

**Avaliação de proteínas
recombinantes para detecção
de anticorpos contra
Mycobacterium bovis por ELISA**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 34

**Avaliação de proteínas
recombinantes para detecção de
anticorpos contra *Mycobacterium
bovis* por ELISA**

*Ingrid Ieda Fernando de Souza Meneses
Elaine Silva de Pádua Melo
Carlos Alberto do Nascimento Ramos
Ana Luíza Alves Rosa Osório
Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge
Carlos Eugênio Soto Vidal
Márcio Roberto Silva
Aiesca Oliveira Pellegrin
Flávio Ribeiro de Araújo*

Embrapa
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Av. Rádio Maia, 830 Vila Popular, CEP 79106-550

Campo Grande, MS

Fone: (67) 3368 2000

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.embrapa.br/gado-de-corte>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Ronney Robson Mamede*

Secretário-Executivo: *Rodrigo Carvalho Alva*

Membros: *Elane de Souza Salles, Lucimara Chiari, Davi José Bungenstab, Andréa Alves da Egito, Roberto Giolo de Almeida, Guilherme Cunha Malafaia*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto e Editoração Eletrônica: *Rodrigo Carvalho Alva*

Foto da capa: Flávio Ribeiro Araújo

1ª edição

Versão online (2015)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte.

Avaliação de proteínas recombinantes para detecção de anticorpos contra

Mycobacterium bovis por ELISA [recurso eletrônico] / Ingrid Ieda Fernando de Souza Meneses... [et al]. – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2015.

20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983-974X ; 34).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/bp/BP34.pdf>>

Título da página da Web (acesso em 20 de outubro de 2015).

Outros autores: Elaine Silva de Pádua Melo; Carlos Alberto do Nascimento Ramos; Ana Luiza Alves Rosa Osório; Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge; Carlos Eugênio Soto Vidal; Márcio Roberto Silva; Aiesca Oliveira Pellegrin; Flávio Ribeiro de Araújo.

1. *Mycobacterium bovis*. 2. proteínas recombinantes 3. ELISA. I. Meneses, Ingrid Ieda Fernando de Sousa. II. Melo, Elaine Silva de. III. Ramos, Carlos Alberto Nascimento. IV. Osório, Ana Luiza Alves Rosa. V. Jorge, Kláudia dos Santos Gonçalves. VI. Vidal, Carlos Eugênio Soto. VII. Silva, Márcio Roberto. VIII. Pellegrin, Aiesca Oliveira. IX. Araújo, Flávio Ribeiro de.

633.2 (21. ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2015

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	6
Introdução.....	8
Material e métodos.....	9
Resultados	14
Discussão	16
Agradecimentos	19
Referências bibliográficas	19

Avaliação de proteínas recombinantes para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* por ELISA

Ingrid Ieda Fernando de Souza Meneses¹; Elaine Silva de Pádua Melo²; Carlos Alberto do Nascimento Ramos²; Ana Luiza Alves Rosa Osório²; Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge²; Carlos Eugênio Soto Vidal³; Márcio Roberto Silva⁴; Aiesca Oliveira Pellegrin⁵; Flávio Ribeiro de Araújo⁶

Resumo

A tuberculose bovina é uma importante doença infecciosa crônica, causada pela bactéria *Mycobacterium bovis*, responsável por consideráveis perdas econômicas, além de constituir problema de saúde pública. Os programas de controle da enfermidade realizados na maioria dos países são baseados na identificação e eliminação de animais infectados, tomando como base a tuberculinização intradérmica. Porém este teste possui algumas limitações, com isto, a confirmação de animais reativos através de outros métodos torna-se necessária para garantir a confiabilidade do diagnóstico. A utilização de um teste sorológico, como o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), pode incrementar a cobertura diagnóstica desta doença. Assim, o objetivo neste estudo foi produzir proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e uma quimera com fragmentos hidrofílicos de MPB70, MPB83 e

¹ Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

² UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

³ Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁵ Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

⁶ Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS 79106550, Brasil.

ESAT-6 de *M. bovis* e avaliá-las como antígenos em ensaios ELISA. Os genes foram expressos em *Escherichia coli*, purificados por cromatografia de afinidade e as proteínas recombinantes foram testadas por ELISA com 126 soros de animais negativos ao Teste de Tuberculinização intradérmica (TCC) e 107 soros de bovinos positivos ao TCC. Além disso, foram testados 236 soros de bovinos de corte livres de tuberculose. Entre as proteínas testadas, somente a quimera demonstrou uma boa concordância com o TCC (índice *kappa* de 0,688), com sensibilidade de 83,2% e especificidade de 86,5%. As absorvâncias dos soros de bovinos livres de tuberculose no ELISA apresentaram níveis semelhantes ao encontrado nos animais positivos no TCC. Este resultado pode ser devido à realização de sucessivos testes de tuberculinização nesses animais, que se torna necessário para caracterização do rebanho como livre de tuberculose. No entanto, o ELISA com a quimera foi útil para discriminar animais positivos e negativos em rebanhos para posterior confirmação pelo TCC.

Termos para indexação: ELISA, proteínas recombinantes, *Mycobacterium bovis*.

Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis

*Ingrid Ieda Fernando de Souza Meneses
Elaine Silva de Pádua Melo
Carlos Alberto do Nascimento Ramos
Thaís de Andrade Farias
Ana Luiza Alves Rosa Osório
Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge
Carlos Eugênio Soto Vidal
Altino S. Silva
Márcio Roberto Silva
Aiesca Oliveira Pellegrin
Flávio Ribeiro de Araújo*

Abstract

*Bovine tuberculosis is an important infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*, which is responsible for considerable economic losses. This disease constitutes a serious public health problem. Control programs in most countries, including Brazil, are based on the identification and slaughter of infected animals, as defined by the skin tuberculin test, which has its constraints. In the present study, the recombinant proteins CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 and a chimera of ESAT-6/MPB70/MPB83 (fusion protein) were tested as ELISA antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis. The proteins were produced in *Escherichia coli*, purified and tested in ELISAs with sera from 126 cattle having tested negative in the comparative intradermal tuberculin test (CITT) and 107 sera from cattle having tested positive in the CITT. Also, 236 sera from two BTB-free beef cattle herds were tested. Among the proteins tested, only the ESAT-6/MPB70/MPB83 chimera demonstrated satisfactory agreement with the CITT (kappa index: 0.688), reflecting in 83.2% sensitivity and 86.5% specificity. The ELISA absorbances of the cattle sera from BTB-free herds showed similar levels to those of CITT positive cattle,*

probably as the result of successive skin tuberculinizations to define the BTB-free status of the herds. However, the ELISA with the ESAT-6/MPB70/MPB83 chimera was useful to discriminate BTB positive and negative cattle in herds prior to the tuberculin skin test.

Index terms: *Serology, ELISA, recombinant proteins, Mycobacterium bovis, cattle.*

Introdução

A tuberculose bovina é uma enfermidade infecciosa e crônica causada pela bactéria *Mycobacterium bovis* que acomete bovinos (WOBER, 2009), outras espécies de animais de exploração zootécnica, animais silvestres livres ou em cativeiro e também o homem (GUTIÉRREZ et al. 1998; MICHEL et al. 2010). Assim, ocasiona prejuízos à pecuária e riscos à saúde da população que consome produtos de origem animal (LILENBAUM et al. 2001).

No curso da infecção por *M. bovis*, a maioria dos bovinos desenvolve resposta imune celular detectada em reações de hipersensibilidade tardias após a inoculação intradérmica de antígenos da bactéria, sobretudo derivado proteico purificado (PPD) (WHELAN et al. 2011). Apesar da eficiência no diagnóstico baseado na detecção da resposta imune celular a antígenos de *M. bovis*, os testes intradérmicos devem ser realizados in vivo e torna difícil a sua aplicação em rebanhos com alta densidade animal e em estudos epidemiológicos (MENZIES, 1999; LIU et al. 2007). Além disso, animais com infecção crônica podem não ser detectados após o teste intradérmico e o teste de INF- γ , e permanecem como fontes de infecção para outros bovinos.

Respostas de anticorpos contra *M. bovis* são positivamente correlacionados com a patologia micobacteriana e carga antigênica. Assim, os testes serológicos podem aumentar o grau de detecção de animais infectados com *M. bovis* (WHELAN et al. 2011). Os testes sorológicos podem também constituir uma alternativa para triagem de rebanhos infectados com esta enfermidade, bem como para a realização de estudos retrospectivos a partir soros armazenados de programas de controle de outras doenças, como a brucelose bovina.

Um número limitado de antígenos tem sido testado em ensaios imunológicos para o diagnóstico da tuberculose bovina. Antígenos tais como ESAT-6, MPB70 e MPB83 têm sido extensivamente estudados no Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) (BUDDLE et al. 1995; AMADORI et al. 2002; FARIAS et al. 2012), no entanto, a

sensibilidade e especificidade dos testes são relativamente baixas. Assim, torna-se necessário a procura de novos antígenos para o diagnóstico sorológico da tuberculose bovina.

Assim, o objetivo neste estudo foi testar as proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6, Mb0143, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e quimera com fragmentos hidrofílicos de MPB70, MPB83 e ESAT-6 de *M. bovis* e avaliá-los como antígenos em teste ELISA para o diagnóstico da Tuberculose bovina. CFP-10, ESAT-6, MPB83 e uma quimera com fragmentos das proteínas ESAT-6, MPB70 e MPB83 foram previamente testadas como antígenos (AMADORI et al. 2002; LIU et al. 2007), no entanto Mb0143, PE5, PE13, TB 10.4 e Tb15.3 estão sendo avaliados pela primeira vez. A seleção destas proteínas foi baseada na localização da proteína na parede celular de *Mycobacterium bovis* como PE5 e PE13 (GARNIER et al. 2003; AAGAARD et al. 2006) ou porque são proteínas secretadas como TB10.4 e TB15.3 (MATTOW et al. 2003). Mb0143 é uma proteína hipotética conservada e foi avaliada em ensaios com INF- γ (MEIKLE et al. 2009).

Material e métodos

Antígenos - Foi extraído DNA da cepa AN5 de *M. bovis* obtida por cultura em meio Stonebrink e purificado utilizando o kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificação dos genes, com o auxílio do programa PrimerSelect (DNASar) para a amplificação dos genes *cfp-10*, *esat-6*, *mb0143*, *mpb83*, *pe5*, *tb10.4* e *tb15.3* (Tabela 1).

Os fragmentos de DNA que codificam para as proteínas foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), no volume de 25 μ l, contendo 20 mM Tris pH 8,4; 50 mM KCL; 1,5 mM MgCl₂; 250 mM de cada dNTP; 100 μ g de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 50 μ g de DNA de *M. bovis*. Os perfis de amplificação foram realizados de acordo com a característica de cada par de oligonucleotídeos iniciadores.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes de *Mycobacterium bovis*

Genes	Tamanho dos amplicons	Sequências
cfp-10	300	5' GCAGAGATGAAGACCGATGCCGCTACC 3' 3' TCACAAGCCCATTTGCGAGGACAGC 5'
esat-6	288	5' ATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTTT 3' 3' CTATGCGAACATCCCAGTGAC 5'
mb0143	459	5' GCTTCGGAGTTCTCCCGTGCTGAA 3' 3' CTCGTCGAGGGTGCCCAACTCCT 5'
mpb83	604	5' ATGATCAACGTTTCAGGCCA 3' 3' GAACTCCGCCACATACCAAA 5'
pe5	219	5' ATGACGTTGCGAGTGGTTC 3' 3' TCAGCCGCCACGAC 5'
pe13	270	5' TCTTTCGTGATGGCATACCC 3' 3' GACTTCAGTGGCCGAA 5'
tb10.4	231	5' ATGTACAACTACCCCGCAT 3' 3' CATGGTGTGGCTTCATG G 5'
tb15.3	408	5' AGCGCCTATAAGACCGTGGTGGTA 3' 3' CTTGGCCCGGCGTGACACATTGG 5'

Os genes amplificados foram clonados inicialmente em plasmídeo *pGEM-T Easy* (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Os genes clonados foram sequenciados em ambas as direções utilizando o Kit *BigDye Terminator* v.3.1 (Applied Biosystems). Após a digestão com *EcoRI*, os genes foram subclonados em *pET-47b (+)* (Novagen), exceto *tb10.4* que foi clonado em *pET28-a (+)* (Novagen) e *mpb83*, que foi clonado em *pRSET-C* (Invitrogen).

A quimera composta por fragmentos hidrofílicos dos genes *esat-6*, 221989-222198 (BX248341.1, fragmento 14/14), *mpb70* 18693-19025 (BX248344.1, fragmento 11/14) e *mpb83* 15664-15966 (BX248344.1, fragmento 11/14) foram sintetizados pela empresa Genone. A análise dos fragmentos hidrofílicos para a composição da quimera foi realizada com o auxílio do programa Protean (DNASStar). A quimera foi clonada em *pET-47b (+)* (Novagen).

Como célula hospedeira, foi utilizada *Escherichia coli* cepa Rosetta em todas as construções gênicas. A indução de cada expressão gênica foi realizada com 1 mM de isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo (IPTG) em 500 mL de LB (Luria Bertani Miller) com 50 μ g/mL de clorafenicol e 30 μ g/mL de kanamicina para os genes subclonados em *pET-47b* (+) e *pET28-a* (+) ou com 50 μ g/mL de clorafenicol e 100 μ g/mL de ampicilina para o gene subclonado em *pRSET-C* a 37°C por 4 horas a 250 rpm. A expressão dos genes foi verificada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-6xhistidina (Sigma).

As proteínas recombinantes foram solubilizadas com 6M de Guanidina-HCl e purificadas por cromatografia de afinidade, em condições desnaturantes, com a coluna de agarose níquel *His trap HP* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

As proteínas recombinantes foram dialisadas em PBS a 4°C por 48 horas e, em seguida, quantificadas em gel SDS-PAGE, comparando-se a padrões de albumina sérica bovina (BSA). As massas das proteínas recombinantes foram obtidas pelo programa Labimage v.3.3.2 (Loccus).

Como as proteínas estavam insolúveis após a diálise, foi feita a solubilização de cada proteína recombinante com SDS 2% conforme descrito por Lechtziee et al. (2002).

Padronização dos ELISAs - As diluições ótimas das proteínas recombinantes, soros, conjugado e tampões utilizados nos ensaios, como também o tempo de parada da reação enzimática foi determinado pela avaliação de quatro soros de bovinos positivos e quatro soros de bovinos negativos para tuberculose pelo Teste Cervical Comparativo (TCC) (Tabela 2), segundo o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCE-BT) (BRASIL, 2004).

Tabela 2. Concentração das proteínas e as diluições dos soros utilizados para a realização dos ELISAs para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*

Proteínas recombinantes	Diluições ótimas	
	Soros	Proteínas (concentração final em µg/mL)
CFP-10	1: 600	1: 10.000/ 0,1
ESAT-6	1: 600	1: 5.000/ 0,2
Mb0143	1: 600	1: 10.000/ 0,1
MPB83	1: 600	1: 10.000/ 0,1
PE5	1: 400	1: 500/ 2
PE13	1: 600	1: 500/ 2
TB10.4	1: 400	1: 2.000/ 0,5
TB15.3	1: 400	1: 5.000/ 0,2
Quimera (a)	1: 600	1: 5.000/ 0,2

a: quimera – fusão de fragmentos de MPB70, MPB83 e ESAT-6, gene sintetizado pela empresa Genone.

Nos ELISAs foram testados soros de 107 bovinos positivos ao TCC provenientes dos Estados de Mato Grosso do Sul (município de Caarapó - 58 animais), Espírito Santo (município de Itapemirim - 6 animais), Rio Grande do Sul (municípios de Toropi - 27 animais, Tapera - 3 animais, São Martinho da Serra - 3 animais e Santa Maria -10 animais).

Como também, foram testados soros de 126 bovinos negativos ao TCC de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Os animais negativos foram provenientes de um rebanho sem histórico de tuberculose bovina da Embrapa Gado de Corte. Os bovinos desta instituição são normalmente abatidos em matadouros oficiais e não houve nenhum relato de animais positivos para esta enfermidade. O sangue para a obtenção dos soros foi recolhido no mesmo dia em que foi realizado o teste intradérmico, para evitar a interferência das tuberculinas no estado imune dos animais.

Dentre os 126 animais que foram testados e tiveram resultado negativo no TCC, 51 (40,5%) foram abatidos e não apresentaram lesões sugestivas para tuberculose bovina durante a inspeção em um mata-

douro oficial. Todos os animais positivos no TCC eram de rebanhos com surtos de tuberculose bovina e quando abatidos apresentaram lesões sugestivas para esta enfermidade, como evidenciado pela presença de lesões sugestivas durante o abate, crescimento de bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR) e PCR com *primers* para o complexo *M. tuberculosis* (RODRIGUEZ et al. 1995).

Além disso, foram testados 154 soros de bovinos de corte livres de tuberculose e 82 soros de bovinos de leite livres de tuberculose. Os animais foram considerados livres de tuberculose com base no TCC conforme as normas técnicas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2004).

Após a padronização das melhores condições para o ensaio ELISA, os antígenos foram adsorvidos em placas de poliestireno de 96 poços (Costar 3590), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6, por uma hora a 37°C. As placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de tampão fosfato com 0,01% de Tween 20 (PBST) e 5% de leite desnatado, pH 7,2, por 1 hora a 37°C. Após cinco lavagens com PBST, 100 µL/poço dos soros, diluídos em PBST com 2% de leite desnatado, foram incubados por 1 hora a 37° C. As placas foram então lavadas mais cinco vezes com PBST, e 100 µL/poço de conjugado anti-IgG bovino (cadeia pesada) com peroxidase (Sigma, A5295), diluído em PBST a 1:10.000 adicionados aos poços. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C, e após cinco lavagens com PBST, 50 µL/poço do cromógeno/substrato Fast OPD (Sigma, P9187) foram adicionados. As reações foram interrompidas pela adição de H₂SO₄ (2,5N) e os resultados obtidos em leitor EL-800 (Bio-Tek), com filtro de 490 nm.

Para minimizar a variação entre as placas, foi feita a normalização das absorbâncias dos ELISAs segundo o protocolo descrito por Ramanakumar et al. (2010).

Análise estatística - Os pontos de corte para os ensaios foram determinados por curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) (METZ, 1978; ZWEIG e CAMPBELL, 1993), utilizando o programa MedCalc versão 10.3.0.0.

Resultados

Produção de proteínas recombinantes - Os fragmentos correspondentes à região codificante dos genes *cfp-10*, *esat-6*, *mb0143*, *mpb83*, *pe5*, *pe13*, *tb10.4* e *tb15.3* foram amplificados por PCR, gerando produtos de 300, 288, 459, 604, 219, 270, 231, 408 pares de bases (pb), respectivamente.

Na análise da expressão dos genes por SDS-PAGE, foi possível visualizar as proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6, Mb0143, MPB83, PE5, PE13, TB10.4, TB15.3 e a quimera com 13,6; 12,9; 20,5; 28,5; 12,5; 17,5; 11,6; 17,5 e 35 kilodaltons (KDa), respectivamente. As massas observadas das proteínas recombinantes foram compatíveis com a análise feita no programa EditSeq (DNASar), a partir da tradução *in silico* das sequências codificantes de cada gene, associadas às sequências codificantes dos vetores plasmidiais. No *Western blot*, todas as proteínas recombinantes deste estudo foram reconhecidas pelo anticorpo anti-6xhistidina, confirmando a expressão dos genes.

ELISAs - Na padronização dos testes, as diluições ótimas para as proteínas recombinantes e soro estão descritas na Tabela 2. Para avaliar a acurácia dos ELISAs, foram obtidas amostras de soro de bovinos positivos ao TCC e bovinos negativos ao TCC provenientes de diferentes estados brasileiros. Todas as amostras foram processadas por técnicos sem conhecimento prévio do *status* dos animais (baseado em tuberculização cervical comparativa) cujas amostras eram provenientes.

As distribuições das absorvâncias normalizadas do teste ELISA estão demonstradas na Figura 1.

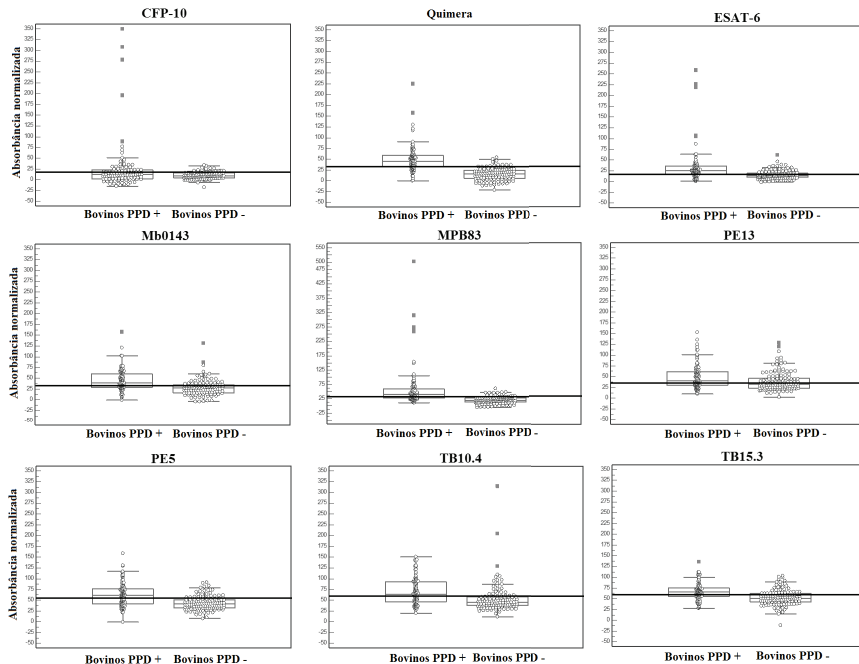


Figura 1: Distribuições das absorvâncias normalizadas dos testes ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*.

Os resultados de sensibilidade e especificidade foram expressos tomando o TCC como teste padrão. As sensibilidades dos testes variaram entre 28,0% e 83,2% e especificidades entre 58,7% a 92,9%. A maior especificidade (92,9%) do teste ELISA com CFP-10 foi devido à baixa sensibilidade do teste.

Pela análise com o teste *kappa*, somente o ELISA com a quimera recombinante apresentou uma boa concordância com o TCC (Índice *kappa*: 0,688; intervalo de confiança: 0,595 - 0,782). Os ensaios ELISAs com as proteínas recombinantes ESAT-6, MPB83 e PE5 apresentaram uma concordância média com o TCC (Índice *kappa*: 0,447; 0,554 e 0,404 respectivamente) e os demais ensaios apresentaram concordâncias mínimas com o TCC (Índice *kappa*: < 0,4).

As distribuições das absorvâncias normalizadas dos soros provenientes de bovinos de rebanhos livres de tuberculose apresentaram níveis semelhantes dos soros de bovinos TCC positivos (Figura 2).

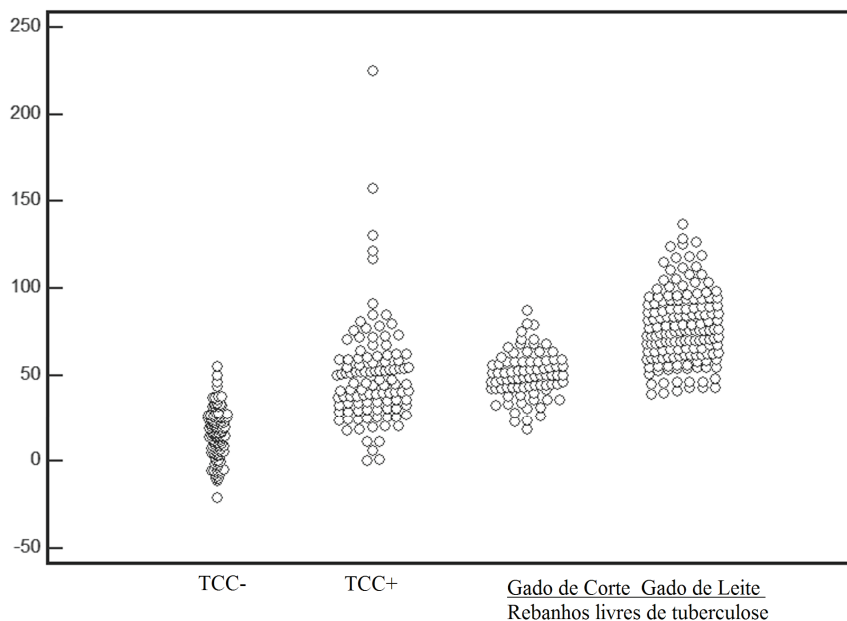


Figura 2: Distribuições das absorvâncias normalizadas dos testes ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos ou negativos ao teste de tuberculização cervical comparativo (TCC) e em bovinos provenientes de rebanhos certificados livres de tuberculose.

Discussão

A fusão de epitopos de ESAT-6, MPB70 e MPB83 apresentou melhor desempenho do que os ensaios com ESAT-6 ou MPB83 separadamente. Não foi possível analisar o desempenho da MPB-70 isoladamente como antígeno devido a problemas encontrados no processo de purificação desta proteína recombinante. A cinética da resposta dos anticorpos aos diferentes antígenos de *M. bovis* é variável após

a infecção. Anticorpos anti- MPB-83 podem ser detectados na fase inicial da infecção, cerca de quatro semanas após a infecção (WATERS et al. 2006). Anticorpos anti- ESAT-6 podem ser detectados 12 semanas após a infecção experimental (LYASHCHENKO et al. 1998). A cinética da resposta imune humoral contra diferentes antígenos de *M. bovis* é variável após infecção. Anticorpos contra MPB83 podem ser detectados relativamente cedo, normalmente em torno de 4 semanas pós-infecção (WATERS et al. 2006). Anticorpos contra ESAT-6 podem ser detectados 12 semanas após infecção experimental (LYASHCHENKO et al. 1998). Já os anticorpos para MPB70 são detectados cerca de 18 a 22 meses após a infecção experimental, ou seja, nos estágios mais avançados da doença (HARBOE et al. 1990; FIFIS et al. 1992).

Assim, espera-se que quimeras contendo importantes epitopos das principais proteínas de *M. bovis* sejam capazes de detectar anticorpos nos bovinos em diferentes fases da infecção, aumentando a cobertura diagnóstica. Resultados semelhantes são encontrados em um ensaio de quimioluminescência com múltiplos antígenos, em que a sensibilidade e especificidade foram superior a este mesmo teste utilizando antígenos individuais, incluindo ESAT-6 e MPB83 (WHELAN et al. 2008). A escolha para a produção da quimera em vez de um coquetel de antígenos individuais é justificada pela facilidade de uma única expressão e purificação da proteína, com baixos custos e sem problemas em relação à proporção dos diversos antígenos.

Os pontos de corte para os ensaios foram determinados por curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC), que resultou no caso do ELISA com a quimera uma sensibilidade de 83,2% e especificidade de 86,5%, tendo como teste padrão o TCC. Com base em uma especificidade de 95,0%, a sensibilidade relativa foi de 67,3%, semelhantes aos encontrados em outro estudo usando outra quimera com os mesmos antígenos, no qual foram obtidas sensibilidade de 69,4% e especificidade de 96,0% (LIU et al. 2007). Além disso, um teste ELISA comercial para anticorpos contra *M. bovis*, usando os antígenos recombinantes MPB70 e MPB83

forneceu bom desempenho com sensibilidade de 63,0% e especificidade de 98,0% em bovinos naturalmente infectados (WATERS et al. 2011). Estes resultados demonstram o potencial destes antígenos em testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *M. bovis*.

Além dos antígenos mais utilizados em testes sorológicos (ESAT-6, MPB70 e MPB83), outros antígenos têm demonstrado resultados promissores em testes celulares e sorológicos, como CFP-10, Mb0143, PE13, TB10.4 e TB15.3 (AAGAARD et al. 2003; AAGAARD et al. 2006). Dentre estes antígenos, somente o ELISA com PE5 demonstrou uma média concordância com o TCC. Nosso grupo de pesquisa também encontrou resultados promissores com a PE5 em teste intradérmico em bovinos experimentalmente imunizados com a cepa inativada AN5 de *M. bovis* (Dados não demonstrados). O potencial deste antígeno em uma quimera será avaliado posteriormente no ELISA para detecção de anticorpos contra *M. bovis*.

A similaridade entre as respostas das duas propriedades certificadas como livres de tuberculose bovina e os animais positivos ao teste de tuberculinização cervical comparativa, sugere que as repetidas tuberculinizações possam atuar como um booster para produção de anticorpos, conforme descrito em outros estudos para tuberculose bovina (HARBOE et al. 1990; MONAGHAN et al. 1994) e paratuberculose (VARGES et al. 2009). Outra possibilidade é a sensibilização dos animais negativos com micobactérias ambientais, e reações cruzadas com os antígenos. No entanto, com os animais da Embrapa Gado de Corte, que foram tuberculinizados apenas do dia da coleta das amostras de soro, a discriminação foi clara. Por esta razão, o ensaio ELISA é uma técnica útil para a identificação de rebanhos positivos para tuberculose antes da realização do teste intradérmico.

Como em muitos países, o diagnóstico da tuberculose bovina no Brasil é baseado no teste intradérmico. Este teste é bastante laborioso, já que necessita a contenção dos bovinos para a tricotomia, leitura da espessura cutânea e inoculação intradérmica das tuberculinas. Além disso, após 72 horas, é necessária uma nova contenção para a leitura

dos resultados (BRASIL, 2004). Com isso, limita a execução do teste em rebanhos numerosos ou em fazendas sem as instalações adequadas, que é uma situação muito comum em países em desenvolvimento. Acredita-se que estes problemas mencionados seja uma das principais razões pelos quais levantamentos epidemiológicos da tuberculose planejados pelo programa de erradicação desta enfermidade no Brasil estejam atrasados em relação aos programas da brucelose.

Um ensaio baseado em anticorpos, tal como o ELISA com a quimera, seria uma possibilidade para a identificação de rebanhos livres de tuberculose, utilizando soros coletados para outros estudos epidemiológicos, como para a Brucelose, antes da realização do teste intradérmico, aumentando, assim, a cobertura diagnóstica.

Acredita-se também, que o teste ELISA possibilitaria a identificação de bovinos em estágios avançados da doença, pois no teste intradérmico estes animais não respondem ao teste devido ao quadro de anergia ocasionando resultado falso – negativo (WHELAN et al. 2011).

Agradecimentos

Apoio financeiro do CNPq (proc. 505837/2008-0) e EMBRAPA (02.08.06.004.0000).

Referências bibliográficas

AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V.; VALLECILLO, A. J.; GUTIERREZ-PABELLO, J. A.; SUAREZ-GÜEMES, F.; McNAIR, J.; CATALDI, A.; ESPITIA, C.; ANDERSEN, P.; POLLOCK, J. M. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 12, p. 4326-4335, 2006.

AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MENG OKKELS, L.; ANDERSEN, P.; POLLOCK, J. M. Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 8, n. 8, p. 3719-3728, 2003.

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, n. 4, p. 379-389, 2002.

ANSARI-LARI, M. Comparison between two tests results, kappa statistic instead of simple overall agreement. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 133, p. 369-370, 2005.

BENNETT, R. M.; COOKE, R. J. Costs to farmers of a tuberculosis breakdown. **Veterinary Record**, Inglaterra, v. 158, n. 13, p. 429-432, 2006.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Sanitária. Instrução Normativa nº 6, de 8 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção 1, p. 6-10, 12 jan. 2004.

BUDDLE, B. M.; NOLAN, A.; McCARTHY, A. R.; HESLOP, J.; ALDWELL, F. E.; JACKSON, R. Evaluation of three serological assays for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in brushtail possums. **New Zealand Veterinary Journal**, Nova Zelândia, v. 43, n. 3, p. 91-95, 1995.

FARIAS, T. A.; ARAÚJO, F. R., OSÓRIO, A. L. A. R.; JORGE, K. S. G.; RAMOS C. A. N.; SOUZA, I. I. F.; AZAMBUJA, A.; SOARES, C. O.; SILVA, M. R.; PELLEGRIN A. O. ELISA based on recombinant MPB70 and P27 for detection of antibodies against *Mycobacterium bovis*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, p. 155-162, 2012.

FIFIS, T.; COSTOPOULOS, C.; CORNER, L. A.; WOOD, P. R. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 30, p. 343-354, 1992.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J. C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; 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, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Microbiology**, Washington, v. 100, p. 7877-7882, 2003.

GUTIERREZ, M.; TELLECHEA, J.; GARCIA MARIN, J. F. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.62, p. 281-290, 1998.

HARBOE, M.; WIKER, H. G.; DUNCAN, J. R.; GARCIA, M. M.; DUKES, T. W.; BROOKS,

B. W.; TURCOTTE, C.; NAGAI, S. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, p. 913-921, 1990.

LECHTZIER, V.; HUTORAN, M.; LEVY, T.; KOTLER, M.; BRENNER, T.; STEINITZ, M. Sodium dodecyl sulphate-treated proteins as ligands in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, Holanda, v. 270, n. 1, p. 19-26, 2002.

LILEBAUM, W.; PESSOLANI, M. C. V.; FONSECA, L. S. F. The use of Ag85 complex as antigen in elisa for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 48, p. 161-166, 2001.

LIU, S.; GUO, S.; WANG, C.; SHAO, M.; ZHANG, X.; GUO, Y.; GONG, Q. A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 87, p. 212-217, 2007.

LYASHCHENKO, K. 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. 5344-5449, 1998.

MATTOW, J.; SCHAIBLE, U. E.; SCHMIDT, F.; HAGENS, K.; SIEJAK, F.; BRESTRICH, G.; HAESELBARTH, G.; MÜLLER, E. C.; JUNGBLUT, P. R.; KAUFMANN, S. H. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3405-3420, 2003.

MEIKLE, V.; ALITO, A.; LLERA, A. S.; GIOFFRÉ, A.; PERALTA, A.; BUDDLE, B. M.; CATALDI, A. Identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 9, p. 1352-1359, 2009.

MENZIES, D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Estados Unidos, v. 159, n. 1, p. 15-21, 1999.

METZ, C. E. Basic principles of ROC analysis. **Seminars in Nuclear Medicine**, Estados Unidos, v. 8, n. 4, p. 283-298, 1978.

MICHEL, A. L.; COOPER, D.; JOOSTE, J.; DE KLERK, L. M.; JOLLES, A. Approaches towards optimising the gamma interferon assay for diagnosing *Mycobacterium bovis* in-

fection in African buffalo (*Syncerus caffer*). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 98, n. 2-3, p. 142-151, 2011.

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F.; QUINN, P. J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 111-124, 1994.

RAMANAKUMAR, A. V.; THOMANN, P.; CANDEIAS, J. M.; FERREIRA, S.; VILLA, L. L.; FRANCO, E. L. Use of the normalized absorbance ratio as an internal standardization approach to minimize measurement error in enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human papillomavirus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 3, p. 791-796, 2010.

RODRIGUEZ, J. G.; MEJIA, G. A.; DELL PORTILLO, P.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, Washington, v. 141, n. 9, p. 2131-2138, 1995.

VARGES, R.; MARASSI, C. D.; OELEMANN, W.; LILENBAUM, W. Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. **Research in Veterinary Science**, Inglaterra, v. 86, n. 3, p. 371-372, 2009.

WATERS, W. R.; BUDDLE, B. M.; VORDERMEIER, H. M.; GORMLEY, E.; PALMER M. V.; THACKER, T. C.; BANNANTINE, J. P.; STABEL, J. R.; LINSKOTT, R.; MARTEL, E.; MILIAN, F.; FOSHAUG, W.; LAWRENCE, J. C. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 18, n. 11, p. 1882-1888, 2011.

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.

WHELAN, C.; SHURALEV, E.; KWOK, H. F.; KENNY, K.; DUIGNAN, A.; GOOD, M.; DAVIS, W. C.; CLARKE, J. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 23, n. 3, p. 499-503, 2011.

WHELAN, C.; SHURALEV, E.; O'Keefe, G.; HYLAND, P.; KWOK, H. F.; SNODDY, P.; O'Brien, A.; CONNOLLY, 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.

WOBESER, C. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: An updated history. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Guelph, v. 50, n. 11, p. 1169-1176, 2009.

ZWEIG, M. H.; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clinical Chemistry**, Estados Unidos, v. 39, n. 4, p. 561-577, 1993.



Gado de Corte

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**

CGPE 12273