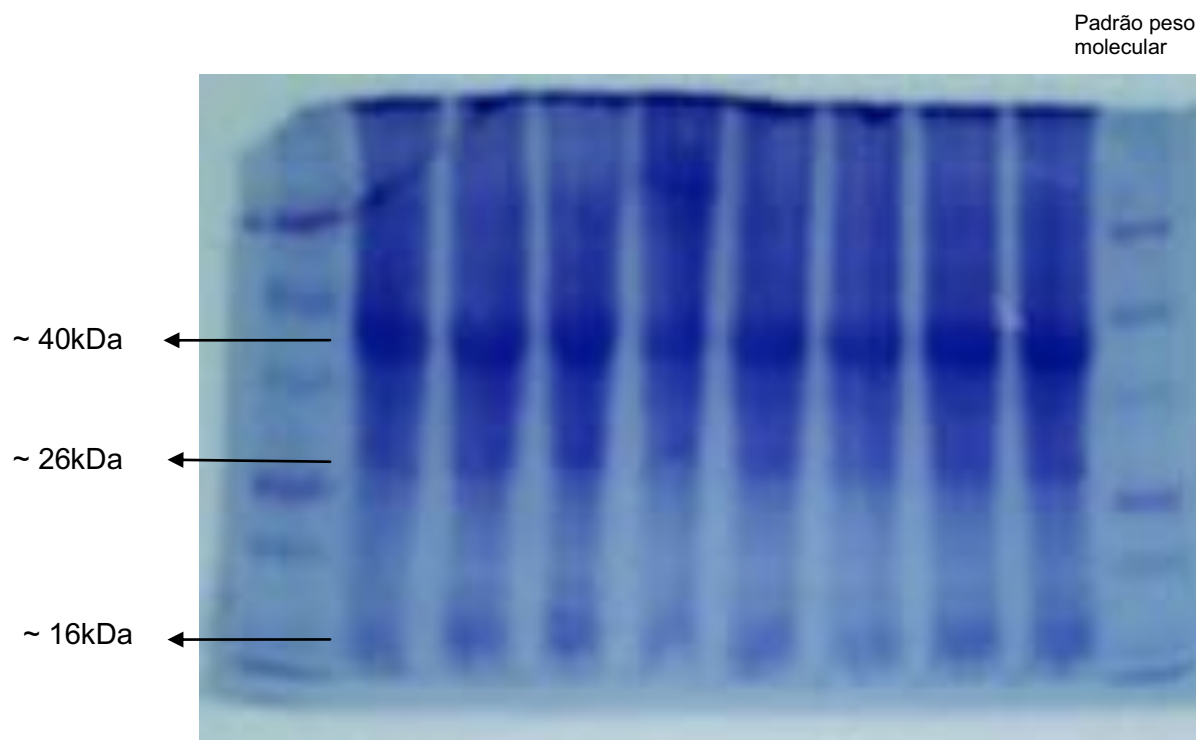


FIGURA 4 - Gel de poliacrilamida da eletroforese, corado com azul de comassie, evidenciando a separação das proteínas totais de *Mycobacterium bovis*

O imunoblot do soro dos animais PPD-positivos apresentou outras proteínas imunogênicas além das evidenciadas através da SDS-PAGE e embora o padrão de reconhecimento desses antígenos tenha sido variável com o reconhecimento das proteínas de 16, 19, 26, 37, 50, 55 e 70kDa, duas destas foram regularmente detectadas, que são as com massa molecular de aproximadamente 19 e 26kDa, sendo que uma proteína de aproximadamente 26kDa, sugestiva de ser a MPB83, foi a mais freqüente dentre os antígenos imunogênicos deste trabalho. A representação dessa resposta foi demonstrada pelo imunoblot de soro sequencial visto na Figura 5.

O padrão de reconhecimento de antígenos de *M.bovis* pelos anticorpos (IgG) presentes no soro dos animais PPD-negativos foi também avaliado por imunoblot, mostrando a proteína de aproximadamente 35kDa em cinco (12,5%) amostras testadas, conforme Figura 6.

Anticorpos presentes no soro dos animais de região livre da tuberculose dos Estados Unidos não apresentaram qualquer reatividade contra as proteínas isoladas de *Mycobacterium bovis*, conforme resultado do Western blot apresentado na Figura 7.

Foi observada a presença de bandas imunogênicas nas frações protéicas de aproximadamente 16, 19 e 37kDa, somente nos animais PPD positivos, enquanto que as de 35 e 40kDa foram visualizadas apenas no imunoblot dos animais PPD-negativos. A freqüência das bandas visualizadas entre os dois grupos pode ser vista na Tabela 1.

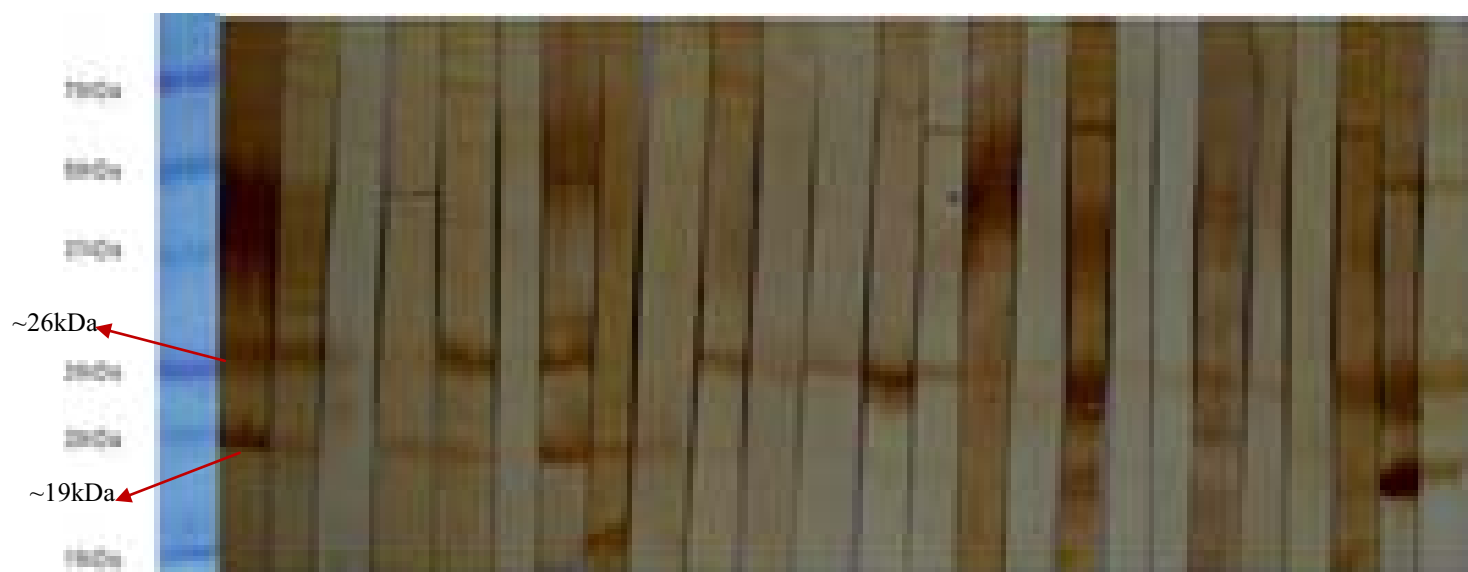


FIGURA 5 – Imunoblot representativo das amostras dos animais PPD-positivos



FIGURA 6 - Imunoblot representativo das amostras de animais PPD-negativos



FIGURA 7 - Imunoblot representativo das amostras de soro dos animais provenientes de região livre da tuberculose dos EUA.

TABELA 1 – Frequência absoluta e relativa (%) das bandas expressadas pelos animais PPD positivos e PPD negativos evidenciadas no imunoblot.

Bandas	PPD+ *	PPD- **
≈16kDa	10 (18,86)	0
≈19kDa	20 (37,73)	0
≈26kDa	36 (67,92)	2 (5)
≈35kDa	0	5 (12,5)
≈37kDa	5 (9,43)	0
≈40kDa	0	2 (5)
≈50kDa	10 (18,86)	2 (5)
≈55kDa	8 (15,09)	1 (2,5)
≈70kDa	5 (9,43)	1 (2,5)

* Total de 53 animais avaliados, ** total de 40 animais avaliados.

Pesquisas mostram que a resposta humoral ao *Mycobacterium bovis* é variável e acompanha o processo evolutivo da infecção (POLLOCK et al, 2005; WATERS et al, 2006;), por isso diferentes padrões de bandas antigênicas podem ser encontradas nas diferentes fases de disseminação da doença como fase orofaríngea, torácica, pulmonar e disseminada (CATTALDI, et al.,1994; POLLOCK,1997a). Analisando a cinética da resposta de anticorpos contra proteínas específicas, LYASHCHENKO et al, (1998), citaram ainda uma variação no padrão de imunodominância de antígenos durante o curso da infecção.

No presente estudo observou-se que independente de se conhecer o estágio ou a via de infecção dos animais positivos ao teste intradérmico, 67,92% destes apresentaram sororeatividade contra a proteína de 26kDa (MPB83).

O'LOAN et al, (1994), demonstraram por meio da técnica de Western blot que anticorpos para o antígeno MPB83 (26kDa) apareceram consistentemente na fase inicial da doença, tanto em animais experimentalmente infectados como nos contatos naturalmente infectados, sugerindo que a utilização desta proteína serviria para aumentar a especificidade do teste de ELISA. WATERS et al., (2006) detectaram da mesma forma, uma resposta humoral contra o antígeno MPB83 em animais experimentalmente infectados quatro semanas após a infecção, independente da rota ou da cepa utilizada.

Recentemente, vários estudos têm utilizado a proteína recombinante MPB83 em ensaios que combinam diferentes antígenos como, por exemplo, o MAPIA e o ensaio de fluxo lateral confirmando o MPB83 como um dos mais promissores antígenos para sorodiagnóstico da tuberculose não só em bovinos, mas em vários animais silvestres (WHELAN et al, 2008; WIKER et al, 2009). MCNAIR et al., (2001), citam que antígenos expressados somente por cepas patogênicas de *M. bovis* teriam o potencial de aumentar a detecção de anticorpos em rebanhos infectados.

Os resultados encontrados neste estudo confirmam o potencial da proteína de 26kDa (MPB83) de *Mycobacterium bovis* no desenvolvimento de ensaios para diagnóstico sorológico da tuberculose bovina, pois ficou demonstrada a imunogenicidade desta proteína também entre os bovinos naturalmente infectados e não só entre os experimentalmente como citado em pesquisas anteriores.

A segunda proteína mais reconhecida pelos animais PPD-positivos, foi a de 19kDa, também citada por LYASHCHENKO et al, (1998), que pesquisando a resposta de anticorpos contra antígenos específicos na tuberculose bovina, encontraram pouca sororeatividade contra esse antígeno em animais experimentalmente infectados, contrastando com os resultados do presente estudo realizado com animais PPD-positivos à campo.

Algumas pesquisas, citam a proteína de 19kDa como sendo altamente expressa por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, uma micobactéria ambiental responsável pela doença conhecida como paratuberculose ou Doença de Johne (do inglês *Johne's disease*) que causa enterite crônica tanto em ruminantes como animais silvestres. Para determinar se rebanhos naturalmente infectados por *M. paratuberculosis* produziria anticorpos contra a proteína de 19kDa, HUNTLEY et al., (2005) avaliaram por Western blot o soro de nove bovinos saudáveis e 14 clinicamente infectados. Dos nove animais saudáveis, apenas um demonstrou uma resposta fraca de anticorpos contra essa proteína, enquanto que nove dos 14 animais infectados apresentaram reação imunogênica contra a proteína de 19kDa, sugerindo que esta seja altamente imunogênica em rebanhos com paratuberculose.

Comparando-se entre os achados de LYASHCHENKO et al (1998) e HUNTLEY et al, (2005), supõe-se que a imunogenicidade apresentada para a proteína de 19kDa nos animais PPD-positivos do presente estudo, seja resultante de reação cruzada com micobactérias não tuberculosas.

Outra proteína amplamente estudada em rebanhos com paratuberculose é a de 35kDa. BANNANTINE et al., (2003), citam esta proteína como sendo a maior proteína de membrana expressa por *M. paratuberculosis* e sugerem que esta sirva como um importante fator de virulência no início da infecção das células epiteliais intestinais por *M. paratuberculosis in vivo*. Por estar presente no início da infecção, este possa ser o motivo de se ter encontrado essa proteína em 12,5% dos animais PPD-negativos em nosso estudo.

6 CONCLUSÃO

A determinação da imunogenicidade das proteínas totais de *M. bovis* foi obtida pela técnica de Western Blot.

As proteínas imunogênicas para os animais PPD-positivos testados neste estudo foram as de aproximadamente 16, 19, 26, 37, 50, 55 e 70kDa.

Dentre as proteínas identificadas, a de 26kDa (MPB83) foi considerada como a mais imunogênica, uma vez que foi reconhecida por 67,92% dos animais naturalmente infectados.

O *spoligotyping* das amostras de *Mycobacterium bovis* isoladas no IPTSP-UFG, confirmou a existência da cepa SB1145 no estado de Goiás.

REFERÊNCIAS

1. AÍNSA, J.A.; MARTIN, C.; GICGUEL, B. Molecular aproaches to tuberculosis. **Molecular Microbiology**, Salem, v.42, n.2, p.561-570, 2001.
2. ABRAHÃO, R.M.C.M; Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais **Archieves of Veterinary Science**, São Paulo, v.4, n.1, p.5-15, 1999.
3. AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, E.M.; RODRIGUEZ, C.A.R.; FERREIRA NETO, J.S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n.2, p.241-244, 2008
4. AMADORI, M.;LYASHCHENKO, K.P.; GENNARO, M.L.; POLLOCK, J.M.; ZERBINI, I. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.85, p.379-389, 2002.
5. ARANAZ, A.; LIÉBANA; A.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONZALEZ, O.; RODRIGUEZ-FERRI, E.F.; BUNSCHOTEN, A.E.; EMBDEM, J.D.; COUSIS, D. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.11, p.2734-3740, 1996.
6. BANNANTINE, J.P.; HUNTLEY, J.F.J.; MILTNER, E.; STABEL, J.R.; BERMUDEZ, L.E. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. **Microbiology**, London, v.149, p.2061-2069, 2003.
7. BAUER, J.; ANDERSEN, A.B.; KREMER, K.; MIORNER, H. Usefulness of *Spoligotyping* to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains cultured in Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, , v. 37, p. 2602-2606, n. 8, 1999,

8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e tuberculose Animal (PNCEBT). **Manual Técnico**. Brasília, 2006. 188p.
9. BUDDLE, M.B.; PARLANE, N.A.; KEEN, D.L.; ALDWELL, F.E.; POLLOCK, J.M.; LIGHTBODY, K.; ANDERSEN, P. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M.bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.6, n.1, p.1-5, 1999.
10. BUDDLE, M.B.; RYAN, T.J; POLLOCK, J.M; ANDERSEN, P; LISLE, G.W. Use of ESAT-6 in the Interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.80, n.1, p.37-46, 2001.
11. BUDDLE, M.B.; McCARTHY, A.R.; RYAN, T.J.; POLLOCK, J.M.; VORDERMEIER, H.M; HEWINSON, R.G.; ANDERSEN, P.; LISLE, G.W. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test positive cattle. **The Veterinary Record**, London, v.153, n.20, p.615-620, 2003.
12. BUDDLE, B.; WEDLOCK, D.N.; DENIS, M.; SKINNER, M.A.; Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.108, p.45-51, 2005.
13. BUDLLE, B.M.; LIVINGSTONE, P.G.; LISLE, G.W. Advances ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle, **New Zeland Veterinary Journal**, Wellington, v.57, n.4, p.173-178, 2009.
14. CASSIDY, J.P.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M., EVANS, R.T.; FORSTER, F.; NEIL, S.D. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburg, v.119, n.1, p.27-24, 1998.

- 15.CATALDI, A.; ROMANO, M.I.; BIGI, F. A western blot characterization of *Mycobacterium bovis* antigens recognized by cattle sera. **Research in Microbiology**, Paris, v.145, p.689-698, 1994

- 16.CFSPH (The Center for Food Security and Public Health). Desenvolvido pela Iowa State University - College of Veterinary Medicine, 2009. Apresenta textos e fichas técnicas sobre doenças animais. Disponível em http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf. Acesso em 27 out. 2009.

- 17.CHAITRA, M.G.; SHAILA, M.S.; NAYAK, R. Characterization of T-cell immunogenicity of two PE/PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.57, p.1079-1086, 2008.

- 18.COLE, S.T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiology**, Paris, v.148, p.2919-2928; 2002.

- 19.COOPER, A.M., Cell-mediated immune responses in tuberculosis, **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.27, p.393-422, 2009.

- 20.CORNER, L.A. Pós mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.40, n.1-2, p.53-63, 1994.

- 21.FIFIS, T.; COSTOPOULOS, C.; RADFORD, J.A.; BACIC, A.; WOOD, R.P. Purification and characterization of major antigens from a *Mycobacterium bovis* culture filtrate. **Infection and Immunity**, Washington, v.59, n.3, p.800-807, 1991.

- 22.FIFIS, T; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; WOOD, P.R. Cellular and humoral responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v.39, n.3, p.267-274, 1994.

- 23.FLYNN, J.; CHANN, J. Tuberculosis: Latency and reactivation. **Infection and Immunity** Washington, v.69, n.7, p.4195-4201, 2001.

24. GARNIER, T., EIGLMEIER, K., CAMUS, J.C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, G.; , LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; , DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P.R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B.G.; COLE, S.T.; GORDON, S.V.; HEWINSON, G.R.; The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of the Sciences of the USA (PNAS)**, Washington, v.100, n.13, p.7877–7882, 2003.

25. GLICKMAN, M.S.; COX, J.S.; JACOBS, W.R. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, **Molecular Cell**, Cambridge, v.5, p.717-727, 2000.

26. GOLBY, P.; HATCH, K.A.; BACON, J.; COONEY, R.; RILEY, P.; ALLNUT, J.; HINDS, J.; NUNEZ, J.; MARSH, P.D.; HEWISON, R.G.; GORDON. Comparative transcriptomics reveals key gene expression differences between the human and bovine pathogens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiology**, Ann Arbor, v.153, p.3323-3336, 2007.

27. GOROCICA, P.; JIMENEZ-MARTINEZ, M.; GARFIAS, Y.; SADA, I.; LASCURAIN, R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, México, v.18, n.2, p.142-153, 2005.

28. GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.40, n.1-2, p.137-151, 1994.

29. HARBOE, M.; WIKER, G.H.; ULVUND, G.; LUND-PANDERSEN, B.; ANDERSEN, B.A.; HEWINSON, G.R.; NAGAI, S. . MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in *Mycobacterial* cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.66, n.1, p. 289-296, 1998.

30. HOFFMAN C.; LEIS, A.; NIEDERWEIS, M.; PLITZKO, J.; ENGELHARDT, H.
Discosure of the micobacterial outer membrane: cryo-eletron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)**, Washington, v.105, n.10, p.3963-3967, 2008.

31. HUMBLET, M.F.; BOSCHIROLI, M.L.; SAEGERMAN, C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. **Veterinary Research**, Les Ullis, v.40, n.5, p.1-24, 2009.

32. HUNTLEY, J.F.J.; STABEL, J.R.; BANNANTINE, J.P. Immunoreactivity of the Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis 19kDa lipoprotein. **BMC Microbiology** [published online] v.5, n.1, 2005. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/3>. Acesso em 5 dez. 2009.

33. HUSSAIN, R.; SHIRATSUCHI, H.; ELNNER, J.J.; WALLIS, R.S. PPD-specific IgG1 antibody subclass upregulate tumour necrosis factor expression in PPD-stimulated monocytes: possible link with disease pathogenesis in tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.119. p.449-455, 2000.

34. KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; AGTERVELD, M. V.; SOOLINGEN, D.V.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; EMBDEM, J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.4, p.907-914, 1997.

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

36. KAUFFMAN, S.H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature reviews Immunology**, London, v.1, n.1, p.20-30, 2001.

- 37.LEE, R.E.B.; LI, W.; CHATTERJEE, D.; LEE, R.E. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol treatment and gene mutation are observed. **Glycobiology**, Oxford, v.15, n.2, p.139-151, 2005.

- 38.LYASHCHENKO, K.P, POLLOCK, J.M.; COLANGELI, R.; GENNARO, M.L. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.66, n.11, p.5344-5349, 1998.

- 39.LYASHCHENKO, K.P.; SINGH, M.; COLANGELI, R.; GENNARO, M.L. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.242, p.91–100, 2000.

- 40.MCNAIR, J.; CORBETT, D.M.; GIRVIN, R M.; MACKIE, D P.; POLLOCK, J.M. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is a early target with diagnostic potential. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v.53, n.4, p.365-371, 2001.

- 41.MENZIES, F.D; NEILL, S.D. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis, **The Veterinary Journal**, London, v.160, p.92-106, 2000.

- 42.NEILL, SD; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.G.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.40, p.41-52, 1994.

- 43.NOL, P.; LYASHCHENKO, K.P.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; NONNECK, B.J.; KEEFE, T.J.; THACKER, T.C.; RHYAN, J.C.; ALDWELL, F.E., SALMAN, M. D. Humoral immune response of white-taile deer (*Odocoileus virginianos*) to *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and experimental challenge with *M. bovis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v.16, n.3, p.323-329, 2009.

- 44.O'LOAN, C.J.; POLLOCK, J.M., HANNA, J.; NEILL, S.D. Immunoblot analysis of humoral Immune responses to *Mycobacterium bovis* in experimentally infected cattle: Early recognition of a 26 Kilodalton antigen. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.1, n.5, p.608-611, 1994.
45. PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and macrophage: Maintaining a balance. **Cell host and Microbe**, Cambridge, v.3, n.6, p.399-407, 2008.
46. POLLOCK, J.M., ANDERSEN, P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Copenhagen, v.65, n.7, p. 2587-2592, 1997a.
- 47.POLLOCK, J.M., ANDERSEN, P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.175, n.5, p.1251-1254, 1997b.
- 48.POLLOCK, J.M., .; MCNAIR, J.; WELSH, M.D.; GIRVIN, R.M.; KENNEDY, H.E.; MACKIE, D.P.; NEILL, S.D. Immune responses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, Edinburgh, v.81, n.1-2, p.103-107, 2001.
- 49.POLLOCK, J.M.; NEILL, S.D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, London, v.163, n.2, p.115-127, 2002.
50. POLLOCK, J.M.; MCNAIR, J; BASSET H.; CASSIDY, J.P.; COSTELLO, E.; AGGERBECK, H.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.5, p.1856-1860, 2003.
- 51.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**, Amsterdam, v.108, p.37-43, 2005.

52. POLLOCK, J.M.; RODGERS, J.D.; WELSH, M.D.; McNAIR, J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role experimental models of infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.112, p.141-150, 2006.

53. PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1998: conquest and controversy. *Journal of Comparative Pathology*, London, v.99, p.357-399, 1998.

54. RANGEN, A.S.; SURUJIBALI, O.P.; LUTZE-WALLACE, C.; LEES, V.W. Is the gamma interferon assay in cattle influenced by multiple tuberculin injections? **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.50, p.270-274, 2009

55. REHREN G.; WALTERS S.; FONTAN P.; SMITH I.; ZÁRRAGA A.M.; Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, Edinburgh, v.87, n.4, p.347-359, 2007

56. RENSHAW, P.S.; LIGHTBODY, K.L.; VEVERKA, V.; MUSKETT, F.W.; KELLY, G.; FRENKIEL, T.A.; GORDON, S.V.; HEWINSON, B.B.; NORMAN, J.; WILLIANSO, R.A.; CARR, M.D. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulent factors CFP10 and ESAT-6. **The EMBO Journal**, Oxford, v.24, p.2491-2498, 2005

57. RODRÍGUEZ, S.; ROMERO, B.; BEZOS, J.; JUAN, L.; ÁLVAREZ, J.; CASTELLANOS, E.; MOYA, N.; LOZANO, F.; GONZÁLEZ, S.; SÁEZ-LLORENTE, J.L.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; ARANAZ, A. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. **Veterinary Microbiology**, [article in press on line], 2009. Disponível em [doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.007](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.007). Acesso em: 20 nov. 2009.

58. ROSALES, C.A.R. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos** [online]. 2005. 86f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-25102006-154614/publico/CesarAlejandroRosalesRodrigues.pdf>. Acesso em: 20 set. 2009.
59. ROXO, E. Tuberculose bovina: Revisão. **Arquivos do Instituto biológico**, São Paulo, v.63, n2, p.91-97, 1996.
60. ROXO, E. Situação atual da Tuberculose Bovina no Brasil. 1997. Disponível em: <http://www.spmv.org.br/conpavet2004/palestras%20%20resumos/Eliana%20Roxo.doc>. Acesso em: 20 jul. 2008.
61. SAIID-SALIM, B.; MOSTOWY, S.; KRISTOF, A.S.; BEHR, M.A. Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Rv0444c, the gene encoding anti-sigK, explain high level expression of MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis*. **Molecular Microbiology**, Salem, v.62, n.5, p.1251-1263, 2006.
62. SERBINA, V.N.; FLYNN, J.L. Early emergence of CD8+T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.67, p.3980-3988, 1999
63. SETH, M.; LAMONT, E.A.; JANAGAMA, H.K.; WIDDEL, A.; VULCHANOVA, L.; STABEL, J.R.; WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; SREEVATSAN, S. Biomarker Discovery in Subclinical Mycobacterial Infections of Cattle. **PLOS one** [online], v.4, n.5, e5478, 2009. Disponível em: <http://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2674942/?tool=pubmed> . Acesso em: 20 out. 2009.

64. SKEIKY, Y.A.; SADOFF, J.C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.4, p.469-476, 2006.
65. STENGER, S.; HANSON, D.A.; TEITELBAUM, R.; DEWAN, P.; NIAZI, K.R.; FROELICH, C.J.; GANZ, T.; THOMA-USZYNSKI, S.; MELIÁ, A.; BOGDAN, C.; PORCELLI, S.A.; BLOOM, B.R.; KRENSKY, A.M.; MODLIN, R.L. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science**, Washington, v.282, n.5389, p.121-125, 1998.
66. THOEN, C.; LOBUE, P.; KANTOR, I.; The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.112, n.2-4, p.339-345, 2006.
67. TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Eletroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)**, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.
68. VAN SOOLINGEN; DE HASS, P.E.; HERMANS, P.W., VAN EMBDEN, J.D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 235, p. 196-205, 1994.
69. VAN SOOLINGEN, D.; Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v.249, p.1-26, 2001.
70. VORDERMEIER, H.M.; WHELAN, P.J.; FARRANT, L.C.; PALMER, N.; HEWINSON, R.G. 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**, Washington, v.8, p. 571-578, 2001.

71. WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C.; BANNANTINE, J.P.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; McNAIR, J.; POLLOCK, J.M.; ANDERSEN, P.; LYASHCHENKO, K.P. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v.13, n.6, p.648-654, 2006.
72. WELSH, D.M.; CUNNINGHAM, R.T.; CORBETT, R.M.G.; McNAIR, J.; SKUCE, R.A.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Immunology**, Oxford, v.114, p.101-111, 2005.
73. WHELAN, C.; SHURALEV, E.; O'KEEFFE, G.; HYLAND, P.; KWOK, H.F.; SNODDY, P.; O'BRIEN, A.; CONNOLLY, J.M.; QUINN, P.; GROLL, M.; WATTERSON, T.; CALL, S.; KENNY, K.; DUIGNAN, A.; HAMILTON, M.J.; BUDDLE, B.M.; JOHNSTON, J.A.; DAVIS, W.C.; OLWILL, S.A.; CLARKE, J. Multiplex Immunoassay for Serological Diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v.15, n.12, p.1834–1838, 2008.
74. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) Disponível em <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/tuberculosis>. Acesso em 29 jul. 2009.
75. WIKER, G.H.; LYASHCHENKO, P.K.; AKSOY, M.; LIGHTBODY, A.K.; POLLOCK, M.J.; KOMISSARENKO, V.S.; BOBROVNIK, O.S.; KOLESNIKOVA, N.I.; MYKHALSKY, O.L.; GENNARO, L.M.; HARBOE, M. Immunochemical Characterization of the MPB70/80 and MPB83 Proteins of *Mycobacterium bovis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n.4, p.1445-1452, 1998.
76. WIKER, H.G. MPB70 and MPB83 – Major antigens of *Mycobacterium bovis* **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v.69, p.192-199, 2009.
77. WOOD, P.R.; JONES, S.L. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnosis test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, Edinburg, v.81, n. 1-2, p. 147-155, 2001.

Anexo 1

Tampão de amostra (2x):

2,5 mL Tris-HCl pH6,8

4,0mL SDS 10%

2,0mL glicerol

1mL b-mercaptoetanol

0,4mg azul de bromofenol

10ml água qsp

Anexo 2

Gel de corrida:

4,4 mL acrilamida 30% / Bis acrilamida 0,8%

4,5 mL Tris 0,75M pH 8.8

200µL de SDS 10%

100µL de H₂O destilada

100µL de Persulfato de amônia

20µL de TEMED

Anexo 3

Gel de empilhamento:

2,0 mL acrilamida 12% / Bis acrilamida 1,2%

4,0 mL Tris 0,75M pH 8.8

200µL de SDS 10%

1,25µL de H₂O destilada

100µL de Persulfato de amônia

20µL de TEMED

Anexo 4

Tampão de corrida:

3,0g de Tris

1,0g de SDS

12g de glicina

1000mL de H₂O qsp