

T636.083 69

R 375p

2004



Elizabeth Fonseca dos Reis

**PURIFICAÇÃO DE MPB70 RECOMBINANTE E APLICAÇÃO EM TESTES
DE DIAGNÓSTICO PARA A TUBERCULOSE BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2004

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
DA UFMG
21/06/05
1026505-08

370381

R375p. Reis, Elizabeth Fonseca dos, 1965-

Purificação de MPB70 recombinante e aplicação em testes de diagnóstico para a tuberculose bovina / Elizabeth Fonseca dos Reis. – 2004.
94 p. : il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Tuberculose em bovino – Diagnóstico - Teses.
3. Teste tuberculínico – Teses. I. Lobato, Zélia Inês Portela. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 969

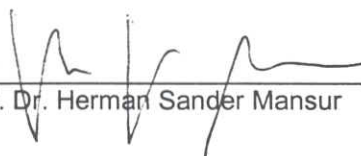
Tese defendida e aprovada em 02 de junho de 2004, pela Comissão Examinadora constituída por:



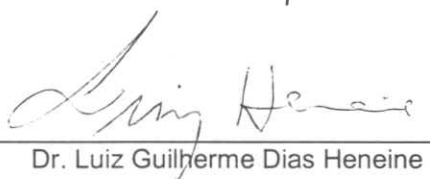
Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato
Orientadora



Prof. Dr. Andrey Pereira Lage



Prof. Dr. Herman Sander Mansur



Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine



Prof. Dr. José Maciel Rodrigues Júnior

À minha mãe Maria, por ter-me ensinado caminhos corretos para que eu pudesse atingir meus ideais, pelo exemplo de vida que é, por ter sempre apoiado minhas decisões.

À memória de meu pai, ao meu marido Rogério, aos meus irmãos e sobrinhas pelo amor carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter colocado todos vocês em meu caminho e a chance de realizar um sonho.

À Profa. Zélia Inês Portela Lobato, meus maiores agradecimentos pela compreensão, amizade, credibilidade, incentivo e orientação concedidos para o desenvolvimento deste trabalho. Sou eternamente grata pela oportunidade que me foi concedida.

Ao Prof. Luis Guilherme Heneine, pela orientação durante as técnicas de purificação de proteína, incentivo, amizade e convívio.

Ao Prof. Herman S. Mansur pela orientação nas técnicas de síntese dos hidrogéis e ajuda na interpretação dos espectros de Infravermelho.

Aos Prof. Andrey Pereira Lage, Prof. Francisco Lobato, Prof. Rômulo Cerqueira Leite, pelo apoio durante a realização desse trabalho.

À coordenadora do Curso de Pós-graduação Prof. Lygia Maria Friche Passos pela compreensão, e toda a equipe desse Colegiado pela simpatia, dedicação e disponibilidade.

Aos amigos do Laboratório de imunologia da FUNED, Patrícia Cota, Álvaro, Paulo, Augusto, Horácio pelo convívio, amizade, companheirismo, uma nova família que deixavam mais prazeroso o trabalho do dia-dia mesmo quando os resultados não eram bons.

Aos amigos e colegas de curso por sempre me encorajar a transpor os obstáculos, pela paciência, em especial, Simone Magela, Aymara, Simone Renault, Giovanna, Fábria, Telma, Paula, Kika, Ana Cláudia, Karina, Luciana.

A todos os demais professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia da Escola de Veterinária que contribuíram para minha formação científica. Aos funcionários em especial, Ângela, Eduardo, Leandro, Nádia, Joãozinho, Creuza e Doraci.

À minha mãe, Rogério, meus irmãos e sobrinhos, o meu carinho e os méritos dos êxitos aqui alcançados.

A meu Pai pela eterna presença.

A CAPES, CNPq, FAPEMIG, FINEP e FIEMG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	RESUMO	12
	ABSTRACT	13
1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Tuberculose Bovina.....	14
2.2	Taxonomia.....	16
2.3	Antígenos das micobactérias.....	16
2.4	Proteína MPB70.....	17
2.4.1	Testes diagnósticos utilizando MPB70.....	18
2.4.1.1	Testes envolvendo imunidade humoral.....	18
2.4.1.2	Testes envolvendo imunidade celular.....	20
2.5	Métodos de diagnóstico para tuberculose bovina.....	20
2.6	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose.....	21
2.7	Biosensores.....	22
2.7.1	Hidrogéis e híbridos de PVA.....	22
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Esquema representativo da produção da MPB70r.....	24
4.1.1	Extração e Análise do DNA do <i>Mycobacterium bovis</i> AN5 (Bödinghaus et al., 1990).....	25
4.1.2	Amplificação do gene da MPB70 madura por PCR.....	25
4.1.3	Análise do fragmento amplificado.....	26
4.1.4	Produção de DNA recombinante em vetor de clonagem molecular.....	26
4.1.5	Transformação bacteriana em <i>Escherichia coli</i> JM 109 competente.....	26
4.1.6	Caracterização de clones recombinantes por PCR.....	27
4.1.7	Amplificação dos clones positivos em pequena escala.....	27
4.1.8	Purificação do plasmídeo pGEM [®] -T recombinante em pequena escala.....	27
4.1.9	Extração e purificação do inserto clonado no plasmídeo pGEM [®] -T.....	28
4.1.10	Clonagem do inserto purificado no vetor de expressão pQE30.....	28
4.1.11	Transformação bacteriana em <i>Escherichia coli</i> M15.....	28
4.1.12	Caracterização de clones recombinantes por PCR.....	29
4.1.13	Seqüenciamento do vetor de expressão recombinante.....	29
4.1.14	Estudo da cinética de expressão da MPB70 recombinante (MPB70r) em pequena escala.....	29
4.1.15	Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE) da proteína induzida.....	30
4.1.16	Determinação da solubilidade da proteína MPB70r.....	30
4.2	Purificação da MPB70r.....	30
4.2.1	Processo de purificação da MPB70r através de cromatografia de afinidade metálica (Ni-NTA).....	31
4.2.2	Ultrafiltração.....	31
4.2.3	Eletroeluição.....	32
4.2.3.1	Membrana de diálise.....	32
4.2.3.2	Electro-eluter.....	32
4.2.3.3	Mini whole Gel eluter.....	32
4.2.4	Processo de purificação da proteína por gel filtração.....	32

4.2.4.1	Gel filtração em Sephadex G-50.....	32
4.2.4.2	Gel filtração em sistema de FPLC (Cromatografia líquida rápida para proteína).....	33
4.3	Produção de soros imunes anti-MPB70r, anti- <i>M.bovis</i> e anti- <i>M. avium</i>	33
4.4	Imunodiagnósticos.....	33
4.4.1	Anticorpos utilizados.....	34
4.4.2	Western Blot (WB).....	34
4.4.3	ELISA.....	36
4.5	Síntese de materiais alternativos para uso como suporte nos testes de ELISA.....	36
4.5.1	Síntese de hidrogéis de álcool polivinílico (PVA).....	37
4.5.2	Análises dos hidrogéis e dos discos híbridos por espectroscopia na região do infravermelho.....	37
4.5.3	ELISA usando como suporte hidrogel e híbridos de PVA.....	37
4.6	Análises Estatísticas.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Produção da MPB70r.....	38
5.1.1	Extração do DNA do <i>M. bovis</i> e amplificação do Gene da MPB70 madura por PCR.....	38
5.1.2	Transformação e comprovação por PCR da presença do pGEM [®] -T recombinante na bactéria hospedeira.....	39
5.1.3	Expansão, purificação e quantificação do DNA plasmidial dos clones recombinantes.....	41
5.1.4	Extração do gene da MPB70 madura do plasmídeo pGEM [®] -T.....	41
5.1.5	Transformação e confirmação da presença do pQE30 recombinante nas culturas de <i>Escherichia coli</i> M15 transformadas.....	43
5.1.6	Seqüenciamento do pQE30 recombinante.....	43
5.1.7	Expressão da MPB70r em pequena escala.....	49
5.1.8	Determinação da solubilidade da MPB70r.....	51
5.2	Processos de purificação da MPB70r e verificação de sua reatividade em testes de ELISA e WB.....	53
5.2.1	Purificação da MPB70r por cromatografia de afinidade metálica (Ni-NTA).....	53
5.2.1.1	Western Blot (WB).....	55
5.2.1.2	ELISA utilizando na fase sólida MPB70r purificada em Ni-NTA.....	59
5.2.2	Purificação da MPB70r por ultrafiltração.....	61
5.2.3	Purificação da MPB70r por Eletroeluição.....	61
5.2.4	Purificação por gel filtração em Sephadex G-50.....	61
5.2.5	Purificação da MPB70r por gel filtração em sistema de FPLC.....	61
5.2.5.1	WB.....	63
5.2.5.2	ELISA indireto utilizando MPB70r purificada em sistema de FPLC.....	65
5.2.5.3	Teste de estabilidade.....	74
5.3	Síntese dos hidrogéis.....	75
5.3.1	Análises espectroscópicas dos hidrogéis sintetizados.....	75
5.3.2	Adsorção da MPB70r nas matrizes poliméricas dos hidrogéis sintetizados.....	82
5.3.3	Análises dos hidrogéis como suportes nos ensaios de ELISA indireto com proteína MPB70r purificada em sistema de FPLC.....	83
6	CONCLUSÕES.....	84
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
Anexo 1	Vetor de clonagem molecular pGEM [®] -T.....	88
Anexo 2	Vetor de expressão pQE30.....	89

Anexo 3	Resultado das fases de leituras da MPB70r feitas através do programa "Translate Tool".....	90
Anexo 4	Resultado da Análise de identidade da seqüência nucleotídica da MPB70r no "GenBank" pelo programa Basic Local Alignment Search Tool – BLAST N	91
Anexo 5	Resultado da Análise de identidade da MPB70r com proteínas depositadas no "GenBank" pelo programa Basic Local Alignment Search Tool – BLAST X.....	92
Anexo 6	Resultado da Análise das características MPB70r através do programa ProParam tool	93
Anexo 7	Resultado da Análise das características MPB70 nativa através do programa ProParam tool.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Interpretação do teste cervical simples em bovinos	22
Tabela 2	Soros de animais de campo relacionados por rebanho utilizados nos ELISA e WB	35
Tabela 3	Estimativa da concentração de DNA plasmidial recombinante dos clones de <i>E. coli</i> JM 109 transformada por pQE30 recombinante	41
Tabela 4	Ensaio de ELISA indireto desenvolvidos em placas Nunc [®] sensibilizadas com MPB70r purificada em Ni-NTA em 60 soros de animais do rebanho 6 não reagentes à tuberculinização	61
Tabela 5	Ensaio de ELISA indireto desenvolvidos em placas Nunc [®] sensibilizadas com MPB70r purificada em coluna de afinidade pelo níquel e em sistema de FPLC	68
Tabela 6	Ensaio de ELISA indireto desenvolvidos em placas Nunc [®] sensibilizadas com MPB70r purificada em sistema de FPLC	69
Tabela 7	Valores preditivos positivos e negativos em diferentes prevalências considerando sensibilidade 38,7% e Especificidade 100%	73
Tabela 8	Teste de viabilidade de placas Nunc [®] sensibilizadas com MPB70r e mantida a 4°C e testadas em testes de ELISA em diferentes dias	75
Tabela 9	Mapa simplificado de absorção na região do infravermelho de diversos grupamentos químicos.....	77
Tabela 10	ELISA indireto com MPB70r purificada em sistema de FPLC utilizando hidrogéis de PVA + GA como suporte	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação gráfica dos dados referentes à Tabela 6.....	70
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Seqüência de Nucleotídeos do gene codificador para MPB70	26
Figura 2	Gene da MPB70 madura amplificado por PCR a partir de diferentes concentrações de DNA do <i>M. bovis</i> AN5	39
Figura 3	Produtos da PCR das colônias de <i>Escherichia coli</i> JM109 transformadas com pGEM-T [®] recombinante	39
Figura 4	Produto da digestão enzimática dos plasmídeos provenientes dos clones de <i>E. coli</i> JM109.....	43
Figura 5	Produtos da PCR de nove clones de <i>E. coli</i> M15 transformada com pQE30 recombinante.....	45
Figura 6	Seqüência editada dos nucleotídeos da MPB70r no pQE30 recombinante	47
Figura 7	Cinética de indução da expressão da MPB70r em <i>E. coli</i> M15 transformada com pQE30 antes e após indução por IPTG	49
Figura 8	Determinação da solubilidade da MPB70r produzida nas culturas de <i>E. coli</i> transformadas e crescidas a 37°C.....	51
Figura 9	Determinação da solubilidade da MPB70r no sobrenadante e no precipitado da cultura do clone (A) incubada a 30°C em tempos variados.	53

Figura 10	MPB70r purificada por cromatografia de afinidade metálica (Ni-NTA) a partir do clone A	55
Figura 11	Western Blot em membrana contendo lisados de <i>E. coli</i> , de <i>M. bovis</i> e MPB70r purificada Ni-NTA	57
Figura 12	Western Blot em membrana contendo MPB70r purificada por cromatografia em Ni-NTA tratadas com diferentes soros	59
Figura 13	Purificação da MPB70r por gel filtração em sistema de FPLC	62
Figura 14	Western blot em membrana com MPB70r purificada por gel filtração em sistema de FPLC	63
Figura 15	Ensaio de ELISA indireto desenvolvidos em placas Nunc [®] sensibilizadas com MPB70r purificada em sistema de FPLC em diferentes concentrações	66
Figura 16	Figura adaptada do trabalho de Lightbody et al., 1998 - Resposta anti-antígeno recombinante nos animais 193 e 198, experimentalmente infectado com 10 ⁷ UFC <i>Mycobacterium bovis</i>	71
Figura 17	Figura adaptada do trabalho de Harboe et al., 1990 - Relação entre anti-MPB70 e resposta de hipersensibilidade do tipo tardia	72
Figura 18	Hidrogel de álcool polivinílico sintetizados com agente reticulador glutaraldeído	77
Figura 19	Espectro de FTIR dos hidrogéis de PVA adsorvidos ou não com MPB70r	80
Figura 20	Espectros de FTIR dos hidrogéis e discos híbridos de PVA	81
Figura 21	Espectros de FTIR dos hidrogéis e discos híbridos de PVA adsorvido ou não com MPB70r	82

ABREVIATURAS

A – Absorvância

pb – pares de bases

UFC - Unidade formadora de colônia

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ELISA – Ensaio imunossorbente ligado a enzima

FPLC Cromatografia Líquida rápida para proteína

g – gravidade

rpm – rotações por minuto

MPB70r – Antígeno MPB70 recombinante

Ni-NTA - Coluna de afinidade por níquel

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia

PNCEBT - Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

PPD – Derivado Protéico Purificado

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida usando Sódio Duodecil Sulfato

U – Unidades

UI - Unidades internacionais

UV – Ultravioleta

UV-VIS – Ultravioleta – Visível

W - Watt

WB – Western Blot

RESUMO

A MPB70 recombinante (MPB70r) foi produzida e usada em testes sorológicos. A seqüência da MPB70 madura foi amplificada por PCR a partir do DNA do *Mycobacterium bovis* AN5. O fragmento amplificado foi usado em sistema de expressão empregando procariotos. No ELISA indireto desenvolvido utilizando-se a MPB70r produzida na fase sólida foi verificada reação com anticorpo monoclonal anti-MPB70 e com soros de bovinos reagentes à tuberculinização, não reagindo com soros bovinos com paratuberculose e bovinos sensibilizados com *Myconbacterium avium*. Os resultados obtidos foram comparados aos resultados da tuberculinização e mostraram especificidade 99% e sensibilidade relativa baixa, pois o tipo de resposta imunológica medida pelos dois testes é diferente. Porém a sensibilidade do teste aumentou para 92% quando o mesmo foi utilizado em paralelo com a tuberculinização sem alteração da especificidade. A fim de produzir materiais alternativos como suporte para ensaios imunológicos foram sintetizados e caracterizados quimicamente por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) hidrogéis com base polimérica de álcool polivinílico (PVA) / glutaraldeído (GA) e híbridos contendo GA e/ou tetraetil ortossilicato (TEOS) adsorvidos ou não da proteína MPB70 recombinante (MPB70r). Os espectros FTIR dos dispositivos mostraram as regiões de absorção das ligações químicas específicas do PVA (ν_{O-H} , ν_{C-H} , ν_{C-H_2}) e do GA (ν_{C-H} , $\nu_{C=O}$) confirmando a formação do hidrogel de PVA + GA. As ligações químicas que confirmaram a formação dos híbridos PVA + TEOS e PVA + GA + TEOS estavam presentes nos picos referentes às regiões de absorção das ligações dos grupos característicos do PVA, GA e do TEOS ($\nu_{Si-O-Si}$, ν_{Si-OH}). Já nos dispositivos que sofreram adsorção direta da MPB70r foram identificados por FTIR os grupamentos específicos e os picos referentes às ligações das amidas I, II e III, ligações estas normalmente encontradas nas estruturas das proteínas, confirmando que houve adsorção protéica nos dispositivos. Com os dispositivos adsorvidos com a MPB70r foi realizado um teste de imunoensaio, ELISA, para a detecção de anticorpos contra esta proteína em soros de bovinos reagentes a prova de tuberculinização. Simultaneamente o mesmo ensaio foi realizado em placas de polietileno, próprias para ensaios de ELISA, a mesma proteína foi adsorvida e os mesmos soros testados.

Palavras-chave: Tuberculose bovina, MPB70 recombinante, diagnóstico, ELISA, Hidrogel, FTIR, Caracterização espectroscópica.

ABSTRACT

Recombinant MPB70 (rMPB70) was produced and used in serological tests. The native MPB70 sequence was amplified by PCR from *Mycobacterium bovis* AN5 DNA. The amplified fragments were used in prokaryote expression systems. In this study, an indirect ELISA was developed using the rMPB70 produced immobilized in solid-phase. rMPB70 were recognized by the anti-MPB70 monoclonal antibodies and bovine tuberculin positive serum in ELISA test. Serological cross-reactions with bovine paratuberculosis serum or *Mycobacterium avium* weren't observed. The described ELISA showed high specific (99%) but low sensibility when results were compare to tuberculin tests. Immune responses mediated in both assays are different. The sensibility of 92% could be reach if both tests were simultaneous realized without lost of specificity. Polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl alcohol - glutaraldehyde (PVA-GA) hydrogels and hybrids PVA- TEOS (tetraethylorthosilicate) and PVA-GA-TEOS with and without recombinant MPB70 protein (rMPB70) incorporated were produced and chemically characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). FTIR spectra of the devices showed the absorption regions of the specific chemical groups of PVA (ν_{O-H} , ν_{C-H} , ν_{C-H_2}) and of GA (ν_{C-H} , $\nu_{C=O}$) confirming the formation of PVA-GA hydrogel. The chemical groups that confirmed the formation of PVA-TEOS and PVA-GA-TEOS hybrids were present. For the devices with the adsorbed rMPB70, FTIR identified the specific groups of amides I, II and III, which are normally found in protein structures, confirming that there was protein adsorbed in the devices. An indirect ELISA test was developed using these devices to detect antibodies against this protein in serum samples from bovine that were positive in the tuberculin test. As control a parallel test was performed in microtiter plates without the device.

Keywords: Bovine tuberculosis, rMPB70, diagnosis, ELISA, PVA hydrogel, FTIR, Spectroscopy characterization

1 - INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é considerada um problema de saúde animal e pública. Os casos de tuberculose pulmonar humana devido aos *Mycobacterium bovis* ou *Mycobacterium tuberculosis* são indistinguíveis do ponto de vista clínico, radiológico e patológico. A transmissão do *M. bovis* dos bovinos ao homem pode ocorrer pelo consumo de leite e seus derivados e, com menor frequência, pelo consumo de carne contaminada. A infecção também pode ocorrer por inalação ou por lesões na pele, sendo o risco maior para trabalhadores rurais, magarefes, veterinários, e outros grupos que estejam em freqüente contato com bovinos (Cosivi et al., 1998).

A tuberculose bovina acarreta prejuízos para o produtor como, perda de produção, perda de animais de alto valor zootécnico além de sua propriedade ser designada como positiva para a doença (Cosivi et al., 1988). Em termos globais, há prejuízos na economia regional e nacional, pois as recomendações internacionais que regulam o comércio de animais vivos e de produtos de origem animal, requerem que esses sejam originários de países ou áreas livres de infecção.

O método de diagnóstico da tuberculose bovina considerado como padrão internacional é a tuberculinização intradérmica. Este teste baseia-se na reação de hipersensibilidade do tipo IV empregando tuberculina bovina derivada de proteínas purificadas do *M. bovis* AN5 (PPD) (Monaghan et al., 1994; Thoem e Bloom, 1995). Os maiores problemas do método de tuberculinização consistem na ocorrência de reações falso-negativas, dificuldade na leitura, período de leitura longo (72 horas), grande número de reações duvidosas e necessidade de 60 ou 90 dias para a realização de novas provas para confirmação do diagnóstico (Monaghan et al., 1994).

Grandes esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de ensaios

sorológicos como testes alternativos para o diagnóstico da tuberculose bovina. Bem como buscas de antígenos espécie-específicos para serem usados em tais testes.

A proteína MPB70, antígeno imunodominante do *M. bovis*, é o candidato mais promissor devido a sua capacidade de desencadear a resposta imune de hipersensibilidade do tipo IV, estimular a produção anticorpos e de interferon gama (IFN- γ).

Mediante a implantação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose em âmbito nacional tornaram-se necessárias alternativas inovadoras para o diagnóstico da infecção por *M. bovis*. Nesse trabalho foi descrita a produção, purificação da MPB70 recombinante (MPB70r) e verificada a sua reatividade por Western blot e ELISA indireto utilizando soros de animais infectados ou não com *M. bovis*. Foram sintetizados e estudados simultaneamente suportes alternativos para testes de ELISA a base de álcool polivinílico (PVA) para imobilização da MPB70r no intuito de baixar custos e oferecer diversas alternativas de leitura ao teste de diagnóstico.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Tuberculose bovina

A tuberculose bovina é uma doença de evolução crônica de animais e do homem causada pelo *Mycobacterium bovis*. Caracteriza-se pela formação de lesões granulomatosas com aspecto nodular denominadas tubérculos. As lesões podem ser observadas mais freqüentemente em linfonodos, pulmão, intestino, fígado, baço, pleura e peritônio.

É uma zoonose de distribuição mundial e sua prevalência é maior nos países em desenvolvimento e menor nos países desenvolvidos, onde se encontra em fase avançada de controle e erradicação (Cosivi et al., 1998).

Na América Latina e Caribe, segundo Kantor e Ritacco (1994), dos 300 milhões de bovinos, 73,7% estão em áreas com prevalência de tuberculose maior que 1%. Brasil e Argentina possuem juntos 3,5 milhões de bovinos infectados, isso representa quase 2% da população bovina existente. A prevalência de animais tuberculosos no Brasil e Argentina foi estimada por esses autores em 1%.

Os dados de notificação oficial de tuberculose bovina indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998. Em um levantamento de tuberculose bovina realizado em 1999 em Minas Gerais nas Regiões do Triângulo Mineiro, Centro e Sul de Minas Gerais envolvendo 1.586 propriedades e 22.990 animais, empregando-se a prova alérgica, estimou a prevalência aparente de animais infectados em 0,8% (Belchior, 2001). No mesmo estudo foram detectados 5% de propriedades com animais reagentes e, sendo importante destacar que este valor subiu para 15% no universo de propriedades de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção.

Baptista (1999) encontrou uma prevalência, de lesões tipo tuberculosas, de 0,48% em bovinos de corte abatidos em onze frigoríficos mineiros, sujeitos a Inspeção Federal, entre 1993 e 1997. De todos os animais abatidos cerca de 74% provinham de Minas Gerais e 25% de Goiás. Ele afirma com 99% de certeza ($p < 0,01$) que a prevalência de tais lesões entre os bovinos provenientes de Minas é significativamente superior à dos de Goiás. Baptista (1999) também sustenta que a prevalência foi maior nos animais abatidos nos frigoríficos da região Sudoeste do Estado de Minas Gerais (1,66%).

A importância econômica atribuída à tuberculose bovina está baseada nas perdas diretas ocasionadas por morte de animais, queda no ganho de peso, diminuição da produção de leite, descarte precoce, eliminação de animais de alto valor zootécnico e condenação de carcaças.

Estima-se que os animais infectados percam de 10 a 25% de sua eficiência produtiva. Outra consequência que comumente ocorre em nosso meio é a perda de credibilidade da propriedade, mesmo após a erradicação da doença (Mota e Lobato, 1988).

No plano da saúde coletiva, a tuberculose bovina é responsável por parte das infecções humanas, devido a sua transmissão ao homem através do leite de vacas doentes, entretanto o desenvolvimento de técnicas de pasteurização do leite contribui para minimizar sua ocorrência. Os tratadores de rebanhos infectados e os trabalhadores da indústria de carne constituem o grupo ocupacional de maior exposição à doença (Grange et al., 1994).

Pesquisas em animais experimentalmente infectados com *M. bovis* por vias diferentes de inoculação revelaram que a natureza e a extensão da doença varia com a via de exposição ao microrganismo (Thoen e Bloom, 1995). Aproximadamente 80 a 90% das infecções pelo *M. bovis* ocorrem por inalação de aerossóis contaminados com o microrganismo, que em estábulos e ao abrigo da luz, podem sobreviver em grandes expectorações durante vários meses, e em gotículas, de três a dezoito dias. Em animais adultos naturalmente infectados pode-se encontrar uma predominância de lesões em gânglios brônquicos e/ou mediastínicos. A via de infecção digestiva ocorre principalmente em bezerros alimentados com leite proveniente de vacas com mamite tuberculosa ou por água contaminada. Apesar de 5% das vacas apresentarem tuberculose uterina, somente 1% dos bezerros é infectado por via congênita (Souza et al., 1999).

O confinamento tem particular importância na difusão da doença no rebanho, o que explica a maior prevalência no gado leiteiro. Os bovinos de corte e bubalinos, quando forçados às condições de "confinamento natural temporário", durante a seca ou nas enchentes, ficam submetidos às mesmas condições de risco (Mota e Lobato, 1988).

Embora bovinos sejam considerados os hospedeiros verdadeiros do *M. bovis*, a doença foi relatada em diversas outras espécies de animais domésticos e selvagens dentre eles estão os búfalos, bisão, carneiros, cabra, eqüinos, camelo, ferrete, lhamas, elefante, rinocerontes, coioote e muitos felinos como leão, leopardo, tigre e lince. Os reservatórios selvagens são responsáveis pela introdução esporádica da doença em países onde já foram implantados programas de erradicação da tuberculose bovina. A detecção da infecção na população de animais selvagens requer investigações bacteriológicas ou o uso de outros testes de diagnósticos visto que, o teste padrão (tuberculinização) não é eficiente para todas as espécies (Bovine tuberculosis, 2002).

A resposta mediada por células desenvolve 10 a 14 dias após a infecção. Essa resposta é mediada pelos linfócitos T, os quais liberam linfocinas que atraem, imobilizam, e ativam polimorfos mononucleares para os sítios onde se encontram as micobactérias virulentas ou seus produtos. A hipersensibilidade do tipo IV que desenvolve contribui para a morte celular e destruição tecidual. A formação do granuloma é uma tentativa do hospedeiro para localizar a doença e permitir a destruição dos microrganismos (Thoen e Bloom, 1995).

2.2 – Taxonomia

O gênero *Mycobacterium* é composto por bastonetes aeróbios e microaerofílicos, não formadores de esporos, imóveis, medindo 0,2 a 0,6 x 1,0 a 10 µm. A propriedade mais característica dos membros desse gênero é a álcool-ácido resistência devido à composição química da parede celular ser rica em lipídeos, tornando a superfície hidrofóbica. De acordo com a importância clínica, Rastogi et al. (2001) classificam as 85 espécies micobacterianas dentro de três principais grupos:

- a) patogênicos, por exemplo: *M. tuberculosis* e *M. leprae* e *M. bovis*;
- b) oportunistas (com potencial patogênico) como exemplo: *M. simiae*, *M. avium* e *M. xenopi*;

- c) raros patógenos como: *M. smegmatis* e *M. phlei*.

As micobactérias algumas vezes são denominadas como espécies tuberculosas, as pertencentes ao "complexo *M. tuberculosis*" (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* e *M. canetti*), e as demais não tuberculosas, denominadas MOTT (micobactérias outras que não as tuberculosas). Para facilitar a diferenciação entre a doença causada pelas espécies não tuberculosas, suas alterações são denominadas genericamente de micobacterioses. Essas bactérias podem ser subdivididas em quatro grupos baseando-se nas características fenotípicas tais como pigmentação e tempo de crescimento (Rastogi et al., 2001).

2.3 – Antígenos das micobactérias

A seqüência genômica do *M. bovis* apresenta 99,95% de identidade com a do *M. tuberculosis*. Comparando-se com a seqüência do *M. leprae* observam-se perdas de informações genéticas. Os componentes da parede celular e proteínas secretadas mostram variações as quais possivelmente podem estar relacionadas às interações bacilo-hospedeiro ou mecanismos de evasão do sistema imune. Não há genes exclusivos ao *M. bovis*, mostrando portanto que a diferença na expressão dos genes pode ser a chave para o tropismo desse bacilo ao bovino (Garnierr et al., 2003).

Muitos dos componentes presentes na parede celular das micobactérias foram isolados e caracterizados quimicamente, porém somente em alguns foi possível elucidar sua função na patogênese. São eles: Os lipídeos micobacterianos constituem, a maior parte do peso seco das micobactérias e influenciam na sua capacidade de virulência e na resposta imune do hospedeiro. O fator corda (6,6'-dicomilato de trealose) é o glicolípido micobacteriano que inibe a imigração de leucócitos, interfere no processo de fosforilação oxidativa nas mitocôndrias dos hepatócitos, e também promove a desintegração do retículo endoplasmático. Os sulfolipídeos, também conhecidos como

sulfatídeos, estão fortemente relacionados com a sobrevivência das micobactérias dentro dos macrófagos. Os sulfatídeos impedem a fusão fago-lisossomo e, conseqüentemente as micobactérias não ficam expostas às enzimas hidrolíticas presentes no lisossoma. O lipoarabinomanana, glicolípido que se liga aos radicais de oxigênio livre. A cera D contém peptidoglicanas (*M. tuberculosis*) e lipopolissacarídeos (*M. bovis*) é um potente adjuvante, principalmente pela presença de maraldipeptídeo (MDP), que é capaz de induzir a formação de granuloma (Thoen e Bloom, 1995).

Wiker e Harboe (1992) agruparam os principais antígenos das micobactérias em:

a) lipoproteínas - constituem menos que 5% das proteínas totais em extratos solúveis. A mais estudada é a proteína 38 kDa, presente no *M. tuberculosis* e também no *M. bovis*, porém em menor proporção.

b) enzimas - a L-alanina desidrogenase e superoxidismutase são exemplos de enzimas encontradas em culturas de *M. tuberculosis*.

c) proteínas de choque - são produzidas quando as bactérias, em geral, são expostas à elevação repentina de temperatura. Aparentemente há uma acentuada produção dessas proteínas durante uma situação de estresse onde a bactéria tenta sobreviver em condições desfavoráveis a seu crescimento. São classificadas dentro famílias de acordo com o peso molecular, as principais são Hsp 90, Hsp 70, Hsp 60 e pequenas Hsps.

d) proteínas secretadas - essas proteínas dos *M. bovis* foram denominadas de MPB, termo introduzido por Nagai et al. (1981), seguido por um número que está relacionado à sua mobilidade na eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Fifis et al. (1991) relata a purificação e caracterização de diversos antígenos a partir do filtrado de cultura de *M. bovis*. Dentre eles estão a MPB70, alvo de nossos estudos, descrita por Nagai et al. (1981), MPB64 descrita por Harboe et al. (1986) apresentando massa molecular de 23kDa, MPB59 e P32.

2.4 - Proteína MPB70

Para melhorar o diagnóstico de infecções por *M. bovis* foi necessário identificar e purificar antígenos que exibissem alto grau de especificidade. Fifis et al. (1991) purificaram e caracterizaram por métodos físico-químicos e técnicas de cromatografia de afinidade e gel filtração, 10 antígenos de filtrado de cultura de *M. bovis* AN5. Usando anticorpos monoclonais viram que alguns desses antígenos eram específicos ao *M. bovis*. Dentre tais antígenos o anticorpo monoclonal anti-MPB70 reagiu com as proteínas de 22 kDa e 25 kDa. Fifis et al. (1992) verificaram a reatividade dos antígenos purificados contra soros de animais infectados ou não por *M. bovis* e animais infectados por microrganismos relacionados. Foi mostrado que MPB70, MPB64, p65, p70 e 39 kDa por eles purificados seriam os antígenos mais promissores para serem utilizados em diagnósticos.

MPB70 é o antígeno imunodominante do *M. bovis* contendo epítomos espécie-específicos (Wood et al., 1988; Fifis et al., 1992) sendo também um componente ativo do Derivado Protéico Purificado (PPD) de culturas de *M. bovis* (Harboe et al., 1990). Essa proteína é capaz de desencadear a resposta imune de hipersensibilidade do tipo IV estritamente para espécie de *M. bovis* (Nagai et al., 1981), estimular a produção de interferon gama (IFN- γ) (Wood et al., 1992) e estimular a produção de anticorpos (Fifis et al. 1992; Wood et al., 1992).

Radford et al. (1988) foram os primeiros a descreverem a seqüência nucleotídica parcial do gene da MPB70 a partir de culturas de *M. bovis* AN5. A completa seqüência desse gene foi por Terasaka (1989) usando culturas de *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin* Tokyo (*M. bovis* BCG Tokyo). A proteína possui 163 aminoácidos e peso molecular 16,3 kDa. Radford et al. (1990) relataram uma seqüência homóloga desse gene na posição 81-582 do *M. bovis* AN5, incluindo a região sinal peptídeo. Essa seqüência foi usada nessa tese para o desenho de iniciadores nos ensaios da PCR. Recentemente foi

proposto modelo de estrutura tridimensional para MPB70 (Carr et al., 2003).

Nagai et al. (1981) purificaram MPB70 de cultura de *M. bovis* BCG Tokyo por precipitação com sulfato de amônio e purificação por cromatografia usando DEAE-Sephadex A-50, seguida de duas cromatografias em DEAE sepharose CL-6B. Esses autores verificaram que a MPB70 é secretada e corresponde a mais de 10% do total das proteínas excretadas na cultura. O peso molecular foi estimado em 18 kDa por eletroforese e 15,1 kDa por coeficiente de sedimentação. Eles testaram a sua reatividade cutânea em cobaias sensibilizadas com *M. tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium phlei*, e BCG, inativadas por calor. E mostraram que houve reação cutânea somente para cobaias sensibilizadas pelas espécies BCG.

Miura et al. (1983) purificaram MPB70 de filtrado de cultura de várias espécies de *M. bovis* BCG. O peso molecular estimado por eletroforese foi de 18 kDa. Nos estudos de reação de hipersensibilidade por reação cutânea da MPB70 em cobaias sensibilizadas com várias amostras de *M. bovis* BCG, a reação foi alta para amostras BCG Tokyo 172 e BCG Moreau (Brasil). Análises por eletroforese de filtrado de cultura também mostraram que somente essas duas espécies produziram quantidades detectáveis de MPB70. As reações negativas para MPB70 foram observadas em animais sensibilizados com *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2, Glaxo 1077, Copenhagen 1331, a Tice ou a Beijing 64-42.

2.4.1 – Testes de diagnósticos utilizando MPB70

2.4.1.1 – Testes envolvendo imunidade humoral

Harboe e Nagai (1984) purificaram MPB70 de cultura de *M. bovis* BCG por precipitação com sulfato de amônio e diferentes tipos de cromatografia. Estudaram a reatividade da MPB70 purificada de cultura de *M. bovis* BCG contra anticorpos anti-BCG Tokyo, anti-BCG Copenhagen, anti-*M. avium* anti-*M. leprae*, anti-*Mycobacterium lepraemurium* anti-*M. smegmatis*, anti-*M. phlei*, anti-

Mycobacterium nonchromogenicum e anti-*Nocardia asteroides*. Nesse estudo foi demonstrada somente a reação cruzada com *Nocardia asteroides*. Estes pesquisadores observaram que havia diferenças na produção e secreção da MPB70 por subespécies de *M. bovis* BCG. No grupo das altas produtoras, *M. bovis* BCG amostras Tokyo, Moreau, Rússia, Sweden e na amostra *M. bovis* Ravenel, a MPB70 foi secretada em pelo menos 10% do conteúdo total das proteínas do fluido da cultura. As espécies baixas produtoras de MPB70 foram *M. bovis* BCG amostras Glaxo, Copenhagen, Tice e Pasteur, além de *M. tuberculosis* H37Rv. Foi relatado por Matsuo et al. (1995) que a diferença na secreção da MPB70 entre as amostras Tokyo e Pasteur eram devidas às diferenças na eficiência da transcrição do RNA mensageiro. A limitada distribuição dessa proteína dentro das espécies de micobactérias indica seu potencial para uso em diagnóstico de infecção por *M. bovis*.

Auer (1987) desenvolveu ELISA indireto usando lisado de cultura de *M. bovis* e obteve 88,7% de sensibilidade em animais infectados e com teste de tuberculinização positiva. Sensibilidade de 63% foi encontrada em animais infectados que nunca haviam sido tuberculinizados. Especificidade de 52,6% foi encontrada nos animais livres de tuberculose e que nunca tinham sido tuberculinizados. Esse autor chegou a conclusão que o teste de ELISA desenvolvido seria inapropriado como teste alternativo à tuberculinização para a detecção de animais infectados.

Wood et al. (1988) caracterizaram anticorpos monoclonais específicos para amostras de *M. bovis* AN5 e BCG. Esses anticorpos mostraram baixa reatividade cruzada com amostras de *M. tuberculosis*. Todos os anticorpos reconheceram a proteína de 22 kDa (MPB70) nos lisados bacterianos. Dentre eles está o anticorpo monoclonal 4C3/17 anti-MPB70 (AGEM Biomedicals LTD, Austrália) usado nessa tese.

Harboe et al. (1990) desenvolveram um ELISA usando como antígenos a MPB70 purificada de cultura de *M. bovis* BCG

Tokyo. A proteína G biotinizada foi utilizada como um indicador comum para a formação de anticorpos em diferentes espécies animais. Os autores mostraram, em animais experimentalmente infectados com *M. bovis*, um padrão de produção de anticorpos anti-MPB70 onde no início da infecção a produção é baixa sendo detectada em níveis altos 18 a 20 semanas após infecção. Esses autores evidenciaram a relação inversa entre resposta humoral e reação de hipersensibilidade do tipo IV. Foi mostrado nesse trabalho que os anticorpos anti-MPB70 foram altamente específicos para animais infectados com *M. bovis*, não havendo formação de anticorpos anti-MPB70 nos animais infectados com *M. avium*, *M. paratuberculosis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Ritacco et al. (1990) desenvolveram um ELISA indireto usando PPD como antígeno e obtiveram 73,6% de sensibilidade e 94,1% de especificidade. Eles observaram também que anticorpos anti-micobactérias estavam presentes em alta porcentagem em animais com tuberculose ativa.

Fifis et al. (1992) verificaram a reatividade de 12 antígenos purificados a partir de cultura de *M. bovis* AN5 contra soros de animais infectados por *M. bovis*, animais cultura-negativa oriundos de rebanho infectado, e animais infectados por microrganismos relacionados. Esses autores indicaram MPB70, MPB64 e MPB57 como antígenos mais promissores para serem utilizados em diagnóstico porque foram amplamente reconhecidos por animais infectados e apresentaram reações específicas para *M. bovis*.

Costello et al. (1997) desenvolveram ELISA usando soros de animais que não foram submetidos ao teste intradérmico num período de 60 dias, e como antígeno, o PPD bovino. Esse ELISA mostrou sensibilidade de 35% e 95,9% de especificidade.

Sugden et al. (1997) propuseram ELISA indireto e competitivo, com anticorpo monoclonal 4C3/1⁷ anti-MPB70 produzido por Wood et al. (1988), utilizando soros de Bovidae, Cervidae e Camelidae positivos,

negativos e suspeitos de infecção por *M. bovis*. No ELISA indireto usando MPB70 purificada de cultura de *M. bovis* obtiveram 75% de especificidade e 65% de sensibilidade para bovinos, 73,7% de especificidade e 78,9% de sensibilidade para bisão. No ELISA indireto usando como antígeno lipoarabinomanano extraído do *M. paratuberculosis* obtiveram 85% de especificidade e 55% de sensibilidade para bovinos, 78,9% de especificidade e 94,7% de sensibilidade para bisão. No ELISA competitivo utilizando filtrado de cultura de *M. bovis* BCG Tokyo obtiveram 85% de especificidade e 85% de sensibilidade para bovinos, 68,4% de especificidade e 89,5% de sensibilidade para bisão.

Lightbody et al. (1998) propuseram ELISA indireto usando PPD bovino, MPB70, MPB64 e MPB59 recombinantes. Foi demonstrado por esses autores que dos três antígenos recombinantes estudados a resposta humoral predominante foi para a MPB70r. No animal 193 a IgG1 foi detectada entre os dias 22 e 99 após infecção intranasal com 10⁷ UFC de *M. bovis* (T/91/1378) voltando a ser observada 421 dias após infecção. No animal 198 os níveis de IgG1 foram detectados 625 dias após infecção. Esses autores evidenciaram a variação no surgimento da IgG entre os animais estudados. Nesse estudo os autores sugerem que a resposta IgG1 anti-MPB70 seria capaz de diferenciar animais reagentes com e sem lesão pela comparação da taxa de resposta de anticorpos antes e após tuberculinização.

Lightbody et al. (2000), dando continuidade ao trabalho de Lightbody et al. (1998), relataram um ELISA indireto usando como antígenos peptídeos sintéticos da MPB70 e mostraram que duas regiões da proteína, resíduos 21-70 e 101-120, continham epítomos dominantes para células B. Mostraram também que o reconhecimento do epítomo, dentro dos resíduos 51-70, era maior após injeção de tuberculina em animais infectados e que essa resposta de IgG1, era característica de animais onde foram observadas lesões tuberculosas macroscópicas.

2.4.1.2 – Testes envolvendo imunidade celular

Pollock et al. (1994) estudaram a proliferação de linfócitos *in vitro* frente a epítomos de três antígenos do *M. bovis*. Os autores utilizaram linfócitos de animais experimentalmente infectados e verificaram proliferação celular em resposta a dois epítomos (resíduos 88 - 105 e 144 - 163) da MPB70.

Outros experimentos foram desenvolvidos baseados na detecção de IFN- γ (Interferon gama). Que resumidamente consiste em coletar sangue heparinizado e incubar por 24h com antígeno que se quer pesquisar para que ocorra a estimulação antigênica de linfócitos T, presentes na amostra. Os linfócitos T, na presença de células apresentadora de antígenos, são capazes de secretar IFN- γ , que pode ser titulado através de um ELISA de captura ou ELISA sanduíche.

Wood et al. (1992) desenvolveram ELISA usando como antígeno a MPB70 purificada de cultura de *M. bovis*. Nesse experimento foram analisados 1.362 animais com histórico de TB. Eles obtiveram 96,4% de especificidade e 18,1% de sensibilidade. Foi realizado também o teste com IFN- γ usando PPD bovino que apresentou 81,8% de sensibilidade e 99,1% de especificidade. O uso da MPB70 como antígeno no teste com IFN- γ houve redução da sensibilidade sem qualquer aumento na especificidade. No teste intradérmico usando PPD bovino a sensibilidade foi de 68,1% e 96,7% de especificidade.

Vordermeier et al. (1999) usando células mononucleares do sangue periférico de animais, infectados com *M. bovis*, sensibilizados com *M. avium* e BCG-vacinados verificaram que 4 antígenos (MPB70, ESAT-6, MPB64, e MPB83) induziam a proliferação *in vitro* e a produção de IFN- γ em resposta somente aos animais infectados com *M. bovis*.

Rhodes et al. (2000) descreveram a cinética de resposta de linfócitos T de animais experimentalmente infectados com *M. bovis* frente aos antígenos MPB70, PPD-M, PPD-

A, ESAT-6, Ag85, 38kDa, MPB64, MPB83, Hsp16.1, Hsp65 e Hsp70. Somente os antígenos PPD-M e ESAT-6 foram capazes de estimular a proliferação dos linfócitos T, produzir IL-2 e IFN- γ durante todo o período estudado.

2.5 – Métodos de diagnóstico para tuberculose bovina

O método de diagnóstico da tuberculose bovina considerado como padrão internacional é a tuberculinização intradérmica. Este teste baseia-se na reação de hipersensibilidade do tipo IV, empregando PPD de culturas de *M. bovis*.

A inoculação intradérmica de tuberculina em indivíduos sensíveis não causa reação nas primeiras 10 horas pós-inoculação. A enduração e edema progressivo atingem o máximo entre 72 e 96 horas. Após este tempo a reação tende a diminuir lentamente. A intensidade da reação cutânea pode ser quantificada pela medida do diâmetro do eritema e enduração ou engrossamento da pele afetada. Este eritema pode evoluir para uma necrose central, algumas vezes acompanhada por vesícula e ulceração características de uma hipersensibilidade intensa. Os aspectos histológicos da reação de hipersensibilidade IV são distintos. Em biópsia realizada nas primeiras 12 horas, observa-se permeabilidade capilar freqüentemente com poucos polimorfonucleares e após 48 horas, a lesão consiste de um infiltrado de células mononucleares (Mota e Lobato, 1998).

Alguns animais, ainda que infectados, não respondem aos testes tuberculínicos. Fatores como, infecção recente, periparto e desnutrição podem ocasionar resultados falso-negativos aos testes. Contudo, animais em estado avançado de infecção podem manifestar o fenômeno de anergia, definido como ausência de reatividade cutânea à tuberculina em indivíduos previamente sensibilizados, cujo mecanismo ainda não está bem elucidado. Animais recém-infectados também não respondem ao teste tuberculínico. A resposta nos bovinos aparece comumente após 30 a 50 dias da infecção. Aplicação indevida da tuberculina pode interferir no resultado do teste. Após a tuberculinização, os animais

apresentam sua capacidade de responder a novos testes diminuída, a esse fenômeno dá-se o nome de dessensibilização. A capacidade é recuperada após um período de 42 a 60 dias. Resultados falso-negativos podem ocorrer por variações inerentes ao próprio teste ou por variações na leitura e interpretação do teste. A sensibilidade do teste de tuberculização varia de 68 a 95% enquanto que a especificidade é estimada em 96 a 99%. Sendo a sensibilidade do teste afetada pela potência da tuberculina e a dose administrada. A especificidade é influenciada pela sensibilização como resultado da exposição a *M. avium*, *M. paratuberculosis* e micobactérias ambientais (Monaghan et al., 1994).

O teste de tuberculização intradérmica comparativo usando inoculação simultânea de PPD aviária e PPD bovina, realizado 60 a 90 dias após a primeira inoculação simples, é realizado principalmente para diferenciar animais infectados com *M. bovis* daqueles sensibilizados por exposição a outras micobactérias ou gênero relacionadas. Micobactérias incluindo *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. paratuberculosis* e *M. tuberculosis*, podem sensibilizar o animal, porém não produzem doença pulmonar progressiva no rebanho (Bovine tuberculosis, 2002).

Na região Sudeste do Brasil, encontra-se alta incidência de reações alérgicas inespecíficas que podem desacreditar rebanhos livres da doença, além de eliminar animais falso-positivos com bastante frequência. A sensibilização alérgica inespecífica apresenta geralmente ligeira tumefação, bastante circunscrita, consistência firme, com pouca resposta dolorosa. Embora constitua valioso meio de reconhecer reações inespecíficas, a tuberculização comparada com tuberculina aviária e bovina ainda deixa certa margem de dúvida, independentemente dos critérios utilizados na interpretação das reações (Mota e Lobato, 1998).

Os maiores problemas do método de tuberculização consistem na ocorrência de reações falso-negativas principalmente pelos animais anérgicos, dificuldade na leitura, que exige técnico especializado,

período de leitura de 72 horas, o que obriga o veterinário a um segundo deslocamento até a propriedade, grande número de reações duvidosas e necessidade de 60 ou 90 dias para a realização de novas provas (Radunz e Lepper, 1985). A Instrução Normativa nº 2 de 10/01/2001 estabelece procedimentos a fim de padronizar e garantir a qualidade dos instrumentos e das ações profiláticas, de diagnóstico, de saneamento de rebanhos e de vigilância sanitária ativa, relacionada com o combate à brucelose e à tuberculose em bovinos e bubalinos no Brasil (Brasil, 2001).

Outros testes de diagnósticos para tuberculose bovina foram testados dentre eles, hemaglutinação, fixação por complemento, proliferação *in vitro* de linfócitos, detecção de produção de IFN- γ . Também foram desenvolvidas técnicas moleculares como PCR, e tipagem por polimorfismo dos tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP) e análises de oligonucleotídeos entre seqüências repetidas diretas – “spoligotyping”.

2.6 - Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT)

O princípio básico para o controle da tuberculose, como em qualquer processo de controle de epidemias, é interromper a cadeia de transmissão, atuando objetivamente no “elos” que formam essa corrente, ou seja, detectando precocemente os casos, investigando seus contatos, a fim de prevenir a disseminação da doença. O PNCEBT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2001) tem como objetivos específicos baixar a prevalência e a incidência de novos casos de tuberculose e criar um número significativo de propriedades livres de brucelose e tuberculose bovina.

No PNCEBT, o teste cervical simples é o teste de rotina recomendado. O teste é realizado com inoculação intradérmica de tuberculina PPD bovino, produzida a partir de culturas de *M. bovis* AN5, na região cervical ou escapular do animal ou na prega caudal (exclusivo para pecuária de corte). A leitura é realizada após 72 horas e os resultados são interpretados de acordo com as características da reação (Tabela 1).

Tabela 1: Interpretação do teste cervical simples em bovinos (Brasil, 2001)

Espessura da dobra da pele (mm)	Características da reação			Interpretação
	Sensibilidade	Consistência	Outras alterações	
0,0 a 1,9	-	-	-	negativo
2,0 a 3,9	Pouca dor	endurecida	delimitada	inconclusivo
2,0 a 3,9	Muita dor	macia	Exsudato, necrose	positivo
Maior que 4,0	-	-	-	positivo

2.7 – Biosensores

Biosensor é um dispositivo que detecta, transmite e armazena informações a respeito de modificações fisiológicas ou bioquímicas. Consiste de um sensor biológico acoplado a um transdutor que converte o sinal bioquímico em uma resposta mensurável. Alguns dos principais atributos de um bom sensor são especificidade, sensibilidade, integridade, capacidade de funcionamento em meios densos, análise em tempo real e simplicidade operacional. A função de um biosensor depende da especificidade bioquímica do material biologicamente ativo. A escolha de componente biológico (que poderá ser um antígeno, microrganismo, hormônio, ácidos nucleicos, enzimas, anticorpo, receptores bem como tecidos de animais e plantas), dependerá de fatores como especificidade, estocagem, estabilidade operacional e ambiental. A seleção também dependerá do analito a ser detectado pelo sensor biológico. Como transdutor pode ser eletroquímico, óptico acústico e eletrônico (Byfield e Abuknesha, 1994).

O aumento do interesse e pesquisa em biosensores se deve à alta especificidade e sensibilidade oferecidas por esses sistemas. A especificidade é dirigida pelas propriedades do componente biológico, já a sensibilidade dependerá da interação do analito ao sensor biológico bem como do sensor ao transdutor, que deverá ser altamente sensível para detectar qualquer alteração no sistema. O componente biológico poderá ser imobilizado ao transdutor por ligações covalentes, ligações cruzadas, radiação- γ , etc. (McClean et al., 1993).

Os polímeros sintéticos têm sido amplamente utilizados em biosensores incluindo poli(acrilamida), hidrogéis a base de

poliuretano e álcool polivinílico (PVA) (Peppas et al., 2000). Entretanto a principal limitação desses polímeros é a possível perda da viabilidade dos componentes biológicos. Membranas de poli(acrilonitrilo) e hidrogel de albumina-polietilenoglicol mostraram ser promissoras na mobilização de enzimas e também ganharam grande importância nos biosensores com microorganismos.

Dentre os biosensores estão os imunosensores nos quais, associados às técnicas de imunensaio, apresentam alta sensibilidade e especificidade devidas às interações antígeno-anticorpo. Os detalhes dessa interação são de enorme significância para o desenvolvimento e caracterização dos dispositivos de um imunossensor.

2.7.1 – Hidrogéis e Híbridos de PVA

Hidrogéis são polímeros hidrofílicos produzidos por reações de um ou mais monômeros com ligações de hidrogênio ou interações de van der Waals. Possuem capacidade de absorver água ou fluidos biológicos, numa proporção de 30% ou mais de seu peso. A importância dos hidrogéis com aplicações biomédicas foi realizada pela primeira vez no final dos anos 1950 com o desenvolvimento do poli 2-hidroximetil metacrilato (PHEMA) como material para lentes de contatos. Hoje são inúmeras as aplicações biomédicas dos hidrogéis incluindo dispositivos oftalmológicos e biosensores (Peppas et al., 2000).

Pereira et al. (1999) desenvolveram novos biomateriais na forma de filmes transparentes e flexíveis que apresentaram níveis controlados de reatividade quando submersos em solução aquosa. Foram produzidos híbridos de álcool polivinílico-tetraetil ortossilicato e tetrametil ortossilicato dotados com sais de cálcio e alcóxido de

fósforo. Espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica e análise térmica foram as técnicas utilizadas por eles para caracterizar os materiais sintetizados. Esses autores mostraram que o grau de reatividade dos materiais podia ser controlado pela densidade de ligações cruzadas e composição da fase inorgânica.

Os mais comuns hidrogéis conhecidos e cujas estruturas podem ser controladas são PHEMA, PVA, poli n-vinil-2-pirrolidona (PNVP), polietilenoglicol (PEG), e seus copolímeros.

A bioengenharia tem atraído a atenção de grupos de pesquisadores para o desenvolvimento de materiais específicos com aplicações biológicas. A imobilização de proteínas ou outros constituintes biológicos têm sido alvo de intenso estudo nos últimos anos. Tais procedimentos têm a potencialidade de gerar uma série de produtos de enorme valor que vão desde reatores biológicos até ensaios para diagnóstico. A adsorção direta de proteínas em microplacas de polietileno é utilizada nos ensaios imunossorventes ligados à enzima (ELISA) devido a sua simplicidade e baixo custo, sendo o principal sistema de ensaio clínico atualmente usado. Com o avanço da tecnologia, novos biosensores foram construídos e paralelamente foram desenvolvidas técnicas de imobilização no intuito de estabilizar e aderir as biomoléculas em sua superfície (McClean et al, 1993).

Um dos objetivos desse trabalho envolve o desenvolvimento de materiais que apresentam níveis controláveis de reatividade a partir de combinação em escala nanométrica ou molecular de fases poliméricas para uso de imobilização de proteína para diagnóstico da tuberculose bovina. Nesse contexto foram realizadas as sínteses de hidrogéis PVA, $[\text{CH}_2\text{-CH}(\text{OH})]_n$, com arquitetura química modificada com glutaraldeído (GA) e/ou tetraetil ortossilicato (TEOS), $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$.

Mansur et al. (2000) desenvolveram monolíticos de sílica pela técnica de sol-gel

os quais foram funcionalizados com aminopropil trietoxissilano e mercaptopropil trietoxissilano. Essas substâncias incorporadas aos monolíticos favoreceram a imobilização de soroalbumina bovina e insulina pelos radicais amina (NH_2^-) e mercaptanos (SH-). As técnicas de caracterização usadas nesse trabalho foram a espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica e picnometria de mercúrio. Esses autores observaram que a capacidade de incorporar proteínas e a permanência destas nos monolíticos, dependiam do tipo e da concentração dos grupos funcionais introduzidos.

Mansur et al. (2001) produziram monolíticos de sílica pela técnica de sol-gel e verificaram a sua capacidade de liberação controlada de soroalbumina bovina e insulina *in vitro*, que foram analisadas por espectroscopia ultravioleta-visível. A bioatividade da insulina incorporada aos monolíticos também foi estudada *in vivo*. Esses dispositivos foram implantados em camundongos que apresentaram hipoglicemia aguda.

Barros et al. (2002) usaram diversos materiais como suporte para testes de ELISA. Foram sintetizados discos de: álcool polivinílico-glutaraldeído, de papel plastificados com PVA, de Dacron[®]-polianilina e de álcool polivinílico - polisiloxano. Todos os materiais desenvolvidos foram sensibilizados com proteínas de *Yersinia pestis* para a detecção de anticorpos em soros de coelho imunizados com esse mesmo agente. Os resultados por eles obtidos foram comparáveis aos resultados do ELISA em placas convencionais.

Coelho et al. (2003) desenvolveram um ELISA usando discos de álcool polivinílico - polisiloxano como suporte sólido sensibilizado com antígeno recombinante para a detecção de anticorpos anti-*Toxocara canis* em soros de crianças e obtiveram resultados semelhantes aos testes usando placa convencional.

3 – OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- ↳ Produzir e purificar proteína MPB70 recombinante;
- ↳ Testar a antigenicidade da proteína produzida;
- ↳ Desenvolver um teste de ELISA indireto utilizando a MPB70 recombinante produzida para identificação de animais infectados com *M. bovis*;

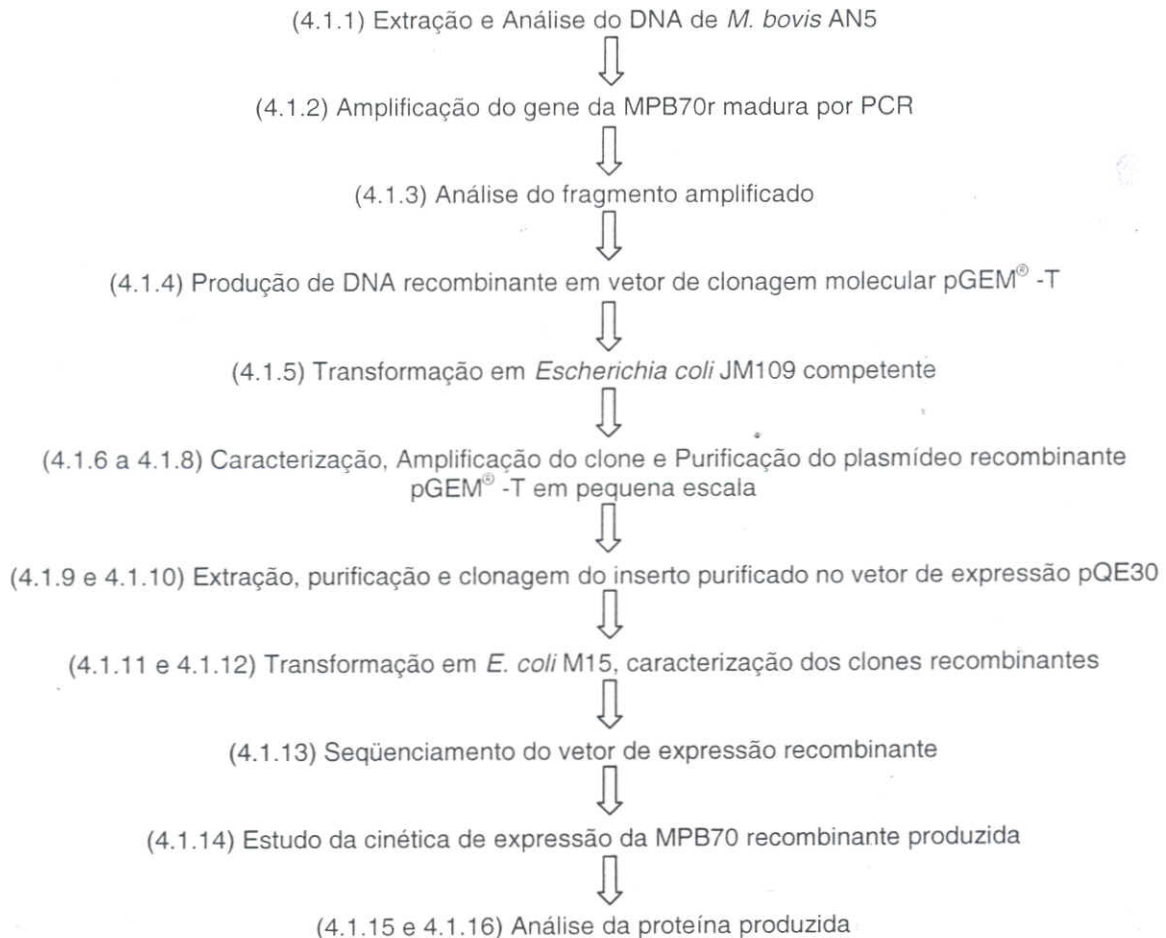
↳ Sintetizar materiais alternativos e verificar seu uso como suportes nos ensaios de ELISA utilizando essa proteína.

↳ Comparar os resultados do ELISA com o teste de tuberculinização.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Esquema representativo da produção da MPB70r

Para a produção da MPB70r foi utilizado o seguinte esquema:



4.1.1 - Extração e Análise do DNA de *M. bovis* AN5 (Böddinghaus et. al., 1990).

O cultivo e a extração do DNA foram realizados no Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) Pedro Leopoldo – MG. De uma cultura de 15 dias em meio Löwenstein-Jensen a 37°C, cedida pelo Dr. Pedro Moacir Pinto Coelho Mota (LARA – Pedro Leopoldo/MG).

Foi coletado e transferido aproximadamente 1 mg da massa celular para tubo de microcentrifuga de 1,5 mL contendo 500 µl da solução de lise (10 mM Tris-HCl¹ pH 8,0, 10 mM EDTA¹ pH 8,0; 0,1% Tween¹ 80 e 2 mg de lisozima²). O tubo foi incubado em banho-maria a 37°C. Após 1 hora de incubação foram acrescentados 1% de SDS² e 10 µg/mL de proteinase K² com homogeneização em intervalos de 10 min. O tubo foi centrifugado a 7.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrifuga onde foi acrescentado fenol saturado com 1 M Tris-HCl (pH 8,0) v/v. Em seguida foi feita centrifugação a 13.000 x g por 15 min. Esse procedimento foi repetido três vezes. A fase aquosa foi transferida para outro tubo de microcentrifuga onde foi acrescentado fenol-clorofórmio-álcool isoamílico² na proporção de 25: 24: 1 v/v, seguida de centrifugação a 13.000 x g por 15 min. Essa etapa foi repetida três vezes. Ao final foi feita extração com clorofórmio² (v/v) sendo descartada a fase orgânica. O tubo foi centrifugado 13.000 x g por 15 min. Ao sedimento foram acrescentados 1/10 de volume da solução de acetato de sódio¹ 3 M e 2 volumes de metanol² gelado. Após incubação por 10 min a -20°C foi feita centrifugação a 13.000 x g por 30 min. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol² gelado a 70% e o tubo centrifugado novamente a 13.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi removido por inversão do tubo que foi mantido invertido a temperatura ambiente até a completa secagem do sedimento. O sedimento foi suspenso em 5 µl de água destilada estéril. O cálculo da

concentração foi feito por espectroscopia UV-VIS (UV-160A – Shimadzu, Japão) usando cubeta de quartzo de 1 mL x 1cm, considerando-se uma unidade de absorvância (A) correspondente a uma solução de DNA de concentração de 50 µg/mL (Sambrook et al., 1989). A fim de se estimar o grau de contaminação do DNA com proteínas, foi feito o cálculo do quociente das absorvâncias A_{260nm} / A_{280nm} , considerando DNA satisfatoriamente puro quando os resultados dessa relação variarem entre 1.8 a 2.0, (Sambrook et al., 1989).

4.1.2 - Amplificação do gene da MPB70 madura por PCR

Para a amplificação do gene da MPB70 madura foi usado como molde para a síntese enzimática o DNA do *M. bovis* AN5 extraído como descrito anteriormente. A otimização da PCR foi realizada variando-se particularmente a concentração de cloreto de magnésio, temperatura de anelamento e quantidade de DNA.

A PCR foi realizada em um volume total de 25 µl contendo MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleotideo trifosfato (dNTP)², 20 pmol de cada iniciador, 1 U de *Taq* DNA polimerase², DNA e finalmente 15 µl de óleo mineral para evitar a evaporação da mistura. A reação de amplificação foi feita em um termociclador programável (MJ Research, Inc., EUA). Os iniciadores, sintetizados pela GIBCO-BRL-Brasil em escala de 200 nM, foram desenhados a partir da seqüência publicada por Radford et al. (1990) (Figura 1). No iniciador senso, 5'- **GGATCCGGCGATCTGGTGGGCCCG** -3', foi introduzido por nós, um único sítio de restrição para a enzima *Bam*H1 na extremidade 5' do iniciador aqui destacada em negrito, e anti-senso 5'-TTACGCCGGAGGCATTAGCACG-3'. Os iniciadores foram analisados usando o programa Oligo Primer Analysis (National Bioscience, INC). O programa de amplificação padronizado foi: 94°C por 3 min para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 47°C por 1 min, 72°C por 1 min, 94°C por 1 min, finalizando com um ciclo de extensão a 47°C por 1 min, 72°C por 10 min.

¹ Merck (Merck S.A. – Brasil)

² Sigma (Sigma – Aldrich Corporate USA)

1	cccggacggc	tccgaagaaa	tcatgtcggg	ggtagcgaga	cggcacaagc	cgcggtctcc
61	ggcagcgaag	gagtgaaagg	catgaaggta	aagaacacaa	ttgcggcaac	cagtttcgcg
121	gcgccgccc	tggcggctct	ggcggtggt	gtctaccgc	cggcggccgc	<u>agcgaatctg</u>
181	<u>gtgggcccgg</u>	<u>gctgcgcgga</u>	<u>atacgcggca</u>	<u>gccaatcca</u>	<u>ctgggcccgg</u>	<u>ctcgggtcag</u>
241	<u>ggaatgtcgc</u>	<u>aggaccgggt</u>	<u>cgcggtggcg</u>	<u>gcctcgaaca</u>	<u>atccggagtt</u>	<u>gacaacgctg</u>
301	<u>acggctgcac</u>	<u>tgctggggcca</u>	<u>gctcaatccg</u>	<u>caagtaaacc</u>	<u>tggtggacac</u>	<u>cctcaacagc</u>
361	<u>gttcagtagc</u>	<u>cggtgttcgc</u>	<u>accgaccaac</u>	<u>gcggcatta</u>	<u>gcaagctgcc</u>	<u>ggcatccacg</u>
421	<u>atcgacgagc</u>	<u>tcaagaccaa</u>	<u>ttcgtcactg</u>	<u>ctgaccagca</u>	<u>tcctgaccta</u>	<u>ccacgtagtg</u>
481	<u>gccggccaaa</u>	<u>ccagcccggc</u>	<u>caacgtcgtc</u>	<u>ggcaccgcgc</u>	<u>agaccctcca</u>	<u>gggcccagc</u>
541	<u>gtgacggtag</u>	<u>ccggtcaggg</u>	<u>taacagcctc</u>	<u>aaggtcggtg</u>	<u>acgccgacgt</u>	<u>cgctgtgtgt</u>
601	<u>ggggtgtcta</u>	<u>ccgccaacgc</u>	<u>gacgggtgac</u>	<u>atgattgaca</u>	<u>gcgtgcta</u>	<u>gctccggcg</u>
661	<u>taa</u>					

Figura 1 – Seqüência de nucleotídeos do gene codificador para MPB70. Seqüência de origem depositada no “GenBank” número de acesso M33916 M25386. As seqüências dos iniciadores estão sublinhadas. Não está incluído o sítio de *Bam*H1 no primeiro iniciador. Em negrito: região codificadora da MPB70 madura em 172 e 660.

4.1.3 – Análise do fragmento amplificado

Após a reação da PCR, 3 µl do produto amplificado foram analisados por eletroforese (100 V por 1 hora) em gel de poliacrilamida 6% em tampão TBE (Tris Borato¹ 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0). Para a determinação do tamanho dos produtos de PCR foi incluído em cada corrida o marcador de tamanho molecular φX 174 digerido com HAE III (Gibco-BRL- Brasil) com fragmentos variando de 72 a 1353 pares de base (pb).

Ao término da eletroforese, o gel foi submetido à coloração por impregnação pelo nitrato de prata² para a visualização e análise do produto amplificado, de acordo com o protocolo que se segue. O gel primeiramente foi lavado com água destilada, incubado em solução fixadora (etanol 10% v/v e ácido acético¹ 0,5% v/v) por 10 min, após remoção desta solução foi incubado em solução de prata (0,2% AgNO₃ p/v em água destilada) por 10 min. Foi feita uma lavagem rápida com água destilada e incubação em solução reveladora (3,0% NaOH¹ em água destilada e 0,3% de formol² a 37%) sob agitação até o surgimento da banda de amplificação do DNA. A revelação foi interrompida com uma solução de ácido acético a 5%. O tamanho do produto gerado foi confirmado por comparação com marcador de tamanho molecular.

4.1.4 - Produção de DNA recombinante em vetor de clonagem molecular - pGEM[®] - T

A clonagem foi realizada usando o Kit “pGEM[®] - T and pGEM[®] - T Easy Vector Systems” (Promega Corporation, USA). As características desse sistema estão no Anexo 1.

Conforme protocolo do fabricante, o produto da PCR foi inserido no plasmídeo pGEM[®] -T obedecendo razão molar inserto / vetor igual a 3 : 1. A reação de ligação foi realizada em um volume total de 20 µl, sendo 2 µl do tampão T₄ DNA ligase 10 X, 50 ng pGEM[®] - T, 25 ng produto da PCR, 6 U T₄ DNA ligase. Após homogeneização a reação foi incubada por 16 – 18 horas a 4°C.

4.1.5 - Transformação em *Escherichia coli* JM109 competente

O pGEM[®] - T recombinante após a etapa de ligação foi transferido para o banho de gelo e duas alíquotas da reação de ligação (5 e 15 µl) foram usadas para fazer a transformação bacteriana. Foram transferidos 50 µL da cultura de *Escherichia coli* JM 109 competente para os tubos contendo 5 e 15 µL da reação de ligação. Os tubos após homogeneização foram incubados em banho de gelo por 20 min. Em seguida foi feito choque térmico aquecendo-se os tubos em banho-maria a

42°C por 50 segundos e depois 2 min no banho de gelo.

Aos tubos foram adicionados 950 µl de meio LB (1,0% bacto-triptona³, 0,5% extrato de levedura³, 1,0% NaCl, pH 7,0) e foram incubados a 37°C durante 1,5 hora sob agitação de 150 rpm no agitador CERTOMAT[®] BS-1 Inkubations – Schüttelschrank (B. Braum Biotech International - RFA). Os tubos foram centrifugados por 1 min a 1.000 x g sendo o sedimento solubilizado gentilmente com 100µl de LB. Uma alíquota de 10 µl de cada tubo foi semeada em placas de Petri contendo meio LB / ampicilina⁴ / X-gal² / Isopropil-β-D-Tiogalactosídeo – IPTG² (LB, 1,5% Agar³, 100 µg/mL ampicilina, 0,5 mM IPTG³, 80 µg/mL X-gal). As placas foram incubadas a 37°C por 16 – 18 horas.

Após crescimento bacteriano, todos os clones foram coletados individualmente, inoculados em 1,0 mL de meio LB / ampicilina e incubados 16 – 18 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm.

4.1.6 - Caracterização de clones recombinantes por PCR

Das culturas de 1,0 mL dos clones coletados crescidos 16 – 18 horas em incubação a 37°C foram retirados 0,8 µl para reação da PCR a fim de confirmar clones recombinantes. O restante da cultura foi usado nas etapas descritas item 4.1.7. A PCR foi realizada usando os iniciadores e a mesma programação descrita no item 4.1.2. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% em TBE 1X como já descrito.

4.1.7 – Amplificação dos clones positivos em pequena escala

Após confirmação por PCR da presença do inserto nos clones coletados o restante da cultura descrita no item 4.1.4 foi inoculado em 10 mL de meio LB / ampicilina e incubado por cerca de 16 – 18 horas a 37°C

sob agitação de 150 rpm. Após incubação foram aliqüotados 5,0 mL de cada clone e usados para purificação e análise de restrição enzimática. O restante destinado para estocagem em freezer –80°C, onde a 5mL de cultura foram adicionados 50% de seu volume de glicerol.

4.1.8 - Purificação do Plasmídeo pGEM[®] - T recombinante em pequena escala

A purificação do plasmídeo de cada clone foi realizada através do Kit “Wizard[®] plus SV minipreps DNA purification system” (Promega Corporation, USA) utilizando-se 5,0 mL das culturas crescidas 12 – 16 horas. As culturas foram centrifugadas por 5 min a 10.000 x g e os sedimentos secados a temperatura ambiente. Os sedimentos foram suspensos separadamente em 250 µl da solução de suspensão celular (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A), e transferidos para tubos de microcentrífuga. Em seguida foram adicionados 250 µl da solução de lise celular (0,2 M NaOH, 1% SDS). Após movimentos de inversão, os tubos foram incubados até as suspensões celulares tornarem-se claras. Às suspensões foram adicionados 250 µg de protease alcalina que, após homogeneização, foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente. Foram adicionados 350 µl da solução de neutralização (4,09 M Guanidina – HCl; 0,759 M acetato de potássio e 2,12 M ácido acético glacial) e imediatamente foi feita homogeneização invertendo-se os tubos por quatro vezes. Os lisados bacterianos foram centrifugados a 14.000 x g por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para colunas de purificação e centrifugados a 14.000 x g por 1 min. As colunas foram colocadas em outros tubos de microcentrífuga para receberem 750 µl da solução de lavagem (etanol 60%; 60 mM acetato de potássio e 10 mM Tris-HCl pH 7), e novamente centrifugadas a 14.000 x g por 1 min. O procedimento de lavagem foi repetido utilizando-se 250 µL de solução de lavagem e centrifugação a 14.000 x g por 2 min. As eluições do DNA foram feitas após a transferência das colunas para novos tubos de microcentrífuga utilizando-se 100 µl de

³ Reagen

⁴ Invitrogen

água livre de nucleases e centrifugação a 14.000 x g por 1 min. Uma alíquota foi retirada para se fazer a quantificação e o restante foi estocado a -80°C . As quantificações dos DNAs foram feitas por espectroscopia UV-VIS segundo Sambrook et al (1989).

4.1.9 - Extração e purificação do inserto clonado no plasmídeo pGEM[®] - T

Dois clones de cada perfil eletroforético apresentado após digestão com *AvaI*[†] foram escolhidos para digestão com enzimas de restrição *Bam* H1[†] - *SacI*[†]; *Bam* H1 - *SphI*[†]. Para cada digestão enzimática foi usado 1 µg do plasmídeo recombinante e 1 U de cada enzima. Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA) corado com brometo de etídeo² (0,5 µg/mL). As bandas foram visualizadas e fotografadas sob iluminação UV (320 nm) utilizando o sistema de fotografia Image Master VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia).

Após análise do perfil de restrição por eletroforese o clone 1 foi escolhido para se fazer à purificação do plasmídeo recombinante em pequeno volume e extração do inserto clonado. A digestão foi realizada com as enzimas *Bam* H1 - *SphI*. Os produtos digeridos foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose de baixa temperatura de fusão (Low melting point - LMP⁴) a 1% em tampão TAE 1X corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. A excisão dos fragmentos do gel contendo inserto foi feita com bisturi sob luz UV comprimento de onda alto a fim de se evitar danos no DNA. Os fragmentos recortados foram colocados em de microcentrífuga para a purificação pelo Kit "WIZARD[®] PCR preps DNA purification system" (Promega Corporation, USA). Os tubos foram incubados a 70°C até total dissolução da agarose contendo fragmento de DNA. Em seguida foi adicionado 1,0 mL de resina que após homogeneização a mistura foi transferida para uma seringa descartável de 3,0 mL acoplada à minicoluna de purificação. Com

auxílio do êmbolo a resina foi introduzida na minicoluna. Foram adicionados à seringa 2,0 mL de isopropanol² 80% como procedimento de lavagem. Em seguida a minicoluna foi acoplada a um tubo de microcentrífuga e centrifugada por 2 min. a 10.000 x g. Outro tubo de microcentrífuga foi acoplado à minicoluna onde foram acrescentados 50 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA¹) para a eluição do fragmento de DNA. Uma alíquota foi retirada para se fazer a quantificação e o restante foi estocado a -80°C . A quantificação do DNA foi feita por espectroscopia UV-VIS segundo Sambrook et al. (1989).

4.1.10 - Clonagem do inserto purificado no vetor de expressão pQE30.

A clonagem foi realizada usando o "QIAexpress Kit" (QIAGEN Inc., USA) usando como vetor de expressão o plasmídeo pQE-30.

Conforme protocolo recomendado pelo fabricante, a clonagem do inserto no vetor de expressão obedeceu à razão molar inserto / vetor 3 : 1. O pQE-30 foi aberto após a digestão enzimática com as enzimas de restrição *Bam* H1 - *SphI*, sendo as mesmas enzimas utilizadas para extração do inserto do plasmídeo de clonagem molecular no pGEM[®] - T (item 4.1.9). A reação de ligação foi realizada em um volume total de 20 µl, sendo 2 µl do tampão T₄ DNA ligase 10 X, 50 ng do vetor digerido, 25 ng do inserto purificado, 6 U T₄ ligase, foi homogeneizada e incubada 16 - 18 horas a 4°C.

4.1.11 - Transformação em *Escherichia coli* M15

Após a incubação, o tubo de reação do item 4.1.10, foi transferido para o banho de gelo e duas alíquotas (5 e 15 µl) foram usadas para fazer a transformação da bacteriana. Foram transferidos 50 µl da cultura de *Escherichia coli* M15 competente para os tubos contendo 5 e 15 µl da reação de ligação. Os tubos após homogeneização foram incubados em banho de gelo por 20

min. Em seguida foi feito choque térmico aquecendo-se os tubos em banho-maria a 42°C por 50 segundos e depois 2 min no banho de gelo.

Aos tubos foram adicionados 950 µl de meio LB (1,0% bacto-triptona; 0,5% extrato de levedura; 1,0% NaCl, pH 7,0) e foram incubados a 37°C durante 1,5 hora sob agitação de 150 rpm no agitador CERTOMAT[®] BS-1 Inkubations. Os tubos foram centrifugados por 1 min a 1.000 x g sendo o sedimento suspenso gentilmente com 100 µl de LB. Uma alíquota de 100 µl de cada tubo foi semeada em placas de Petri contendo meio LB / ampicilina / canamicina⁴ (LB, 15 g Agar, 100 µg/mL ampicilina, 25 µg/mL canamicina). Após crescimento bacteriano, todos os 20 clones foram coletados individualmente, inoculados em 1,0 mL de meio LB / ampicilina / canamicina³ e incubados 16 – 18 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm no agitador CERTOMAT[®] BS-1 Inkubations. Uma alíquota foi retirada para armazenamento em freezer -80°C e a outra foi usada para confirmação de clones recombinantes.

4.1.12 - Caracterização de clones recombinantes por PCR

Nove clones denominados pelas letras (A) a (I) foram escolhidos para verificar a presença do inserto pela técnica da PCR usando os iniciadores, programa e protocolos já descritos no item 4.1.2. Após a PCR, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE corado por brometo de etídeo. Foram então selecionados cinco clones (A, E, F, G, H) para cinética de expressão da MPB70 recombinante.

4.1.13 - Seqüenciamento do vetor de expressão recombinante

Para confirmar se o gene codificador da MPB70 madura foi inserido de forma correta, o plasmídeo PQE30 recombinante do clone (A) foi submetido ao seqüenciamento. As reações de seqüenciamento foram realizadas pela BIOAGRO, Universidade de Viçosa segundo

a técnica descrita por Sanger et al. (1980). Os iniciadores, sintetizados pela GIBCO-BRL em escala de síntese de 200 nM, foram os descritos pelo "QIA express protocols", senso 5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG-3' e anti-senso 5'-CCAGTAATGACCTCAGAAC-3'.

A seqüência editada foi analisada para a determinação de similaridades com as seqüências de MPB70 depositadas no "GenBank" pelos programas "Basic Local Alignment Search Tool (Blast N e Blast X)". Estes programas estão disponíveis no endereço eletrônico do National Center for Biotechnological Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A fase de leitura foi analisada pelo programa "Translate Tool" disponível no endereço eletrônico <http://au.expasy.org>. As características da proteína como ponto isoelétrico teórico, tamanho molecular, composição de aminoácidos e caráter hidrofóbico foram analisadas pelo programa "ProtParam tool" disponível no endereço eletrônico <http://au.expasy.org>.

4.1.14 - Estudo da Cinética de expressão da MPB70 recombinante (MPB70r) em pequena escala

A cinética foi realizada seguindo instruções presentes no "QIA express Kit". Os clones recombinantes A, E, F, G e H foram inoculados no meio LB / ampicilina / canamicina incubados a 37°C por 16 – 18 horas. Dessas culturas foram retirados 500 µl, inoculados em 10 mL de meio LB / ampicilina / canamicina pré-aquecido. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação até atingir densidade óptica 0,5 – 0,7 em comprimento de onda 600 nm. Imediatamente foi adicionado em cada 5,0 mL de cultura o indutor de expressão, IPTG na concentração final de 1 mM e retomada a incubação. Os outros 5,0 mL não receberam o IPTG. Uma alíquota de 1,0 mL de cada cultura foi retirada em intervalos consecutivos de 1 hora até 5 horas antes e após indução para acompanhamento da cinética de expressão. O crescimento foi interrompido após 5 horas da indução. As alíquotas retiradas das culturas foram centrifugadas por 1 min. a 15.000 x g. O sedimento foi suspenso em 100 µl de

tampão de amostra (75 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% v/v 2-mercapetanol², 2% p/v sódio duodecil sulfato (SDS), 10% v/v glicerol², 0,2% azul de bromofenol²), e fervido a 98°C por 3 min para análise por eletroforese.

4.1.15 - Análise por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) da proteína induzida.

As análises por eletroforese realizadas em condições desnaturantes foram feitas somente para os clones (A) e (E). Dez microlitros da suspensão das amostras coletadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% em tampão Tris-Glicina (25 mM pH 8,0 Tris base, 250 mM glicina, 0,1% SDS) a 150V por 1 hora. Em cada corrida foi incluído o marcador de tamanho molecular 10 kDa protein ladder (GIBCO-BRL - Brasil) que consiste de 12 bandas de 10 a 120 kDa. Os géis foram revelados por coloração por azul de Coomassie. Os géis foram imersos na solução corante (2,5% Coomassie Blue Brilliant² R250 p/v, 50% metanol v/v, 10 % ácido acético v/v) por 10 min, sob agitação suave. Posteriormente foram imersos em solução descorante (30% etanol, 10% ácido acético) onde permaneceram até atingirem a coloração desejada.

4.1.16 - Determinação da solubilidade da proteína MPB70r

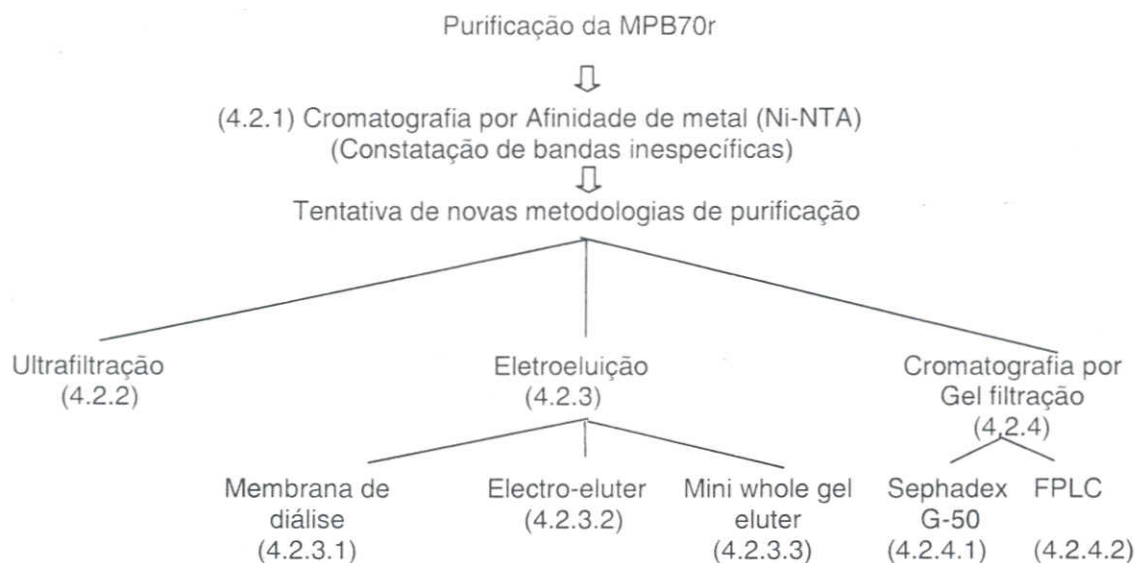
Em tubos de polipropileno de 50 mL foram colocados 10 mL de meio LB / ampicilina / canamicina e inoculados 400 µl da cultura transformada com pQE30 recombinante (clones A e E). Os tubos foram incubados 16 – 18 horas a 37°C. As culturas foram inoculadas separadamente em 50 mL de meio LB / ampicilina / canamicina e novamente incubadas a 37°C até alcançarem densidade óptica de 0,5 – 0,7 em comprimento de onda 600 nm. Em seguida foram retiradas alíquotas de cada

cultura para análise em SDS-PAGE, e após foi feita a indução com IPTG (concentração final de 1 mM). Após 5 horas da indução outras alíquotas foram retiradas para análise em SDS-PAGE. As culturas foram centrifugadas a 4.000 x g por 20 min. Os sedimentos foram suspensos separadamente em 5 mL de tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄¹, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol² pH 8,0). As suspensões bacterianas foram lisadas com sonificador Sonics Vibra CellTM 30 ciclos de 10 segundos com intervalo de 10 segundos a 100 W. Os lisados foram centrifugados a 10.000 x g a 4°C por 30 min. Os sobrenadantes contendo proteínas foram denominados frações solúveis e coletados para análise por SDS-PAGE. As proteínas presentes nos sedimentos foram ressuspensos em 5,0 mL do tampão de lise e analisadas por SDS-PAGE. As MPB70r expressas pelos clones (A) e (E) não foram observadas na fração solúvel. A partir desses achados os clones foram incubados nas temperaturas de 22°C, 25°C e 30°C a fim de se conseguir produção da MPB70r na fração solúvel. Foi observado que a temperatura que produziu a MPB70r solúvel foi a de 30°C. A partir de então o clone (A) foi escolhido para produção da MPB70r nessa temperatura.

4.2 – Purificação da MPB70r

A purificação foi realizada inicialmente por cromatografia de afinidade metálica, porém somente esse único passo não foi suficiente para se conseguir o grau de pureza desejado, por isso foram necessários estudos utilizando outras metodologias de purificação que estão a seguir esquematizadas. Todos os processos de purificação foram realizados no Laboratório de Imunologia sob a Orientação do Dr. Luiz Guilherme Heneine (Fundação Ezequiel Dias / MG).

Esquema representativo da purificação da MPB70r



4.2.1 - Processo de purificação da MPB70r através de cromatografia de afinidade metálica (Ni-NTA)

Para o processo de purificação foi feita a cultura do clone (A) cuja indução da expressão da MPB70r foi realizada de forma semelhante ao descrito anteriormente (item 4.1.14), porém utilizando-se um volume de 1 litro de meio. Após 5 horas de indução com IPTG, a cultura foi centrifugada a 4.000 x g por 20 min e o sedimento suspenso em tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol², 1 mM PMSF², pH 8,0) na proporção de 5 mL por grama de sedimento. A suspensão bacteriana foi lisada com sonificador Sonics Vibra CellTM 30 ciclos de 10 segundos com intervalo de 10 segundos a 100W. O extrato bruto foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min a 4°C para a remoção de debris celulares insolúveis. Para cada 1 mL de extrato foi acrescentado 1 mL de resina Ni-NTA (ácido níquel – nitrilotriacético, QIAGEN Inc., USA) equilibrada previamente no tampão de lise. A mistura incubada a temperatura ambiente por 60 min foi transferida para a coluna. A cromatografia de afinidade foi realizada no aparelho GradiFracTM System (Pharmacia-Biotech, USA) sob fluxo contínuo de 1,0 mL/min. As frações foram coletadas em um volume de 1,0 mL/tubo e analisadas por densidade óptica no comprimento de onda

280nm. O eluato contendo as proteínas que não se ligaram à resina foi coletado e armazenado a -20°C. A resina foi lavada várias vezes com o tampão de lavagem (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM PMSF, pH 8,0) até a leitura da densidade óptica retornar ao limiar basal. A proteína foi eluída com o tampão de eluição (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, 1 mM PMSF, pH 8,0). Cada fração coletada foi analisada por SDS-PAGE em tampão Tris-Glicina. Após, o gel foi submetido às colorações por impregnação pela prata e/ou azul de Comassie. A quantificação da MPB70r foi determinada pelo Método de Lowry (Lowry et al., 1951).

A presença de proteínas contaminantes foi verificada por SDS-PAGE. A fim de diminuir os contaminantes eluídos juntamente com a MPB70r foi aumentada a força iônica do tampão de lavagem para 600 mM de NaCl.

Na tentativa de eliminar esses contaminantes foram realizadas outras metodologias de purificação como: ultrafiltração, eletroeluição e gel filtração.

4.2.2 - Ultrafiltração

Esperava-se com essa metodologia separação das proteínas contaminantes

com peso acima de 49 kDa. Para tanto as proteínas purificadas por cromatografia de afinidade metálica foram concentradas e dialisadas contra PBS 0,01 M e concentradas por ultrafiltração em AMICON 8010 e 8050 (AMICON, USA) usando membrana de celulose regenerada YM3 (Millipore Corporation, USA) em 30 psi. Em seguida a amostra foi passada na membrana de celulose regenerada YM30 (Millipore Corporation, USA). As proteínas do filtrado e as presentes no líquido que ficou retido na membrana foram analisadas por SDS-PAGE.

4.2.3 – Eletroeluição

4.2.3.1 – Membrana de diálise.

Nessa metodologia a banda correspondente à proteína foi cortada do gel após eletroforese em SDS-PAGE. Os fragmentos foram introduzidos em membranas de diálises que foram mergulhadas em tampão Tris-glicina e submetidas à corrente elétrica de 100V por 1 hora. O líquido dentro da membrana foi recolhido, concentrado e dialisado contra PBS 0,01 M por ultrafiltração em AMICOM usando membrana de celulose regenerada YM3 (Millipore Corporation, USA).

4.2.3.2 - Electro-Eluter

Nessa metodologia, após eletroforese em SDS-PAGE, o gel contendo a banda da proteína foi cortado e introduzido em tubos de vidros do Electro-Eluter modelo 422 (Bio-Rad Laboratories, USA), contendo uma membrana de diálise e um pequeno reservatório na extremidade final. O tubo foi preenchido com tampão Tris-glicina e o suporte foi introduzido em uma câmara contendo 600 mL do mesmo tampão. A eletroeluição foi realizada utilizando corrente constante de 8 – 10 mA por tubo durante 5 horas. As proteínas eluídas se concentravam no reservatório. Uma alíquota foi recolhida para análise em SDS-PAGE.

4.2.3.3 - Mini Whole Gel Eluter

Após eletroforese em SDS-PAGE todo o gel foi colocado no aparelho Mini Whole Gel Eluter (Bio-Rad Laboratories, USA) sobre a câmara de eluição já montada contendo placa do eletrodo, duas folhas de papel de filtro, uma folha de papel celofane e tampão Tris - ácido bórico pH 8,7 (50mM Tris e 25mM de ácido bórico¹). Após remoção de todas as bolhas, foram colocadas por cima do gel duas folhas de papel de filtro, sob esse "sanduíche" a câmara foi fechada com outra placa de eletrodo. A eletroeluição foi realizada a 75 mA por 30 minutos. Após, a polaridade elétrica foi invertida e foi aplicada corrente de 75mA por 15 segundos para deslocar as proteínas ligadas ao celofane. As bandas foram coletadas por um dispositivo do próprio aparelho através de vácuo. Uma alíquota de cada banda coletada foi submetida análise por SDS-PAGE.

4.2.4 - Processo de purificação da proteína por gel filtração

4.2.4.1 - Gel filtração em Sephadex G-50

As proteínas após purificação por cromatografia de afinidade metálica foram aplicadas na coluna de gel filtração Sephadex G-50 com 1 cm de diâmetro e 12 cm de comprimento (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). Esse gel possui capacidade de separação de proteínas globulares de 1500 a 30.000 Da. A cromatografia de gel filtração foi realizada no aparelho GradiFrac™ System (Pharmacia-Biotech, USA) com PBS 0,01 M sob fluxo contínuo de 18 mL / hora e fração de 1 mL por tubo. Após cada fração coletada foi feita leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm e analisada posteriormente em SDS-PAGE.

4.2.4.2 - Gel filtração em sistema de FPLC (Cromatografia líquida rápida para proteína)

Essa técnica permite a eluição de proteínas da coluna por ordem de tamanho molecular, sendo as de maior tamanho eluídas primeiro, em seguida as de tamanho intermediário e por fim as de menor tamanho. A separação das proteínas é influenciada por fatores como: volume da amostra em relação volume da coluna, fluxo, dimensão da coluna, tamanho das partículas da resina, distribuição dessas partículas, densidade de compactação, porosidade da partícula e viscosidade da fase móvel.

O processo de purificação por gel filtração em sistema de FPLC foi realizado utilizando-se o aparelho ÄKTA™ basic 10 (Amersham Biosciences, Sweeden). As amostras purificadas por cromatografia de afinidade metálica foram dialisadas contra PBS 0,01M e concentradas por ultrafiltração em AMICON 8010 e 8050 (AMICON, USA) usando membrana de celulose regenerada YM10 (Millipore Corporation, USA). Em seguida a amostra foi clarificada em filtros descartáveis com porosidade de 0,22 µm (Millipore Corporation, USA) e equilibrada em PBS 0,2 M.

A coluna Tricorn™ HR10/30 (Amersham Biosciences, Sweeden) com 10 mm de diâmetro e 30 mm de comprimento foi preenchida, de acordo com protocolo do fabricante, com resina Superose12™ prep grade (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) com capacidade de separação de 1000 – 3 x 10⁵ Da. A Coluna foi e equilibrada com PBS 0,2 M e pré-calibrada com marcadores de tamanho molecular. Após foram aplicados 500 µl da amostra já equilibrada com PBS 0,2 M em fluxo contínuo de 0,3 mL/min e fração 0,5 mL/tubo a 0,5 MPa. As absorvâncias das frações foram monitoradas nos comprimentos de ondas de 280 e 256 nm. Os picos foram coletados, dialisados contra

PBS 0,01 M por ultrafiltração em AMICON 8010 e 8050 (AMICON, USA) usando membrana de celulose regenerada YM3 (Millipore Corporation, USA) e analisados por SDS-PAGE.

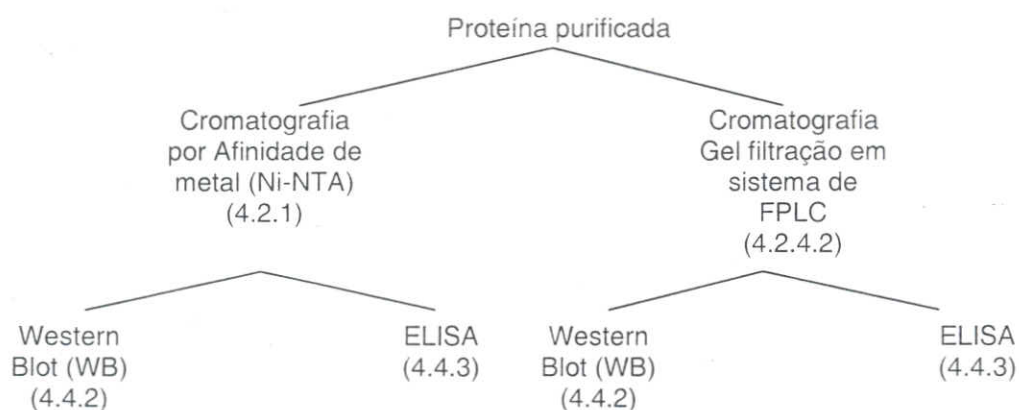
4.3 – Produção de soros imunes anti-MPB70r, anti- *M. bovis* e anti- *M. avium*

Para as imunizações foram utilizadas as MPB70r purificadas por cromatografia de afinidade metálica (item 4. 2.1).

Para a produção de soro imune foram usados coelhos machos da raça Nova Zelândia com aproximadamente 2 Kg. Dois coelhos foram sensibilizados com *M. bovis* AN5 e dois com *M. avium* D4 ambos inativados por calor, cedidos gentilmente pelo Dr. Pedro Moacir Pinto Coelho Mota (LARA – Pedro Leopoldo/ MG). No esquema de imunização foram utilizados 2 mg/mL de antígeno emulsificados em adjuvante de Freund incompleto e administrados por via subcutânea no dorso do animal em quatro sítios distintos. As inoculações posteriores foram realizadas utilizando-se 1 mg/mL de antígeno emulsificados em adjuvante de Freund incompleto nos tempos 0, 21, 35, 49 e 63 dias. Antes de cada inoculação foi coletado sangue da veia marginal da orelha de cada coelho para acompanhamento da produção dos anticorpos. Os coelhos foram anestesiados para a sangria por punção cardíaca. O sangue coletado foi deixado a 37°C por 2 horas e depois mantido a 4°C por 24 horas. Os soros foram separados por centrifugação e coletados para os ensaios de imunodiagnósticos.

4.4 - Imunodiagnósticos

Os imunodiagnósticos realizados estão mostrados no esquema representativo abaixo:



4.4.1 – Anticorpos utilizados

Para a padronização dos testes sorológicos foram utilizados anticorpos primários nas diluições de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1000. Como controles positivos foram: soro imune de coelho anti-*M. bovis* e anti-MPB70r (produzidos de acordo com o item 4.3), anticorpo monoclonal 4 C3/17 anti-MPB70 (AGEN Biomedical Limited – Austrália). Como controle negativo foi utilizado soro imune de coelho anti-*M. avium* (item 4.3).

Anticorpos secundários conjugados com peroxidase nas diluições de 1:500, 1:1500, 1:3000 e 1:6000. Estes foram: anti-IgG de coelho peroxidase (Sigma - USA) ou Proteína G peroxidase (Sigma- USA).

Após padronização foram utilizados nos testes de ELISA e WB: soros de campo de animais reagentes ou não à tuberculinização. Para os estudos de especificidade também foram utilizados soros de animais com paratuberculose gentilmente cedido pelo Dr. Walter Lilenbaum (Laboratório de Bacteriologia – UFF), e soro de animal sensibilizado com *M. avium* gentilmente cedido pelo Dr. Pedro Moacir Pinto Coelho Mota (LARA/Pedro Leopoldo – MG). Na Tabela 2 está a relação dos números dos soros dos animais utilizados.

4.4.2 - Western Blot (WB)

Trinta microgramas da MPB70r foram separadas por SDS-PAGE. Em cada corrida foi adicionado o marcador de tamanho molecular pré-corado Bench Mark™ prestained Protein Ladder (Invitrogen – LifeTechnologies - USA) consistindo de 10 proteínas com peso molecular aparente de aproximadamente 10 a 200 kDa. Após corrida o gel foi equilibrado no tampão de transferência (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% v/v metanol) por 15 min juntamente com a membrana de nitrocelulose 0,45 µm Trans-blot (Bio-Rad Laboratories, USA). Após a montagem a transferência foi feita a 100V por 60 min em Mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories, USA) e a membrana foi submersa em tampão de bloqueio TBS (0,05 M Tris base; 0,15M NaCl, 4% de leite em pó desnatado e 0,02% Tween 20) por 2 horas a 37°C. A membrana foi lavada por 10 min em TBS, 10 min TBS 0,1% Tween 20, 10 min em TBS e incubada com anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio por 1 hora a 37°C. A membrana foi lavada novamente e incubada com o anticorpo secundário também diluído em solução de bloqueio, por 1 hora a 37°C. Após lavagem, a revelação foi feita usando-se o substrato DAB (DAB² 10 mg, PBS 20 mL, 20 µL H₂O₂ 3%) até o aparecimento das bandas do controle positivo. A reação foi interrompida lavando a membrana com água destilada.

Tabela 2: Soros de animais de campo relacionados por rebanho utilizados nos ELISA e nos WB

Soros	Identificação do rebanho	Identificação do animal
Soros de Animais com tuberculinização-positiva vindos de rebanhos positivos	1	1, 60, 63, 111, 132, 172, 189, 194, 221, 286, 367, 431, 503, 783, 792, 819, 1014, 1246, 1509, 1733
	2	Baleia, Dinorá, Portela
	3	83, 128, 134, 137, 144, 154
	4	374, 393
	5	925, 777
	Total	33
Soros de animais de Rebanhos livres de tuberculose	6	3, 4, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 23, 26, 29, 32, 34, 36, 37, 43, 47, 48, 49, 50, 52, 55, 56, 57, 62, 63, 64, 65, 67, 69, 70, 71, 73, 79, 82, 83, 86, 88, 89, 110, 148, 149, 151, 158, 164, 166, 213, 224, 226, 231, 233, 235, 236, 237, 240, 247
	7	353
	8	8, 39
	Total	63
	Soros para Teste de especificidade	Paratuberculose positivo
Paratuberculose negativo		474, 462, C ⁻ , Rep ⁻
Total		9
Soros de bovinos sensibilizados	<i>M. avium</i> **	n° P08
	<i>M. bovis</i> **	n° 44
	Total	2

* Soros de animais cedidos pelo Dr. Walter Lilienbaum (Laboratório de Bacteriologia – UFF).

** Soros de animais cedidos pelo Dr. Pedro Moacir Pinto Coelho Mota (LARA/ Pedro Leopoldo – MG). Em negrito estão destacados os soros que foram utilizados em todos os ELISA

4.4.3 - ELISA

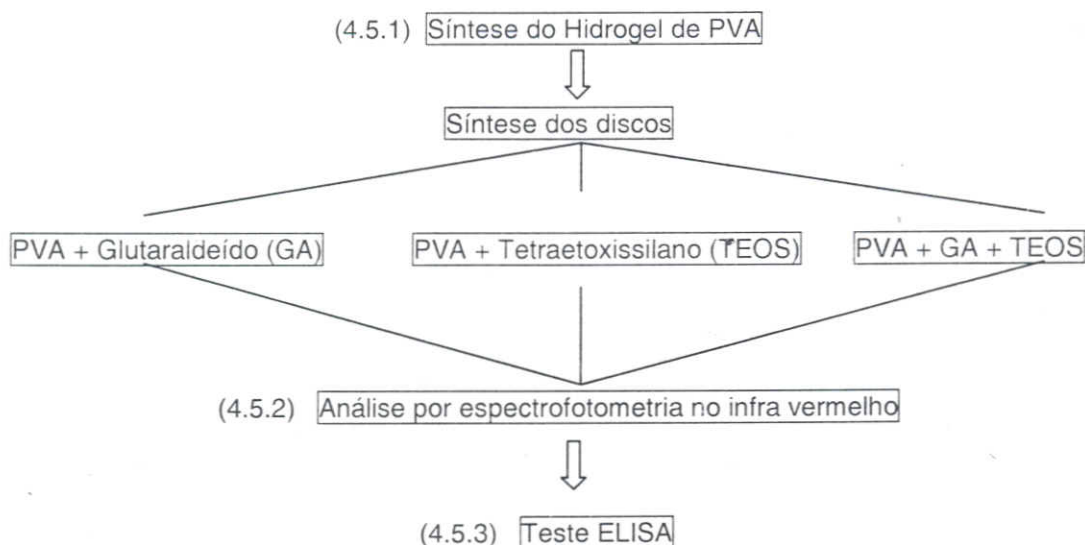
A placa para ensaios imunoenzimáticos Maxisorp[®] Nunc (Nalgene Nunc International, USA) com 96 orifícios foi sensibilizada 50 µl com 0,25; 0,5 e 1,0 µg de MPB70r em tampão Tris pH 9,0 e incubada por 1 hora a 37°C. Após incubação a placa foi lavada cinco vezes com tampão PBS acrescido de 0,05% Tween 20 (PBST). O bloqueio foi feito com solução PBST 4% leite em pó por 3 horas a 37°C. Após lavagem da placa com PBST, foi adicionado 50 µl dos anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C, em seguida foi lavada com PBST por seis vezes e incubada por 1 hora a 37°C com 50 µl dos anticorpos secundários diluídos em solução de bloqueio. A placa foi novamente lavada e a revelação foi feita usando-se o substrato OPD² (ortofenilenediamina) durante 45 min a 37°C. A reação foi parada após adição de

50 µl de 1 M H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA "microplate reader" modelo 550 (BioRad Laboratories, USA) no comprimento de onda de 492nm.

Como os experimentos de ELISA foram realizados em tempos diferentes foi necessário obter um fator de correção entre as placas. Para isso a partir da diferença das médias das leituras das absorvâncias dos controles positivos e negativos de cada placa, foi feita uma relação de proporcionalidade entre elas. Cada leitura de absorvância de cada placa foi dividida por seu respectivo fator de proporcionalidade.

4.5 - Síntese de materiais alternativos para uso como suporte nos testes de ELISA

Esquema representativo da síntese dos discos com base polimérica de PVA



4.5.1 - Síntese de hidrogel de álcool polivinílico (PVA)

Os hidrogéis de PVA foram sintetizados no Lab. de Análise e caracterização de superfície e Materiais sob a orientação do Prof. Dr. Herman S. Mansur (LASMAT / Escola de Engenharia - UFMG).

Para a síntese dos dispositivos poliméricos foi utilizado PVA (CRQ, Brasil) peso molecular de 72.000, GA 25% em água (Fluka, USA); TEOS (Aldrich, USA); HCl (Bioquímica do Brasil, BR).

O PVA peso molecular 72.000 g/mol foi usado como base polimérica do hidrogel. A solução de PVA foi preparada dissolvendo-se o PVA 5% (p/v) em água deionizada a 60°C em constante agitação com barra magnética. Após total dissolução do polímero o pH 2,0 foi acertado com solução de HCl 1N. As soluções hidrogel PVA + glutaraldeído (GA) e dos discos híbridos PVA + tetraetil ortossilicato (TEOS) e PVA + GA + TEOS, foram preparados numa fração de 25% em relação à solução de PVA 5% pH 2,0 (v/v). Como moldes foram utilizadas placas de poliestireno de 96 e 24 orifícios para cultura de célula (SARSTEDT, USA), que foram preenchidos com 100 µl / orifício e 1 mL / orifício, respectivamente, de cada solução dos hidrogéis. Os hidrogéis foram deixados a temperatura ambiente por 1 semana. E depois levados para estufa a 60°C por 24 horas para secagem final. Os hidrogéis depois de prontos foram usados para análises de espectroscopia no infravermelho e ensaios de ELISA.

4.5.2 - Análises dos hidrogéis e dos discos híbridos por espectroscopia na região do infravermelho

Análises dos espectros de absorção da radiação no infravermelho mostram diferenças dos níveis de energia vibracionais e rotacionais de espécies moleculares. Comparando-se espectros de um composto desconhecido com o de uma amostra conhecida, a correlação pico a pico constitui boa prova de identidade, visto ser

pouco provável que dois compostos diferentes tenham o mesmo espectro no infravermelho. As análises por espectroscopia de infravermelho foram utilizadas nesse trabalho para determinar a presença dos grupos químicos específicos dos agentes reticuladores (GA e TEOS) bem como da ligação da MPB70r aos hidrogéis sintetizados.

A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi usada na caracterização química dos hidrogéis (Perkin-Elmer, Paragon 1000). Os hidrogéis de PVA+GA e os discos híbridos de PVA+GA+TEOS foram triturados e misturados na proporção de 1,0% ao KBr¹ (Brometo de Potássio), previamente secado em estufa a 120°C por 24 horas. Foram obtidos espectros entre 4000 e 400 cm⁻¹ durante 64 varreduras, resolução 2 cm⁻¹, modo de reflexão difusa.

4.5.3 - ELISA usando como suporte hidrogel e discos híbridos de PVA

As placas Corning (Corning Incorporation Life Sciences, USA) usadas como alojamento dos hidrogéis foram de cultura de célula com 96 orifícios tratados previamente com solução de ácido nítrico a 20% por 72 horas, lavadas 10 vezes em água corrente e três vezes em água deionizada. Após secagem em estufa 37°C foram colocados os hidrogéis para os ensaios imunoenzimáticos. A metodologia do teste de ELISA nos hidrogéis foi a mesma já descrita no item 4.4.3 e realizada simultaneamente. Para se eliminar a possibilidade de algum dos reagentes aderirem nas placas foram realizados testes mantendo os hidrogéis no poço e também os transferindo de poço a cada etapa do ELISA. Ao final do ensaio de ELISA, os hidrogéis foram removidos, sendo a leitura realizada no leitor de ELISA "microplate reader" modelo 550 (BioRad Laboratories, USA) no comprimento de onda de 492nm.

Como os experimentos de ELISA foram realizados em tempos diferentes foi necessário obter um fator de correção entre as placas. Para isso a partir da diferença

das médias das leituras das absorvâncias dos controles positivos e negativos de cada placa, foi feita uma relação de proporcionalidade entre elas. Cada leitura de absorvância de cada placa foi dividida por seu fator de proporcionalidade.

Não foi feita a padronização do teste para obedecer a Lei de Lambert-Beer.

4.6 – Análises Estatísticas

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo foram calculados segundo Noordhuizen et al. (1997). Para a seleção do ponto de corte foi utilizada a curva ROC (Receiver-Operating Characteristic) segundo Greiner et al (2000) pelo programa Medcalc.

A concordância entre o ELISA e a tuberculinização intradérmica foi avaliada pelo teste de *Kappa* (κ) segundo Smith (1994).

5 - RESULTADOS e DISCUSSÃO

Diversos antígenos do *M. bovis* têm sido avaliados para serem utilizados no diagnóstico da tuberculose bovina, tais como: MPB70, MPB64, p65, p70 e 39 kDa (Fifis et al., 1992). Dentre eles a MPB70 tem se destacado, pois é o antígeno imunodominante do *M. bovis* contendo epítomos espécie-específicos (Wood et al., 1988; Fifis et al., 1992). A MPB70 é um componente ativo do Derivado Protéico Purificado de culturas de *M. bovis* (PPD) (Harboe et al., 1990), capaz de

desencadear a resposta imune de hipersensibilidade do tipo retardada (Nagai et al., 1981), estimular a produção de interferon gama (IFN- γ) (Wood et al., 1992) e a produção de anticorpos (Fifis et al. 1992; Wood et al. 1992).

5.1 – Produção da MPB70r

5.1.1 - Extração do DNA do *M. bovis* e amplificação do gene da MPB70 madura por PCR.

A MPB70 foi seqüenciada por Radford et al. (1988) a partir do gene do *M. bovis* AN5. Terasaka (1989) também determinou a seqüência nucleotídica da MPB70 em espécie de *M. bovis* BCG Tokyo. A estrutura tri-dimensional dessa proteína somente foi determinada 11 anos depois por Carr et al. (2003).

Nesse trabalho foi utilizada a espécie *M. bovis* AN5 para extração do DNA. A concentração do DNA extraído foi estimado em 0,22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ com 74% de pureza.

Como mostra a Figura 2, o fragmento gênico da MPB70 madura foi amplificado e apresentou uma banda única na eletroforese em gel de poliacrilamida com aproximadamente 500 bp. Essa banda corresponde à seqüência codificadora para MPB70 sem peptídeo sinal, acrescido do sítio de restrição para *Bam*H1, introduzido na etapa de amplificação. A concentração do DNA amplificado foi estimado em 0,49 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

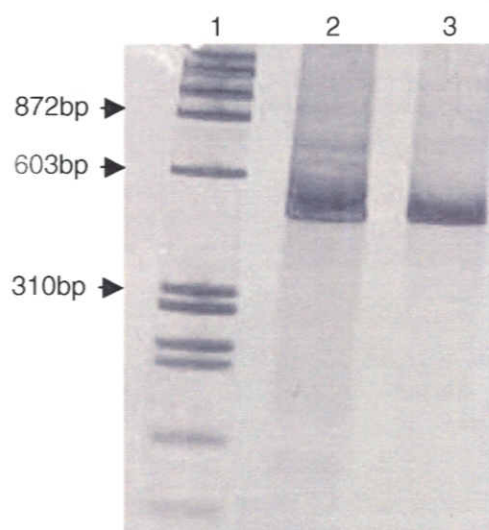


Figura 2: Gene da MPB70 madura amplificado por PCR a partir de diferentes concentrações de DNA do *M. bovis* AN5. Eletroforese em gel de poliacrilamida corado por impregnação pelo nitrato de prata. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular ϕ X 174 RF DNA/HAEIII (Gibco-BRL, Brasil); Canaletas 2 e 3: Gene amplificado da MPB70 madura produzido a partir de 55 e 11ng de DNA, respectivamente.

5.1.2 - Transformação e comprovação da presença do pGEM-T[®] recombinante na bactéria hospedeira por PCR

Foram coletados 13 clones. A partir das culturas desses clones de *E.coli* JM109 transformadas foram feitas as reações de

PCR. Dos 13 clones coletados somente nove continham o inserto. Na Figura 3 (canaletas 1 a 6) pode-se observar o gene da MPB70 madura amplificado com aproximadamente 500bp em seis dos clones positivos.

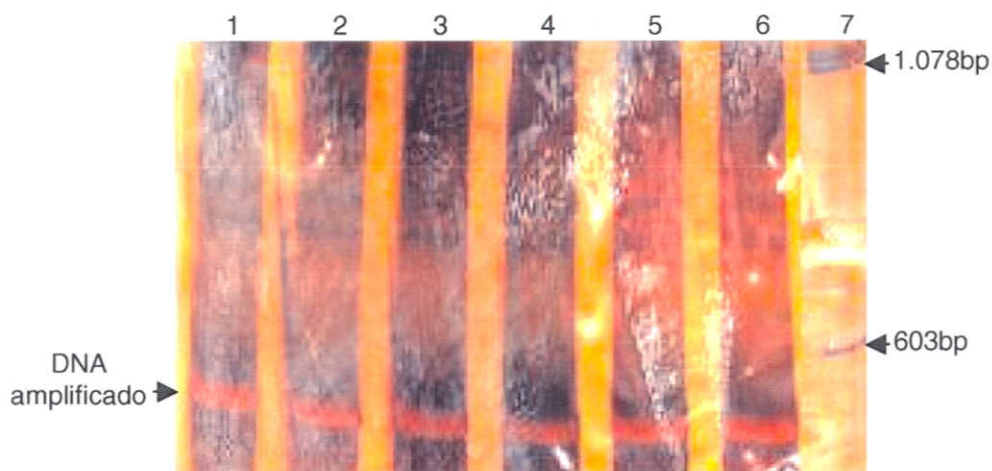


Figura 3: Produtos da PCR das colônias de *Escherichia coli* JM109 transformadas com pGEM-T[®] recombinante. Eletroforese em gel de poliacrilamida corado por impregnação pelo nitrato de prata. Canaletas 1 a 6: gene da MPB70 madura amplificado. Canaleta 7: marcador de tamanho molecular ϕ X 174 RF DNA/HAEIII (Gibco-BRL, Brasil).

5.1.3 - Expansão, purificação e quantificação do DNA plasmidial dos clones recombinantes

Após comprovação, todos os clones foram expandidos a fim de se obter maior quantidade de plasmídeo recombinante. O DNA plasmidial de cada clone recombinante foi purificado e quantificado por espectroscopia UV-VIS cujos resultados estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Estimativa da concentração de DNA plasmidial recombinante dos clones de *E.coli* JM109 transformada por pQE30 recombinante

Identificação do clone	A _{260nm}	DNA (µg/µl) (Sambrook et al., 1989)
1	0,043	0,86
2	0,011	0,22
3	0,014	0,28
4	0,010	0,20
5	0,008	0,16
6	0,006	0,12
7	0,069	1,38
8	0,009	0,18
9	0,012	0,24

Fórmula: Concentração de DNA(µg/µL) = A_{260nm} x 50 x 400 (diluição) / 1000

5.1.4 - Extração do Gene da MPB70 madura do plasmídeo pGEM[®]

Foram escolhidos quatro clones para análise do inserto extraído após digestão enzimática por *Bam*H1 – *Sph*1 e *Bam*H1 – *Sac*1. Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. Na Figura 4, canaletas 3, 6, 10 e 13 foram observadas bandas nos quatro clones positivos estudados, uma com cerca de 530 pb indicativas da liberação do DNA codificador da MPB70 do pGEM-T[®] pela digestão por *Bam*H1 – *Sph*1 (essa banda corresponde ao gene da MPB70 madura acrescido dos sítios de restrição para as enzimas *Bam* H1, *Sac*II, *Nco*I, *Bst*Z1 e *Sph*1) e a outra acima de 2.000 bp referente ao restante do plasmídeo. Pela digestão com *Bam*H1 – *Sac*1 só se observa um fragmento acima de 2.000 pb o outro de 24 bp não foi visualizado.

Através da análise da Figura 4 ficou confirmada que o Gene codificador para MPB70 foi inserido na região múltipla de clonagem (Anexo 1) no sentido 3' – 5' do plasmídeo pGEM-T[®].

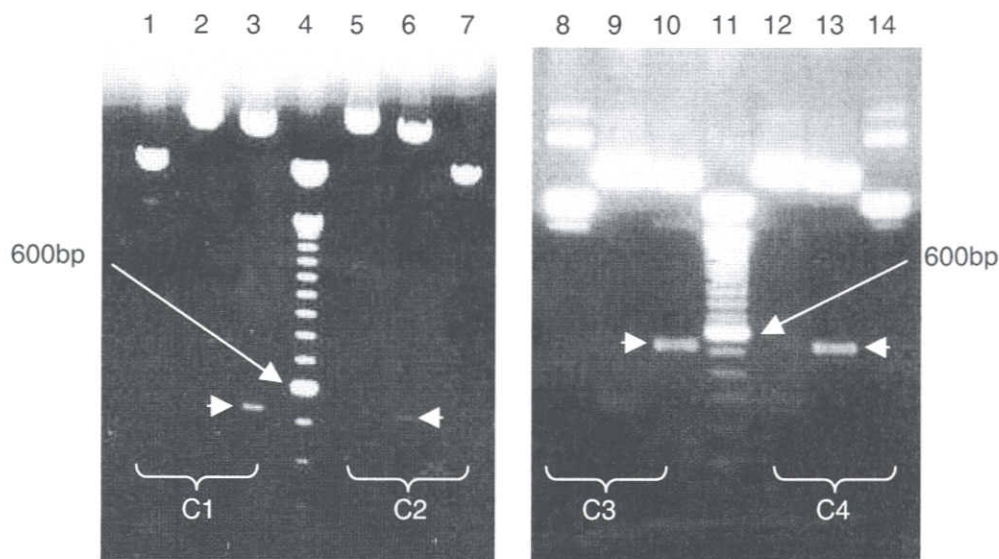


Figura 4: Produto da digestão enzimática dos plasmídeos provenientes dos clones recombinantes de *E. coli* JM109. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Canaletas 1, 7, 8 e 14 : plasmídeos não digeridos dos clones 1 a 4 respectivamente; Canaletas 2, 5, 9 e 12: plasmídeos digeridos por *Bam*H1 e *Sac*I dos clones 1 a 4 respectivamente; Canaletas 3, 6, 10 e 13: plasmídeos digeridos por *Bam*H1 e *Sph*1 dos clones 1 a 4 respectivamente; Canaletas 4 e 11: marcador de tamanho molecular DNA Ladder 100bp (Gibco-BRL, Brasil). As setas curtas mostram o inserto liberado após digestão por *Bam*H1 – *Sph*1. C1 a C4: Clones 1 a 4.

5.1.5 - Transformação e confirmação da presença do pQE30 recombinante nas culturas de *Escherichia coli* M15 transformadas

Dos 20 clones coletados, nove foram escolhidos para verificar a presença do inserto por PCR. Nesses, somente os clones denominados de A, E, F, G e H (Figura 5 canaletas 2, 6, 7, 8 e 9 respectivamente) apresentaram banda amplificada com maior intensidade que os B, C, D e I (Figura 5 canaletas 3, 4, 5 e 10 respectivamente). O clone (A) apresentou uma única banda amplificada com tamanho aproximado de 530pb como esperado, já nos demais foram observadas outra banda de 700 bp além da esperada. Os clones (A) e (E) foram escolhidos para ensaios da indução da expressão da MPB70r.

5.1.6 - Seqüenciamento do pQE30 recombinante

As características do pQE30 se encontram no Anexo 2.

Na Figura 6 está o seqüenciamento editado do pQE30 recombinante. Nessa seqüência foi possível verificar a região do operador, o sítio RBSII (Synthetic ribosomal binding site) que é responsável pelas altas taxas de tradução e pelo início da tradução no ATG correto, e todo o gene codificador da MPB70 inserido entre os sítios das enzimas de restrição *Bam*HI e *Sph*1. Também foi possível observar as seqüências codificadoras para seis histidinas adjacente ao sítio de inserção do DNA da MPB70. Esse fato é importante, pois a quantidade de histidina presente na proteína recombinante influencia no processo de purificação por cromatografia de afinidade metálica. Ainda nessa figura estão as seqüências das enzimas de restrição *Sac*II, *Nco*I e *Bst*ZI que foram adquiridas após extração do DNA codificador da MPB70r do plasmídeo pGEM-T®.

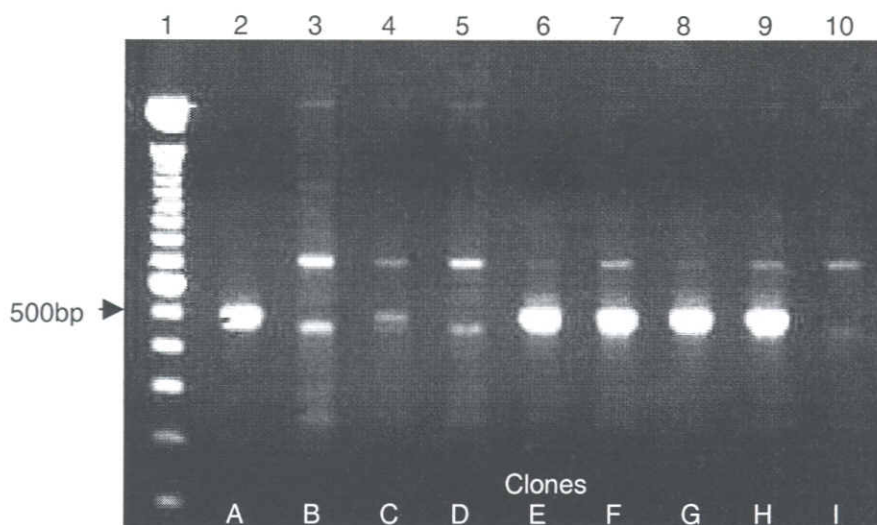


Figura 5: Produtos da PCR de nove clones de *E. coli* M15 transformadas com o pQE-30 recombinante. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 100bp DNA ladder. (Gibco-BRL, Brasil) Canaletas 2 a 10: DNA amplificado dos clones (A) a (I), respectivamente.

Pelo programa "Translate Tool", disponível no endereço eletrônico <http://au.expasy.org>, foi verificado que o DNA da MPB70 foi inserido de maneira que sua fase de leitura ficou correta e em fase com o ATG iniciador, ou seja, a MPB70r foi inserida de forma correta na 1ª fase de leitura (Anexo 3).

A seqüência editada entre os nucleotídeos 222 - 713 (Figura 6) foi submetida à análise de identidade com seqüências depositadas no "GenBank" (BLAST-N e BLAST-X Anexos 4 e 5 respectivamente) disponíveis no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Por essas análises ficou demonstrado que MPB70r possui 100 % de identidade com a seqüência nucleotídica da proteína MPB70 nativa do *M. bovis*, e com a MPT70 do *M. tuberculosis*. Apresentou também, 79% de identidade com as seqüências da proteína do *M. kansasii* e com as proteínas MPB83 do *M. bovis* e MPT83 do *M. tuberculosis*.

Pelas análises de composição de aminoácidos através do programa "ProtParam tool" (Anexo 6) observou-se que a partir do ATG inicial, seqüência nucleotídica entre 186 - 713 (Figura 6), a MPB70r possui tamanho molecular teórico estimado de 17,7 kDa, ponto isoelétrico 5,89 e é estável (índice de classificação de estabilidade igual a 27,14). Enquanto que a MPB70 nativa (Anexo 7) possui tamanho molecular teórico estimado de aproximadamente de 16,3 kDa, ponto isoelétrico 4,31 e é estável (índice de classificação de estabilidade igual a 30,02). Essas diferenças entre a MPB70r e a MPB70 nativa estão relacionadas aos 36 nucleotídeos localizados na região entre 186 - 221 (Figura 6) que codificam para arginina, glicina, serina, seis histidinas, glicina e serina anterior à seqüência nucleotídica que codifica para a MPB70r localizada em 222-713 (Figura 6).

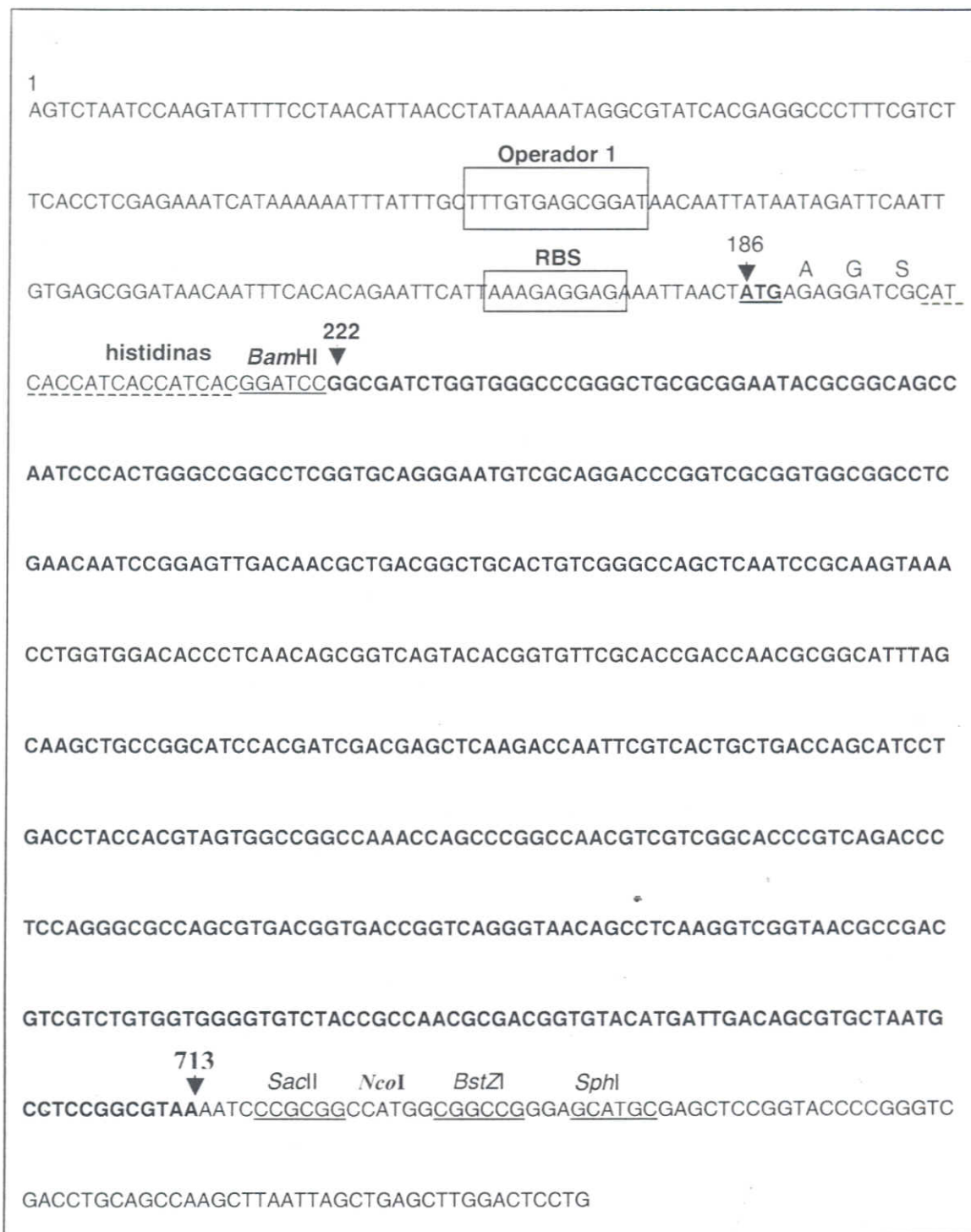


Figura 6: Sequência editada dos nucleotídeos da MPB70r no pQE30 recombinante. 1 - 185: plasmídeo pQE30 onde estão as seqüências referentes ao operador I e RBS. 186 - 221: ATG inicial seguido das seqüências que codificam para os aminoácidos A= arginina, G=glicina, S=Serina, na linha pontilhada as seqüências correspondentes às histidinas, e o sítio de *Bam*HI. 222-713: em negrito a seqüência gênica da MPB70r. 714 - 743: sublinhados estão mostrados os sítios de restrição das enzimas, *Sac*1, *Nco*I, *Bst*ZI e *Sph*I. 744 - 803: plasmídeo pQE30.

5.1.7 - Expressão da MPB70r em pequena escala

Sempre que se usa um sistema de expressão para uma determinada proteína é recomendável que se faça uma curva de indução da expressão em pequena escala para verificar quais as melhores condições de incubação, além de determinar o tempo em que está acontecendo a expressão após adição do indutor.

A Figura 7 mostra a cinética de expressão da MPB70r do clone A em *E. coli* M15 após indução com IPTG. A expressão da MPB70r pode ser observada desde o tempo de 1

hora após indução, com tamanho molecular estimado em aproximadamente 25 kDa. Observou-se uma relação direta entre o tempo de indução e quantidade de proteína produzida até o intervalo máximo estudado de 5 horas (Figura 7 canaletas 5 a 10). A partir desse resultado o tempo de 5h após indução foi tomado como tempo padrão para os experimentos seguintes. Resultado idêntico foi obtido para o clone E (dados não mostrados). No lisado bacteriano não induzido não se observou expressão da MPB70r (Figura 7 canaletas 1 a 3). Uma das características desejáveis quando se produz proteína recombinante é que sua expressão seja realizada somente na presença do indutor.

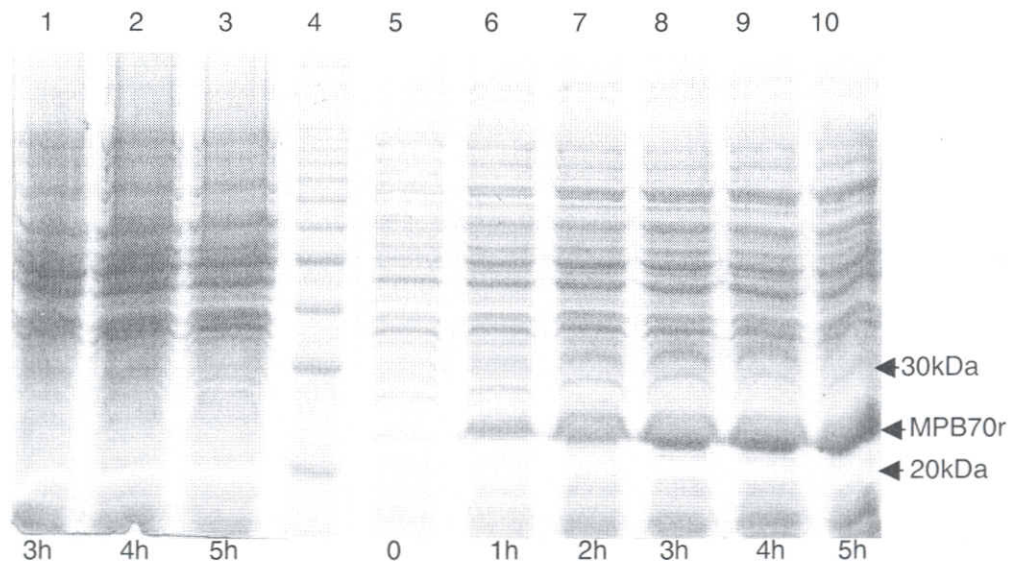


Figura 7: Cinética de indução da expressão da MPB70r em *E.coli* M15 transformada com pQE30 recombinante, antes e após indução por IPTG. Eletroforese em SDS-PAGE corado com azul de Comassie. Canaletas 1 a 3: lisado de cultura bacteriana não induzida por IPTG nos tempos de 3 a 5 horas, respectivamente; canaleta 4: marcador de peso molecular Protein ladder (Gibco-BRL, Brasil); canaletas 5 a 10: lisados de cultura bacteriana induzidas por IPTG nos tempos de 0 a 5h

Pelas análises das eletroforeses a MPB70r possui peso molecular 26 kDa superior ao que foi estimado de pelo programa "ProParam tool" (17,7kDa). Estas distorções são descritas na literatura para a MPB70 nativa que possui 16,3 kDa tendo o tamanho molecular estimado por eletroforese variando de 18 – 25 kDa (Miura et al., 1983; Wood et al., 1988; Fifis et al., 1991).

5.1.8 - Determinação da solubilidade da MPB70r

Muitas vezes altos níveis de expressão de proteínas recombinantes podem levar a formação de agregados de proteínas no citoplasma da bactéria denominados de corpos de inclusão. As proteínas presentes nesses agregados podem ser solubilizadas por substâncias desnaturantes como guanidina-HCl e uréia, porém essas substâncias podem também desnaturar epítomos conformacionais da proteína de

interesse alterando sua conformação necessária para ligação com anticorpo.

Para verificar se a MPB70r estava sendo expressa de forma solúvel ou em corpos de inclusão, foram analisados sobrenadante e precipitado dos lisados de culturas crescidas em temperaturas de incubação diferentes. Na Figura 8 foi observada a presença da MPB70r nos precipitados dos clones A e E, portanto em corpos de inclusão (canaletas 4 e 8).

A produção da MPB70r solúvel foi conseguida quando a cultura de *E. coli* transformada pelo plasmídeo pQE30 recombinante foi incubada a 30 °C (Figura 9 canaletas 1, 5, 7 e 9). Com a diminuição da temperatura ocorreu diminuição do metabolismo bacteriano e provavelmente diminuição nos níveis de expressão de proteínas e inibindo a formação de corpos de inclusão.

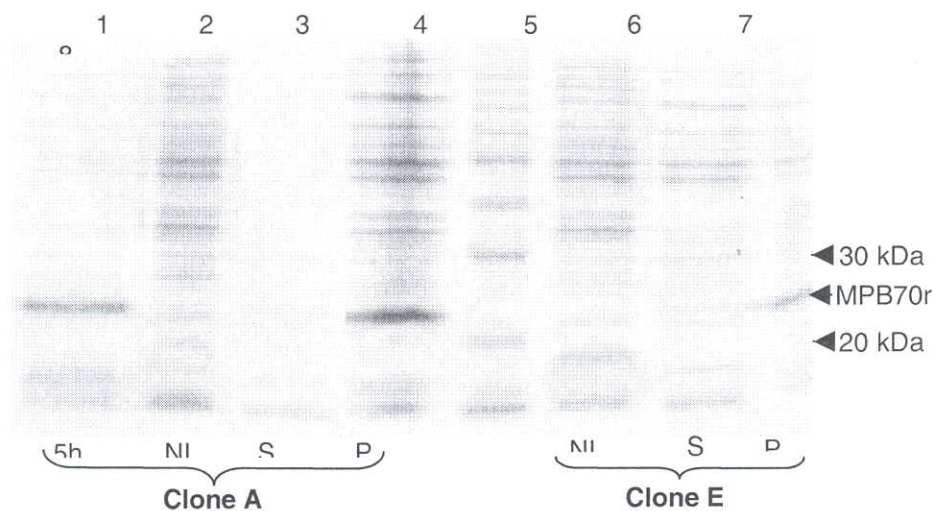


Figura 8: Determinação da solubilidade da MPB70r produzida nas culturas de *E. coli* M15 transformadas e crescidas a 37°C. Eletroforese em SDS-PAGE corado com azul de Comassie. Canaleta 1: lisado da cultura bacteriana do clone A induzido por IPTG durante 5 horas; Canaletas 2 e 6: lisados das culturas bacterianas dos clones A e E sem indução por IPTG, respectivamente; Canaletas 3 e 7 sobrenadantes das culturas bacterianas induzida por IPTG dos clones A e E, respectivamente; Canaletas 4 e 8 precipitados das culturas bacterianas induzidas por IPTG dos clones A e E, respectivamente. Canaleta 5: marcador de peso molecular protein ladder fragmentos de 10kDa (Gibco-BRL, Brasil). As letras I, NI, S e P correspondem aos lisados de cultura bacteriana induzida, e não induzida por IPTG, sobrenadante e precipitado dos lisados das culturas induzidas por IPTG, respectivamente.

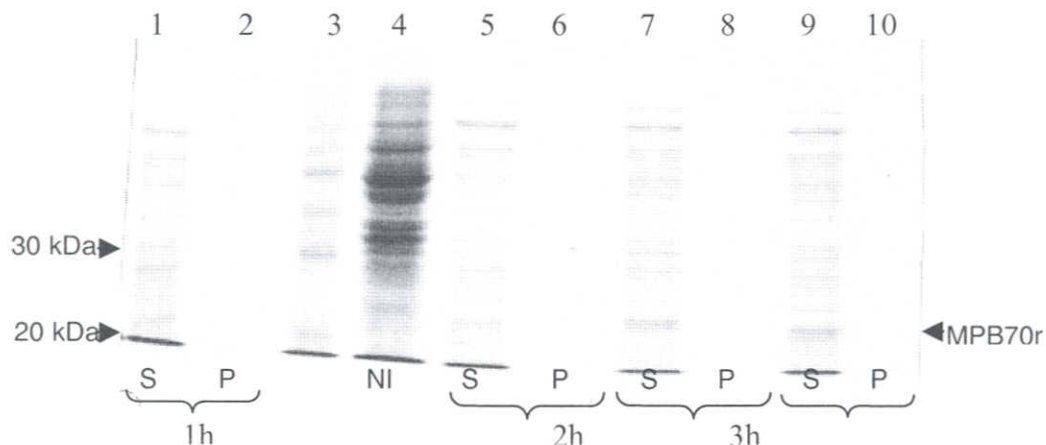


Figura 9: Determinação da solubilidade da MPB70r no sobrenadante e no precipitado da cultura do clone A incubada a 30°C em tempos variados. Eletroforese em SDS-PAGE corado com azul de Comassie. Canaletas 1, 5, 7, 9: sobrenadantes após 1, 2, 3 e 4 horas de indução por IPTG, respectivamente. Canaletas 2, 6, 8 e 10: precipitados após 1, 2, 3 e 4 horas de indução por IPTG, respectivamente. Canaleta 3: marcador de peso molecular protein ladder 10kDa (Gibco-BRL, Brasil). Canaleta 4: lisado de cultura bacteriana sem indução por IPTG. As letras NI, S e P correspondem aos lisados de cultura bacteriana não induzida por IPTG, sobrenadante e precipitado dos lisados das culturas induzidas por IPTG, respectivamente.

5.2 - Processos de purificação da MPB70r e verificação de sua reatividade em testes de ELISA e WB

5.2.1 - Purificação da MPB70r por cromatografia de afinidade metálica (Ni-NTA)

A Figura 10 mostra as frações da MPB70r purificadas por Ni-NTA a partir de culturas do clone A. Comparando-se lisado induzido (canaleta 2) com as frações eluídas durante

a cromatografia (canaletas 4 a 10) há diminuição considerável de proteínas contaminantes. Quando foi feita análise por SDS-PAGE corado por impregnação pelo nitrato de prata foi verificada além da MPB70r proteínas contaminantes de pesos moleculares acima de 30 kDa (dados não apresentados). Para melhorar esse sistema de purificação foram ensaiadas alterações na força iônica dos tampões, o que não alterou significativamente os resultados.

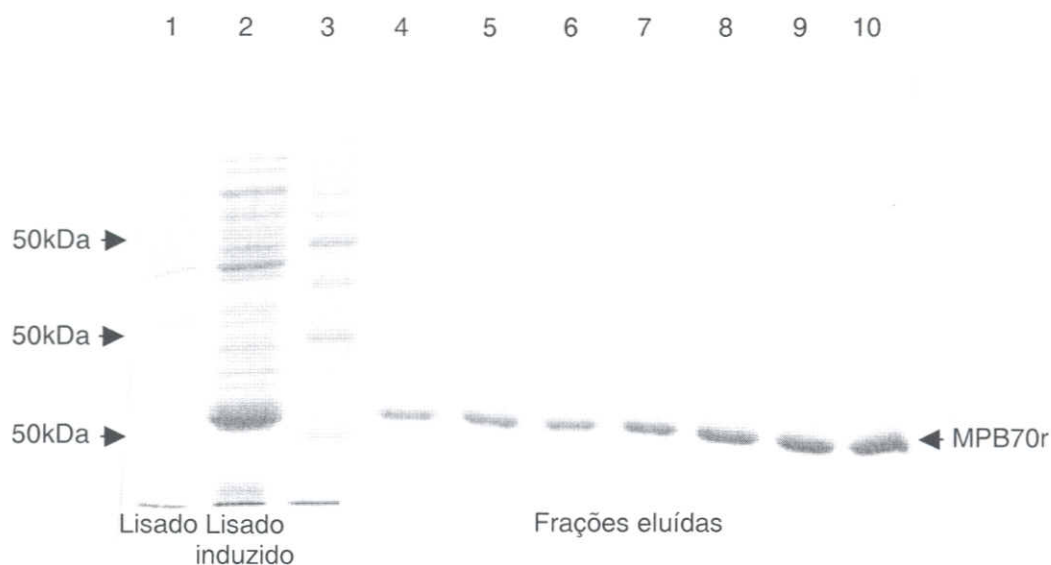


Figura 10: MPB70r purificada por cromatografia de afinidade metálica (Ni-NTA) a partir do clone A. Eletroforese em SDS-PAGE corado por azul de Coomassie. Canaleta 1: lisado da cultura bacteriana não induzida por IPTG; Canaleta 2: lisado bacteriano 5 horas após indução com IPTG; Canaleta 3: marcador de peso molecular protein ladder 10kDa (Gibco-BRL, Brasil); Canaletas 4 a 10: diferentes frações obtidas durante a eluição da MPB70r em coluna Ni-NTA.

5.2.1.1 – Western Blot (WB)

Foram feitos imunoenaios para verificar o reconhecimento da MPB70r por soro imune anti-*M. bovis* e anti-*M. avium* produzidos em coelhos (item 4.3) que foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente.

A Figura 11 mostra o resultado de um WB utilizando MPB70r purificada por

cromatografia em coluna de níquel (Ni-NTA). Análises desse WB mostraram que a MPB70r foi reconhecida pelo soro imune anti-*M. bovis* (3A) e não foi reconhecida pelos anticorpos anti-*M. avium* (2B). Essa figura mostra a ocorrência de reações inespecíficas com proteínas dos lisados de *E. coli* não induzida (canaletas 1A e 4B). Esses contaminantes possuem tamanhos moleculares acima de 34,8 kDa.

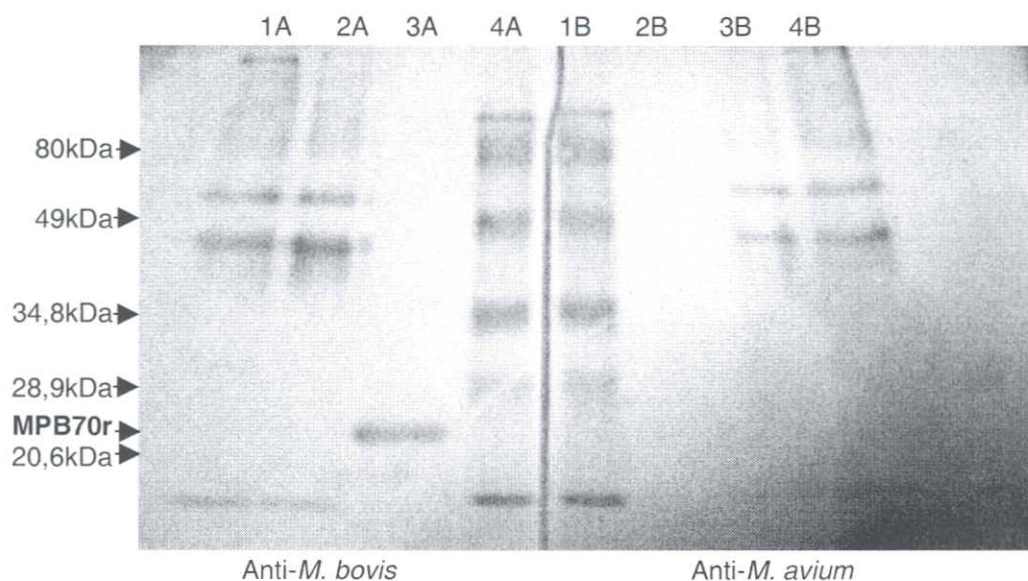


Figura 11: Western blot em membrana contendo lisados de *E. coli*, de *M. bovis* e MPB70r purificada em Ni-NTA. Proteínas reconhecidas pelos anticorpos do soro hiperimune de coelho anti-*M. bovis* (canaletas 1A a 3A) e anti-*M. avium* (canaletas 2B a 4B). Canaletas 1A e 4B: Lisados bacterianos não induzidos, respectivamente; Canaletas 2A e 3B: Lisados de cultura inativada de *M. bovis*, respectivamente; Canaletas 3A e 2B: MPB70r purificada por cromatografia em coluna de níquel, respectivamente. Canaletas 4A e 1B: marcador de peso molecular pré-corado broad range (BioRad laboratórios, USA). Conjugado IgG anti-coelho peroxidase 1:3000. Revelação 4CN.

Para confirmar que a proteína reconhecida pelo anticorpo anti-*M. bovis* era realmente a MPB70r, foi realizado WB usando anticorpo monoclonal 4 C3/17 anti-MPB70 e soros de bovinos reagentes e não reagentes à tuberculinização. Na Figura 12 pode ser observado o reconhecimento da MPB70r pelo anticorpo monoclonal nas diluições 1:50, 1:200 e 1:400 (Canaletas 1 a 3). Observou-se reação específica no soro bovino reativo à tuberculinização em todas as diluições estudadas (Canaletas 6 a 10), porém houve reações inespecíficas com proteínas contaminantes que apresentaram o mesmo perfil de peso molecular das proteínas observadas nos lisados de *E. coli*

(Figura 11 canaletas 1A e 4B). Ainda na Figura 12 os soros de bovinos não reagentes à tuberculinização apresentaram uma reação fraca em relação à MPB70r na diluição 1:50 (Canaleta 11), e também mostraram reação inespecífica com as proteínas contaminantes que não foram eliminadas durante o processo de purificação por afinidade de metal (canaletas 11 a 13).

Esses achados mostraram que a MPB70r foi reconhecida por soros de animais de campo e precisava ser melhor purificada para eliminar as proteínas residuais de *E. coli*.

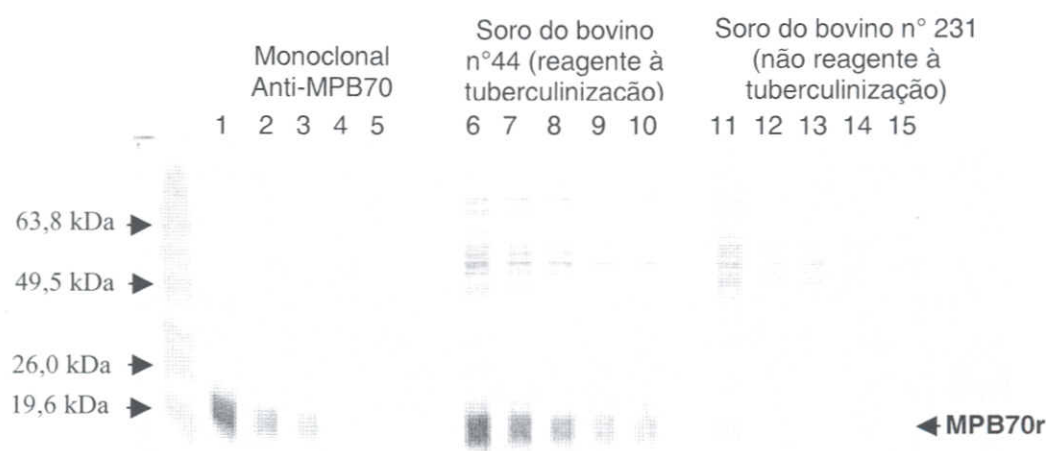


Figura 12: Western blot em membrana contendo MPB70r purificada por cromatografia em Ni-NTA tratadas com diferentes soros. Canaletas 1, 2, 3, 4 e 5: anticorpo monoclonal 4 C3/17 anti-MPB70; canaletas 6, 7, 8, 9 e 10: soro bovino sensibilizado com *M. bovis* inativado; canaletas 11, 12, 13, 14 e 15: soro bovino não reagente à tuberculinização. Todos os soros utilizados foram diluídos nessa mesma seqüência 1:50, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1000, respectivamente. Conjugado proteína G peroxidase 1:1000. Revelação DAB. Marcador de peso molecular pré-corado Bench Mark[®] prestained protein ladder (Invitrogen Tech-line, USA).

5.2.1.2 – ELISA utilizando na fase sólida MPB70r purificada em Ni-NTA.

O objetivo desse ensaio foi verificar se no ELISA ocorreriam também reações inespecíficas nos soros de animais não reagentes à tuberculinização, não se preocupando em padronizar as leituras de absorvâncias obtidas segundo a Lei de Lambert-Beer.

Testes de ELISA foram também realizados com a proteína purificada em coluna de níquel. Foram realizados ensaios contendo 60 soros bovinos provenientes de fazenda livre de tuberculose (Tabela 2 rebanho 6), um soro de bovino reativo à tuberculinização (Baleia – Tabela 2 Rebanho 2), dois soros controles positivos (soros imunes de coelho anti-*M. bovis* e anti-MPB70r produzidos no item 4.3) e como controle negativo, um soro imune de coelho anti-*M. avium* produzido no item 4.3.

Os resultados do ELISA indireto (Tabela 4) confirmaram os dados obtidos no WB (Figuras 11 e 12). A MPB70r foi reconhecida pelos soros imune controles anti-*M. bovis* e anti-MPB70. A proteína não reagiu com anticorpos do soro imune anti-*M. avium*. Porém, mais uma vez foi observada reação inespecífica com dois soros de animais não reagentes à tuberculinização.

Ainda na Tabela 4 o ponto de corte (média dos soros negativos somados a três desvios padrão na DO de A492_{nm}) nesse ensaio foi de 1,129. Como as leituras dos soros desses animais variaram de 0,004 a 1,641 o desvio padrão (0,296) foi maior que a média (0,241) deixando o ponto de corte pouco confiável. Com esses resultados tornou-se clara a necessidade de utilizar outras alternativas de purificação da MPB70r.

Tabela 4 – Ensaio de ELISA indireto desenvolvidos em suportes placas Nunc[®] sensibilizadas com MPB70r purificada em Ni-NTA em 60 soros de animais do rebanho 6 não reagentes à tuberculinização do rebanho 6

Origem	Número de identificação dos soros dos animais testados (A492nm)					
Soros de animais não reagentes à tuberculinização do rebanho 6	3 (0,055)	4 (0,423)	6 (0,838)	7 (0,103)	11 (0,365)	12 (0,239)
	13 (0,174)	14 (0,486)	16 (0,057)	17 (0,348)	19 (0,187)	20 (0,294)
	23 (0,119)	26 (0,027)	29 (0,104)	32 (0,291)	34 (0,289)	36 (0,170)
	37 (1,130)	43 (0,343)	47 (0,105)	48 (0,081)	49 (0,346)	50 (0,067)
	52 (0,330)	55 (0,182)	56 (0,088)	57 (0,088)	62 (0,160)	63 (0,136)
	64 (0,143)	65 (0,182)	67 (0,159)	69 (0,153)	70 (0,137)	71 (0,096)
	73 (0,165)	79 (0,186)	82 (0,076)	83 (0,040)	86 (1,005)	88 (0,349)
	89 (1,641)	110 (0,041)	148 (0,122)	149 (0,010)	151 (0,017)	158 (0,219)
	164 (0,102)	166 (0,157)	213 (0,219)	224 (0,010)	226 (0,061)	231 (0,059)
	233 (0,004)	235 (0,130)	236 (0,141)	237 (0,300)	240 (0,880)	247 (0,027)

Controles: Soros imune de coelho anti-*M.bovis* (1,905), anti-*M. avium* (0,0), anti-MPB70r (1,930)

Média dos soros negativos = 0,241 - Desvio padrão = 0,296

Ponto de corte (Média mais 3 desvios padrão) = 1,129

5.2.2 – Purificação da MPB70r por ultrafiltração

Para esse ensaio foram utilizadas membranas de celulose com poros de 30 kDa de diâmetro. Esperava-se com essa metodologia separar as proteínas contaminantes, as de peso molecular abaixo seriam filtradas e as acima de 50 kDa seriam retidas pela membrana. Porém o ponto de corte escolhido não foi suficiente para alcançar a purificação desejada. Análises feitas por SDS-PAGE mostraram que a MPB70r e as proteínas contaminantes foram encontradas tanto no filtrado como na porção retida pela membrana (dados não mostrados).

5.2.3 - Purificação da MPB70 por Eletroeluição

Foram realizadas três técnicas: membranas de diálise, Electro eluter e Mini whole gel eluter. As análises das proteínas coletadas foram feitas por SDS-PAGE e em nenhuma dessas técnicas a proteína foi visualizada, por causa da interferência dos sais presentes nos tampões utilizados. Para reduzir esses sais foram feitas diálises que ao final diluíam a amostra e com isso, no SDS-PAGE não mais se visualizava a proteína (dados não mostrados). Nenhuma dessas técnicas usadas foram consideradas viáveis como processo de purificação de proteínas.

5.2.4 – Purificação por gel filtração em Sephadex G-50

Não houve purificação desejada pela cromatografia de gel filtração em sephadex G-50. Esperava-se que as proteínas com pesos moleculares maior fossem eluídas no primeiro pico do cromatograma e as proteínas menores dentre elas a MPB70r no segundo pico. Pelas análises por SDS-PAGE a MPB70r foi eluída juntamente com as proteínas contaminantes no primeiro pico. Outro problema encontrado estava relacionado ao volume recolhido nesse processo, o volume inicial de aplicação era de 500 µl e o volume das alíquotas recolhidas eram de 1 mL, dando volume final de 60 mL, o que diluía muito a amostra, e quando eram realizadas as leituras na A280 nm não havia indícios da presença da proteína. Foi tentado modificar o fluxo para 0,5 mL por minuto, porém esta abordagem não foi efetiva (dados não mostrados).

5.2.5 - Purificação da MPB70r por gel filtração em sistema de FPLC

O perfil cromatográfico da purificação por gel filtração está mostrado na Figura 13. De acordo com a densidade óptica A280 nm foram identificados oito picos. As alíquotas desses picos foram analisadas por SDS-PAGE corado por impregnação pelo nitrato de prata (dados não mostrados). A banda da MPB70r foi visualizada somente na alíquota correspondente ao pico 3 do cromatograma.

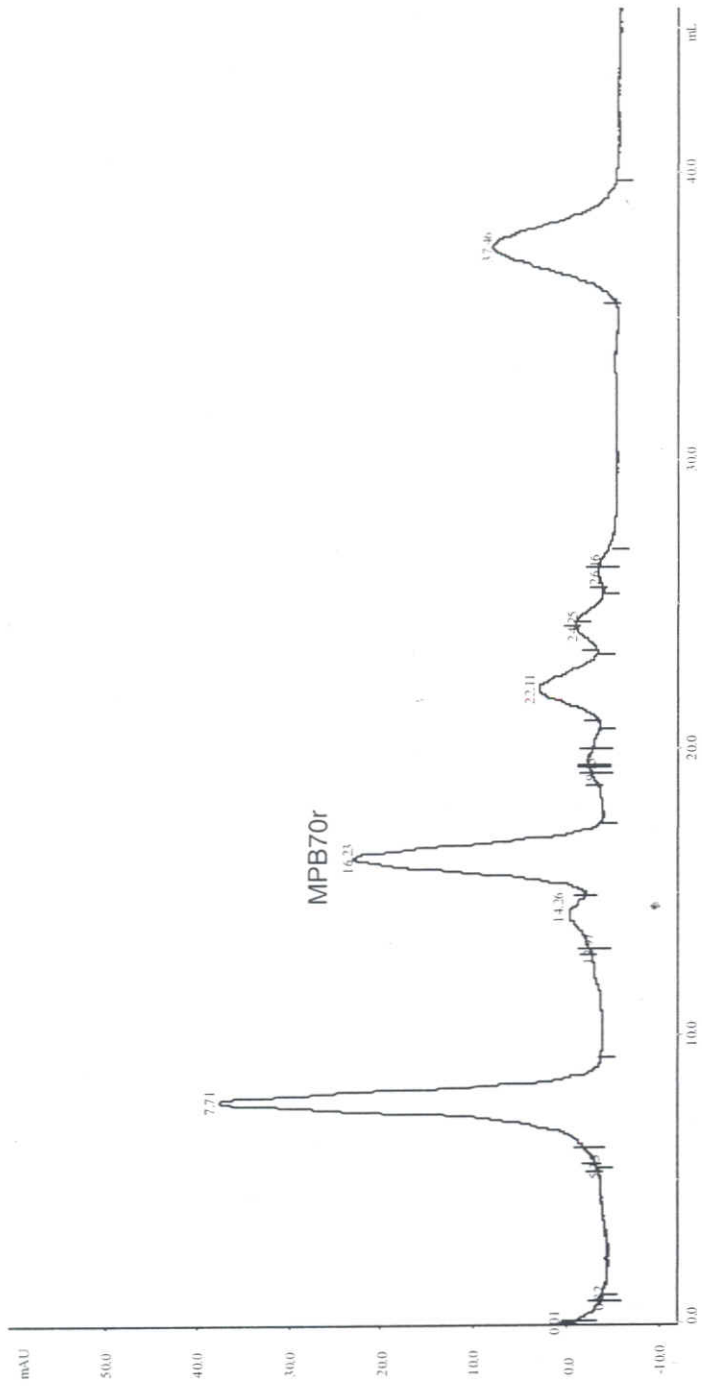


Figura 13: Purificação da MPB70r por gel filtração em sistema de FPLC. Frações obtidas durante a eluição da MPB70r em coluna HR/30 superose 12 com PBS 0,2M. Fluxo 0,3 mL/min, fração 0,5 mL/tubo a 0,5 MPa. O cromatograma representa absorvância no comprimento de onda de 280 nm. Os Números representam o volume eluído em mL.

5.2.5.1 - WB

Na Figura 14 está mostrado o WB utilizando a MPB70r purificada por gel filtração em sistema de FPLC. Pode-se observar que foram eliminadas as proteínas contaminantes que provavelmente eram responsáveis pelas reações inespecíficas nos soros de animais não reagentes à tuberculização já discutidas nas Figuras 11 e 12. Na Figura 14 observou-se uma única banda correspondente a MPB70r no soro imune anti-MPB70r produzido em coelho (Canaleta 2), no soro imune anti-*M. bovis* produzido em coelho (Canaleta 4) e no soro de animal de campo reativo à

tuberculização, bovino Baleia do rebanho 2 da Tabela 2 (Canaleta 18).

Ainda na Figura 14 foi observado que um dos soros de animais reagentes à tuberculização não reconheceu a MPB70r (bovino Portela do rebanho 2 da Tabela 2, Canaleta 15). Essa variação na produção de anticorpos entre tais animais pode ser explicada, pois há uma relação inversa entre a resposta celular e humoral, portanto nem todos os animais reagentes à tuberculização terão anticorpos detectáveis no ELISA para a MPB70r, como será discutido posteriormente.

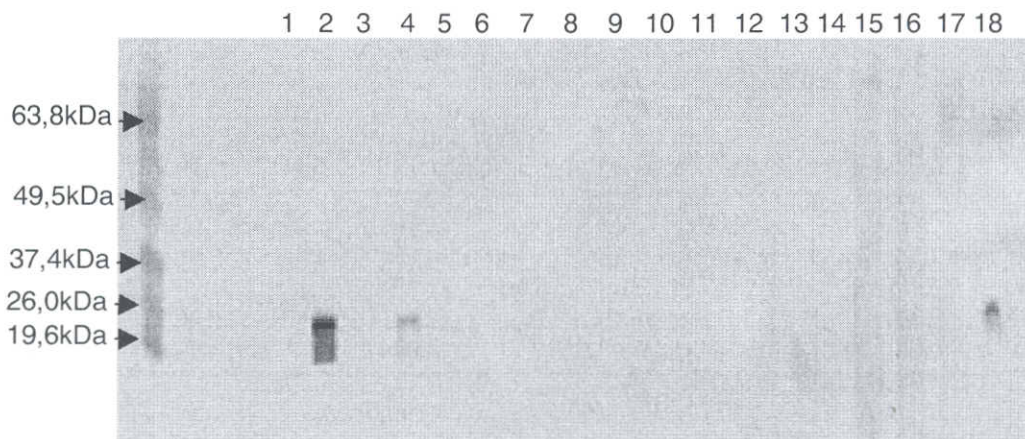


Figura 14: Western blot em membrana com MPB70r purificada por gel filtração em sistema de FPLC. Canaletas 1 e 2: soro de coelho anti-MPB70r antes e depois da imunização, respectivamente; Canaletas 3 e 4: soro de coelho anti-*M. bovis* antes e depois da imunização, respectivamente; Canaletas 5 e 6: soro de coelho anti-*M. avium* antes e depois da imunização, respectivamente; Canaletas 7 a 14, 16 e 17 soros de bovinos não reagentes à tuberculização (n° de identificação 8, 39, 55, 65, 13, 64, 6, 19, 925 e 777 respectivamente); Canaletas 15 e 18 soros de bovinos reagentes à tuberculização (Portela e Baleia, respectivamente). À esquerda marcador de peso molecular pré-corado Bench Mark® prestained protein ladder. Proteína G peroxidase 1:1000. Revelação DAB.

5.2.5.2 – ELISA indireto utilizando MPB70r purificada em sistema de FPLC

Na padronização desse teste (Figura 15), para determinar a concentração da MPB70r mais adequada ao sistema foram utilizadas concentrações de 1,0 µg, 0,5µg e 0,25 µg da MPB70r, anticorpos primários (Tabela 2 soros do rebanho 6 dos bovinos não reagentes à tuberculinização de nº 06, 13, e 353), soro imune de coelho anti-*M. avium* e soro de cavalo, soros positivos (soro imune de coelho anti-MPB70r e soro do bovino Baleia regente à tuberculinização (rebanho 2, Tabela 2), diluídos 1:100. Como anticorpo secundário foi utilizado Conjugado proteína G peroxidase diluída 1:1000. A revelação foi feita por OPD.

Na Figura 15 foi observado que em todas as concentrações usadas, a MPB70r reagiu somente com soros positivos. As concentrações de 1,0 e 0,5µg tiveram

leituras de absorvâncias semelhantes, porém a concentração de 0,25µg houve redução nas leituras. A partir desses resultados todos os ELISA foram realizados utilizando 0,5µg de MPB70r por poço.

Esses achados estão de acordo com os resultados obtidos no WB (Figura 14), onde a MPB70r não reagiu como o soro imune anti-*M. avium* (Canaleta 6) nem com os soros dos bovinos 06 e 13 não reagentes à tuberculinização, Tabela 2 rebanho 6 (Canaletas 11 e 13) e, reagiu com o soro imune de coelho anti-MPB70r e soro do bovino "Baleia" reagente à tuberculinização (rebanho 2, Tabela 2) canaletas 2 e 18, respectivamente.

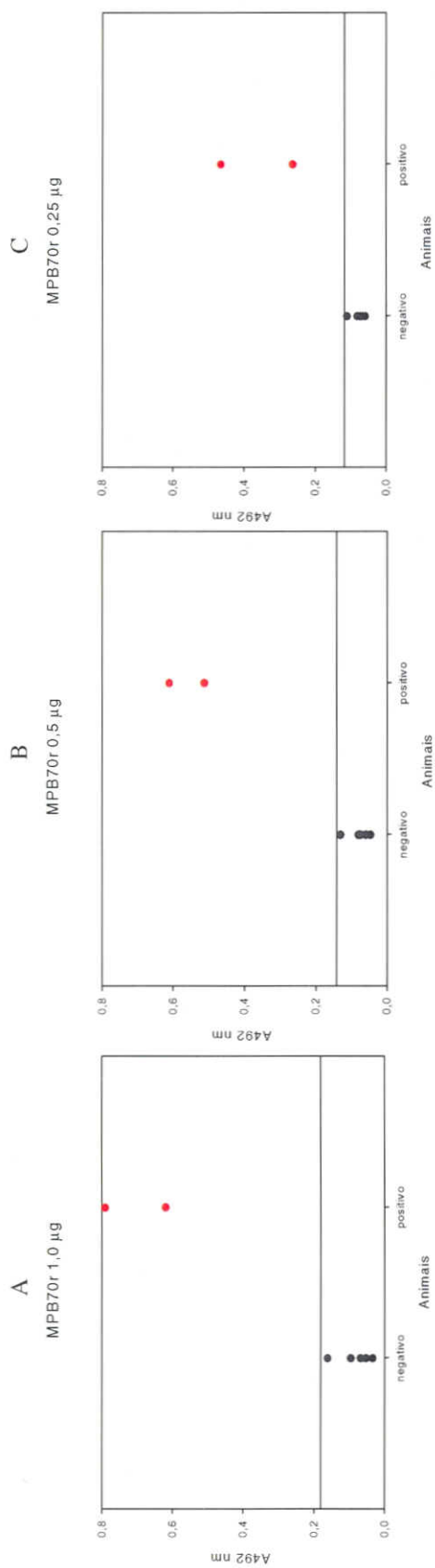


Figura 15: Ensaio de ELISA indireto desenvolvidos em placas Nunc[®] sensibilizadas com MPB70r purificada em sistema de FPLC em diferentes concentrações. (A) 1,0 µg; (B) 0,5 µg e (C) 0,25 µg. Cada ponto representa um animal, a linha na abscissa mostra ponto de corte (média dos soros negativos acrescido de três desvios-padrão); • soros dos bovinos não reagente à tuberculinização do rebanho 6 (nº 06, 13, e 353), soro imune de coelho anti-*M. avium* e soro de cavalo; • soro imune de coelho anti-MPB70r e soro de animal reagente à tuberculinização do rebanho 2 ("Baleia"). Proteína G peroxidase diluída 1:1000. A revelação foi feita por OPD.

O resultado comparativo de 30 soros do rebanho 6 (Tabela 2) utilizado nos testes de ELISA indireto com a MPB70r purificada em coluna Ni-NTA e com a proteína purificada por FPLC está mostrado na Tabela 5. O objetivo desse ensaio era verificar se a MPB70r purificada por FPLC não reagia com soros de animais não reagentes à tuberculinização, não se preocupando em padronizar o ELISA de acordo com a Lei de Lambert-Beer.

Na Tabela 5, o ELISA com a proteína purificada em coluna Ni-NTA apresentou uma média de 0,219 e desvio padrão de 0,316, o ponto de corte também apresentou um valor alto de 1,167. Já no ELISA com a proteína purificada por FPLC apresentou na DO A492_{nm}, média de 0,102, desvio padrão de 0,040 e ponto de corte de 0,222. Não foi observada variação grande entre os soros dos animais negativos (0,051 – 0,222), portanto o ponto de corte foi considerado confiável. A Tabela 5 mostra que com a proteína MPB70r purificada por FPLC não houve reação cruzada nos soros testados. Essa mesma tabela mostra que a partir do

ponto de corte de A492_{nm} 0,222 houve reconhecimento pelo soro do animal reativo à tuberculinização (Baleia proveniente do rebanho 2 tabela 2) e com os soros controles positivos: soro imune anti-*M. bovis* e anti-MPB70r (produzidos item 4.3). Dos 30 soros de animais provenientes de fazendas sem relato a pelo menos cinco anos de tuberculose bovina nenhum um reagiu com a MPB70r.

Os cálculos dos pontos do corte foram feitos considerando-se a média de 30 soros negativos somados a três desvios-padrão. Os resultados obtidos com esses soros, utilizando a MPB70r purificada em FPLC, foram satisfatórios. A fim de se obter com mais precisão o melhor ponto de corte para classificar animais positivos e negativos, e assim, calcular a Sensibilidade e a Especificidade, foram analisados, pela curva ROC, 31 soros de animais reagentes e 30 soros de animais não reagentes à tuberculinização (Tabela 6). O Gráfico 1 mostra a representação gráfica desses soros.

Tabela 5 – Ensaio de ELISA indireto desenvolvidos em placas Nunc[®] sensibilizadas com MPB70r purificada em coluna de afinidade pelo níquel (Ni-NTA) e em sistema de FPLC.

Número de identificação dos soros dos animais testados	MPB70r purificada Ni-NTA A 492 _{nm}	MPB70r purificada FPLC A492 _{nm}
03	0,055	0,091
06	0,838	0,067
12	0,239	0,094
13	0,174	0,051
16	0,057	0,075
19	0,187	0,124
23	0,119	0,063
32	0,291	0,156
43	0,343	0,123
47	0,105	0,122
50	0,067	0,148
52	0,330	0,083
55	0,182	0,054
57	0,088	0,104
62	0,160	0,082
63	0,136	0,078
64	0,143	0,112
67	0,159	0,072
69	0,153	0,065
73	0,165	0,117
83	0,040	0,029
89	1,641	0,090
110	0,041	0,135
149	0,010	0,222
151	0,017	0,078
164	0,102	0,108
213	0,219	0,141
233	0,004	0,110
237	0,300	0,161
353	xxxxx	0,113

Controles: Soros imune de coelho anti-*M. bovis* (Ni-NTA = 1,905, FPLC = 1,645), anti-*M. avium* (Ni-NTA = 0,0, FPLC = 0,0), anti-MPB70r (Ni-NTA = 1,930; FPLC = 0,762), Soro bovino Baleia (FPLC = 0,591)

Purificação por Ni-NTA: Média = 0,219; Desvio padrão = 0,316; Ponto de corte= 1,167.

Purificação FPLC: Média = 0,102; Desvio padrão = 0,040; Ponto de corte= 0,222.

(xxxx) – Soros não testados. Em negrito: soro de animal não reagente à tuberculinização que apresentaram reação positiva no ELISA.

Tabela 6 – Ensaio de ELISA indireto desenvolvidos em placas Nunc[®] sensibilizadas com MPB70r purificada em sistema de FPLC.

Soros	Rebanhos	Nº de identificação do animal (A492nm)		
Soros de animais reagentes à tuberculinização oriundos de rebanhos positivos	1	1 (0,425)	60 (0,033)	63 (0,481)
		111 (0,161)	132 (0,302)	172 (0,266)
		189 (0,346)	194 (0,137)	221 (0,171)
		286 (0,433)	367 (0,072)	431 (0,398)
		503 (0,010)	783 (0,111)	792 (0,029)
		819 (0,270)	1014 (0,084)	1246 (0,446)
		1509 (0,076)	1733 (0,066)	
	2	Baleia (1,034)	Dinorá (0,932)	Portela (0,069)
	3	83 (0,035)	128 (0,439)	134 (0,096)
		137 (0,123)	144 (0,092)	154 (0,075)
4	374 (0,053)	393 (0,027)		
Soros de animais não reagente à tuberculinização oriundos de rebanhos negativos	6	3 (0,091)	6 (0,067)	12 (0,094)
		13 (0,051)	16 (0,075)	19 (0,124)
		23 (0,063)	32 (0,156)	43 (0,123)
		47 (0,122)	50 (0,148)	52 (0,083)
		55 (0,054)	57 (0,104)	62 (0,082)
		63 (0,078)	64 (0,112)	67 (0,072)
		69 (0,065)	73 (0,117)	83 (0,029)
		89 (0,090)	110 (0,135)	149 (0,226)
	151 (0,078)	164 (0,108)	213 (0,141)	
	233 (0,110)	237 (0,161)		
7	353 (0,113)			
Soros de Animais com paratuberculose		383 (0,039) C ⁺ (0,055)	454 (0,165) Rep ⁺ (0,047)	467 (0,053)
Soros de Animais negativos paratuberculose		474 (0,098) Rep ⁻ (0,060)	462 (0,075)	C ⁻ (0,049)
Soro de Animal Sensibilizado com <i>M. avium</i>		P08 (0,096)		

Em negrito: soros de animais reativos à tuberculinização que apresentaram reação positiva no ELISA.
 Ponto de corte (ROC) = 0,226.
 Especificidade de 100% e Sensibilidade de 38,7%.

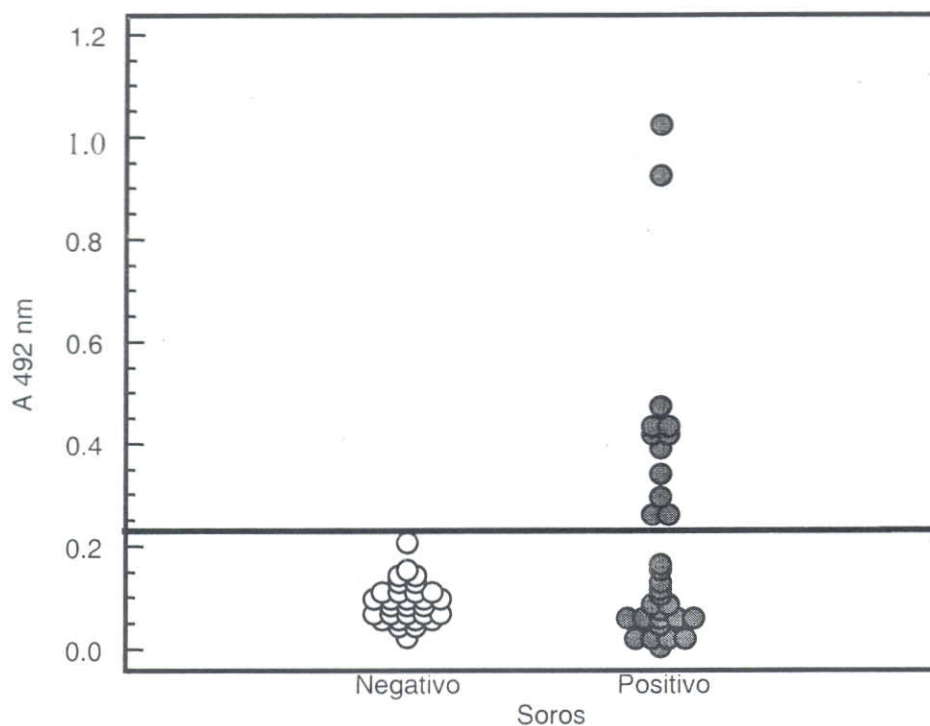


Gráfico 1: Representação gráfica dos dados referentes à Tabela 6. Cada ponto representa um animal, a linha na abscissa mostra ponto de corte (média dos soros negativos somados a 3 desvios-padrão); ○: Soros negativos (30 soros do rebanho 6 referente à animais não reativos à tuberculinização); ●: Soros positivos (31 soros de animais reativos à tuberculinização pertencentes aos rebanhos 1, 2, 3 e 4). Ponto de corte:0,226; Sensibilidade: 38,7%; Especificidade:100%

Esses resultados mostraram que o ELISA utilizando a MPB70r purificada por gel filtração possui alta especificidade, sendo capaz de reconhecer os 30 soros negativos testados, porém apenas 12 dos 31 animais positivos à tuberculinização foram detectados por esse teste. De acordo com a literatura a produção de anticorpos após infecção com *M. bovis* está associada com o estado avançado ou doença disseminada onde há uma carga alta de antígenos circulantes. Como em rebanhos é difícil determinar exatamente a quanto tempo o animal está infectado, nem todos os soros positivos para tuberculinização serão positivos nos testes sorológicos, pois estes dois testes medem diferentes tipos de resposta imune.

O trabalho Lightbody et al. (1998), mostrou que anticorpos contra MPB70 podem estar presentes no início da infecção e que existe variação individual quanto a esse fenômeno. A Figura 16, extraída desse trabalho mostra a curva de produção de anticorpos anti-MPB70 em dois animais experimentalmente infectados com *M. bovis*. No animal 193 os anticorpos anti-MPB70r foram detectados 22 a 100 dias após infecção e depois voltavam a ser observados após 400 dias da infecção. No animal 198 título alto de anticorpo foi detectado somente após 625 dias após infecção. Harboe et al. (1990) observaram produção de anticorpos anti-MPB70 18 a 22 semanas após infecção com *M. bovis* e mostraram relação inversa entre surgimento da resposta humoral e celular como mostra a Figura 17, extraída desse trabalho.

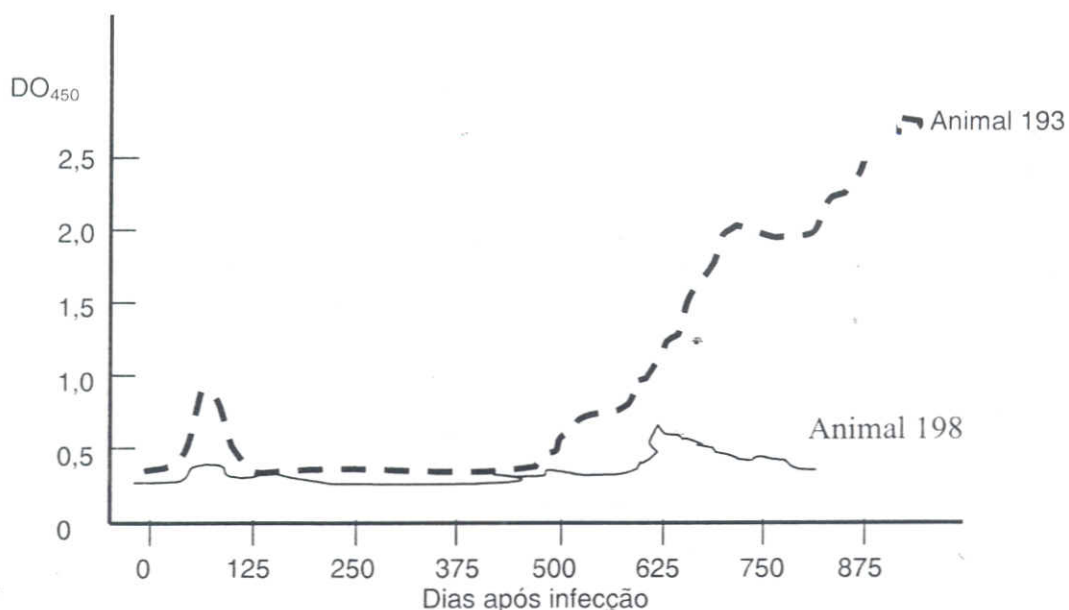


Figura 16: Figura adaptada do trabalho de Lightbody et al.,1998 – Resposta antigênica recombinante nos animais 193 e 198 experimentalmente infectado com 10^7 UFC *Mycobacterium bovis*. Veterinary Record, v.142, n.12, p.295-300, 1998.

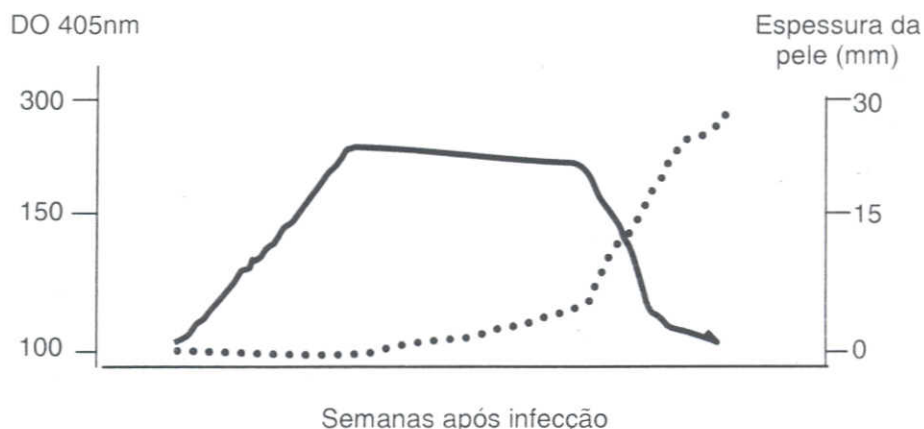


Figura 17: Figura adaptada do trabalho de Harboe et al., 1990. Relação entre anti-MPB70 e resposta de hipersensibilidade do tipo tardia. Linha contínua: valores médios de ELISA para anti-MPB70 em onze animais experimentalmente infectados com *M. bovis*; Linha tracejada: teste intradérmico com PPD bovino. Journal Clinical Microbiology, v. 28, n. 5, p. 913-921, 1990.

Através do programa "Medcalc" para obtenção da curva ROC, a sensibilidade calculada foi de 38,7% e a Especificidade de 100%. O valor preditivo positivo (certeza de que os animais identificados como positivo eram realmente positivos) foi de 100%. O valor preditivo negativo (certeza que os animais identificados como negativos eram realmente negativos) foi de 61,2% numa prevalência da doença estimada em 50,8%.

A sensibilidade baixa reflete a diferença do tipo de resposta medida. O teste desenvolvido mede resposta humoral enquanto que o teste com o que foi comparado, tuberculização, mede resposta celular. A resposta celular é predominante em animais infectados pelo *M. bovis*. O teste alérgico revela reações três a oito semanas após a infecção. Sendo que a detecção de anticorpos varia de acordo com o antígeno estudado bem como o estágio de desenvolvimento da doença. Por isso nem todos os animais positivos à tuberculização foram detectados pelo WB (Figura 14) e ELISA (Gráfico 1). Outro fator importante já discutido é a relação inversa entre resposta humoral e celular (Harboe et al., 1990). Para estimar a concordância entre positividade e a negatividade dos

testes de tuberculização e ELISA utilizou-se a estatística *Kappa* (κ) segundo Smith (1994), cujo valor encontrado foi de 0,35 e intervalo de confiança, IC 95% = [0,33 — 0,55]. O valor de κ mostra não haver concordância entre os testes.

Em geral os testes de ELISA para tuberculose bovina descritos na literatura não apresentam sensibilidade alta. Costello et al. (1997) desenvolveram ELISA usando como antígeno PPD bovino obtiveram 35% de sensibilidade e 95,9% especificidade. Rittaco et al. (1990) empregaram PPD bovino como antígeno na fase sólida e obtiveram 73,6% de sensibilidade e 94,1% de especificidade. Auer (1987) empregou lisado inativado de cultura de *M. bovis* e obteve 88,7% de sensibilidade em animais infectados tuberculina positiva, em animais infectados os quais nunca foram tuberculizados encontrou 63% de sensibilidade e especificidade de 52,6%. A sensibilidade desses testes foi maior quando comparada com a encontrada nesse trabalho. Isso provavelmente se deve ao tipo de antígeno usado, uma vez que esses autores usaram PPD ou lisado de cultura de *M. bovis* onde há variedade de proteínas dentre das quais se encontra a MPB70, enquanto que nesse trabalho foi usado um único antígeno purificado, cujos

anticorpos produzidos em animais experimentalmente infectados não são detectados em todas as fases da doença.

Dos testes de ELISA realizados com MPB70 purificada de cultura de *M. bovis*, Wood et al. (1992) obtiveram 96,4% de especificidade e 18,1% de sensibilidade e no teste tuberculinização sensibilidade de 68,1% e 96,7% de especificidade comparado-se com lesões macroscópicas durante necrópsia. Sugden et al. (1997) usando MPB70 num ELISA indireto mostrou sensibilidade 65% e especificidade de 75% em soros bovinos e de 78,9% e 73,7% para soros de bisão respectivamente. Dos animais testados por Sugden et al. (1997) 14 soros eram de animais experimentalmente infectados, 24 soros de animais onde conseguiram isolamento de *M.bovis* e/ou histopatologia positiva. Então esse autor tinha 100% de certeza que os animais eram realmente positivos. No teste desenvolvido nesse trabalho a tuberculinização foi o teste comparativo que apresenta sensibilidade variando de 68 a 95% e especificidade de 96 a 99% (Monaghan et al., 1994) em nenhum dos animais estudados foi feito qualquer teste confirmando o resultado da tuberculinização, portanto a certeza de que esses animais eram realmente positivos passa a ser de 68 a 95%.

Devida a baixa sensibilidade o ELISA padronizado nesse trabalho mostrou claramente não poder ser utilizado para diagnóstico individual de animais infectados com *M. bovis*. Porém sua alta especificidade sugere que maiores estudos devem ser realizados visando o estabelecimento da sua sensibilidade e especificidade de rebanho. Defini-se sensibilidade de rebanho a probabilidade de um rebanho infectado ser classificado como infectado pelo teste aplicado em animais, sendo especificidade de rebanho, a probabilidade de um rebanho não infectado ser classificado como não infectado pelo teste aplicado em animais. Assim, o ELISA desenvolvido nesse trabalho poderia ser ferramenta valiosa no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT) na triagem de rebanhos negativos e positivos. Os rebanhos positivos seriam candidatos à tuberculinização.

Uma outra aplicação do ELISA desenvolvido seria a possibilidade de utilização como um teste paralelo à tuberculinização. Desse modo seriam realizados simultaneamente a tuberculinização e a coleta de soro para o teste de ELISA. A sensibilidade do ELISA desenvolvido passaria a ser de 92% sem afetar a especificidade de 99%. Os animais não reagentes à tuberculinização (anérgicos) seriam detectados pelo ELISA. Assim o número de animais falso-positivo dentro do rebanho diminuiria e aumentaria a eficiência do programa de erradicação da tuberculose bovina.

A contribuição desse ELISA no (PNCEBT) para discriminar rebanho positivo de negativo irá depender da prevalência da doença no rebanho. Para isso valores preditivos positivo e negativo foram determinados através do programa "MedCalc" considerando diversas prevalências da doença (Tabela 7). Para fins de estimativa considerou-se especificidade com valor de 99%. Através dos resultados da Tabela 6, quando a prevalência da doença no rebanho for de 1%, a probabilidade desse ELISA de detectar animal positivo é de 28%. Já num rebanho onde a prevalência da doença for de 20%, a probabilidade aumenta para 90,6%. Então, quanto maior for a prevalência da doença no rebanho maior a probabilidade de animais positivos serem detectados por esse ELISA.

Tabela 7: Valores preditivos positivos e negativos em diferentes prevalências considerando-se Sensibilidade 38,7% e Especificidade 99%.

Prevalência (%)	Valor Preditivo Positivo (%)	Valor Preditivo Negativo (%)
1	28,1	99,4
3	54,5	98,1
5	67,1	96,8
10	81,1	93,6
15	87,2	90,1
20	90,6	86,6
50,8	100,0	61,2

Valores calculados através do programa "MedCalc"

O teste de ELISA mostrou que a MPB70r não reagiu inespecificamente com soros de animais infectados com *M. paratuberculosis* (Tabela 2), e nem com soro imune de coelho anti-*M. avium* (item 4.3) e soro bovino sensibilizado com *M. avium*. Tendo em vista que essas micobactérias podem sensibilizar os animais do rebanho resultando em reações inespecíficas nos testes de diagnósticos, os resultados da Tabela 6 sugerem que tais reações não ocorreriam nesse ELISA. A Instrução Normativa Ministerial nº 2 de 01/2001 regulamenta o teste de tuberculização comparativo como teste confirmatório para animais reagentes aos testes de rotina (Brasil, 2001). Esse é realizado para eliminar as reações cruzadas pelas micobactérias ambientais fazendo a diferença das reações de hipersensibilidade do PPDB em relação ao PPDA, que é obtido a partir de culturas de *M. avium*. Segundo Mota e Lobato (1998), embora constitua valioso meio de reconhecer reações inespecíficas, a tuberculização comparada com tuberculina aviária e bovina ainda deixa certa margem de dúvida, independentemente dos critérios utilizados na interpretação das reações.

Outro problema relacionado à tuberculização é a sua baixa eficiência de não detectar animais anérgicos. O ELISA desenvolvido possivelmente poderia ser utilizado para detectar tais animais. De acordo com Harboe et al. (1990) anticorpos contra MPB70 são detectados quando a resposta celular diminui (Figura 17). E, segundo Lightbody et al. (1998) (Figura 16) anticorpos anti-MPB70 são detectados numa fase tardia de infecção nos animais com lesões tuberculosas macroscópicas (Lightbody et al., 2000) geralmente esses animais manifestam fenômeno de anergia. A

presença de animais anérgicos colocaria em risco o PNCEBT. Estudos utilizando esses animais poderiam ser testados por esse ELISA, que se comprovada a sua eficiência seria uma ferramenta valiosa para ser usada no programa.

Como vantagens em relação à tuberculização, O ELISA precisaria de um procedimento envolvendo uma única visita ao rebanho. Outra vantagem seria poder repetir o exame dos animais cujos resultados forem inconclusivos, a qualquer tempo, o que não é válido para a tuberculização por causa da dessensibilização inviabilizando a repetição do teste num pequeno intervalo de tempo. Segundo Radunz e Lepper (1985) pelo menos 60 dias devem ser aguardados após tuberculização para a realização de novos exames.

O ELISA padronizado também poderia ser utilizado para detectar anticorpos contra MPB70 em outras espécies, pois foi empregada proteína G peroxidase que se liga na porção Fc de imunoglobulinas de muitas espécies de mamíferos. Por exemplo, estudos futuros poderiam ser realizados para avaliar sua utilização em homens anérgicos ao teste de intradermoreação, pois a MPB70r mostrou 100% de similaridade com a proteína MPT70 do *M. tuberculosis*.

5.2.5.3 – Teste de estabilidade

O teste de estabilidade da MPB70r adsorvida nas placas de ELISA convencionais mostrou que a MPB70r continuou sendo reconhecida pelos soros controles (Tabela 8). A estabilidade foi estudada somente a 4°C no tempo máximo de 30 dias.

Tabela 8: Teste de viabilidade de placas Nunc[®] sensibilizadas com da MPB70r e mantida a 4°C e testadas em teste de ELISA em diferente s dias

Soros	A492 nm	A492 nm 15 dias	A492 nm 30 dias
Soros de animais reagentes à tuberculinização			
Anti- <i>M. bovis</i>	1,653	2,062	1,757
Anti-MPB70	1,599	2,002	2,215
Baleia	1,480	1,404	1,414
Soros de animais não reagentes à tuberculinização			
Anti- <i>M. avium</i>	0,019	0,036	0,028
Boi 353	0,399	0,243	0,139
Boi 13	0,181	0,135	0,166

5.3 – Síntese dos Hidrogéis

5.3.1 – Análises espectroscópicas dos hidrogéis sintetizados

Hidrogéis são polímeros hidrofílicos que podem absorver água ou fluidos biológicos. O PVA, fórmula química $[\text{CH}_2\text{-CH}(\text{OH})]_n$, é um polímero sintético solúvel em água e biodegradável que vem sendo utilizado no preparo de hidrogéis, na obtenção de membranas anfílicas para imobilização de enzimas.

A insolubilização do PVA pode ser feita por reações com dialdeídos, tais como o GA. A estrutura de ligação cruzada pode ser obtida da reação entre grupos hidroxil do PVA e os grupos aldeídos do GA na presença de ácidos. A propriedade de permeabilidade das reações cruzadas depende da quantidade de aldeídos incorporados, do grau de hidrólise e do peso molecular.

Estudos de obtenção de PVA têm sido desenvolvidos para o controle da cristalinidade e pela introdução de grupos funcionais para melhorar ou conferir propriedades específicas. Dentro dessa

abordagem, nesse trabalho, foram introduzidos na matriz polimérica os agentes reticuladores GA cuja fórmula química é $\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$ e TEOS, fórmula química $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$.

Os dispositivos PVA e o híbrido PVA+TEOS após reticulação apresentaram-se sob a forma de filme transparente não sendo possível removê-los do molde. Já os hidrogéis de PVA+GA e híbridos de PVA+GA+TEOS formaram discos de 10 – 20 mg com diâmetro médio de 0,5 mm que podiam ser facilmente manipulados (Figura 18). A mudança na forma dos dispositivos pode ser devida às interações entre os grupos aldeídos do GA e as hidroxilas do PVA, pois o GA é um agente bifuncional que normalmente age como formador de ligações cruzadas.

Ainda na Figura 18 pode ser observada nos dispositivos, heterogeneidade de cor e tamanho. Esses aspectos são inerentes ao processo de secagem. Os dispositivos que ficaram próximos às extremidades da placa sofreram reticulação mais rápida e obtiveram cor mais escura que os dispositivos que estavam localizados mais no interior da placa.

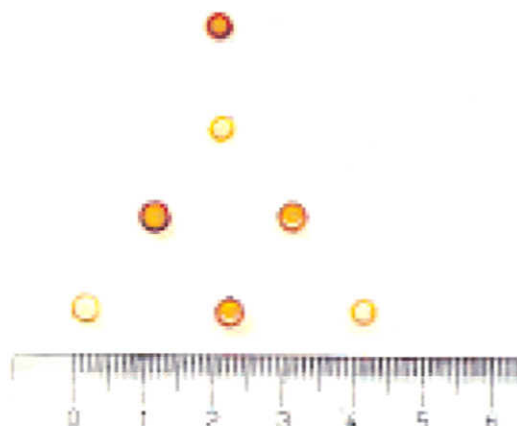


Figura 18: Hidrogel de álcool polivinílico sintetizado com agente reticulador glutaraldeído.

Na Tabela 9 estão os dados usados como referência para as análises do FTIR.

Tabela 9: Mapa simplificado das regiões de absorção na região do infravermelho de diversos grupamentos químicos

Espécie	Tipo de vibração	Frequência (cm ⁻¹)	Referências
C-H (alquenos)	estiramento	3000-2850	Pavia et al. (1996)
C-H ₃ (alquenos)	dobramento	1450 e 1375	
C-H (alquenos)	dobramento	1465	
C-H (aldeído)		2900-2800	
		2800-2700	
C=O (aldeído)		1740-1720	Mansur et al. (2000) Pereira et al. (1999)
C-O (álcool, éter, éster, ac. carboxílicos)		1300-1000	
O-H (álcool e fenóis)		3400-3200	
H ligado		3400-3200	
Si-O-Si	estiramento assimétrico	1100-1000	Mansur et al. (2000) Pereira et al. (1999)
Si-OH	estiramento	950-900	
Si-O-Si	estiramento simétrico	800-700	
Amida I		1620-1680	Mansur et al. (2001)
Amida II		1480-1580	

Os picos característicos da base polimérica de PVA estão mostrados em destaque na Figura 19 e serão utilizados como referência para evidenciar as modificações ocorridas nos dispositivos após adição dos agentes GA e TEOS. Neste espectro pode ser observado na região $3400 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ um pico largo referente às ligações ($\nu_{\text{O-H}}$) e confirmada pela ligação ($\nu_{\text{C-O}}$) próxima $1300 - 1000 \text{ cm}^{-1}$. Os picos nas regiões $3000 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ e 1465 cm^{-1} referem-se respectivamente às ligações ($\nu_{\text{C-H}}$) e ($\nu_{\text{C-H}_2}$) (Pavia et al., 1996).

No espectro de FTIR do PVA+GA (Figura 19a) são observadas modificações no perfil do espectro quando comparado ao espectro de referência. A primeira alteração refere-se as ligações ($\nu_{\text{O-H}}$) devida a reação com o GA. A segunda alteração está relacionada aos picos característicos dos aldeídos que se tornaram mais proeminentes, que são: 2 picos fracos de absorção referentes às absorções de ligação ($\nu_{\text{C-H}}$) próximas a 2850 cm^{-1} e 2750 cm^{-1} à direita do pico de absorção ($\nu_{\text{C-H}}$ alifático) em 2944 cm^{-1} e também na região $1740 - 1720 \text{ cm}^{-1}$ devido absorção da ligação ($\nu_{\text{C=O}}$) (Pavia et al.,

1996). A presença da ligação C=O no PVA+GA pode ser devido aos aldeídos não reativos pendentos em sua cadeia, ou seja, dos dois grupos aldeídos da molécula de GA somente um grupo participa na reação de ligação ao polímero, enquanto que o outro permanece não reativo, livre na cadeia. Durante o processo de reação, as moléculas de GA reagem com as hidroxilas do PVA, a medida em que as ligações cruzadas estão sendo formadas ocorre uma redução na mobilidade das cadeias de PVA e, por conseguinte, a reatividade do sistema diminui, diminuindo também a taxa de reação deixando aldeídos livres. Pelas análises do FTIR foi possível verificar a formação do hidrogel PVA+GA.

As bandas de vibração normalmente encontradas nas estruturas das proteínas (Lu et al., 1994; Malmsten, 1998) referem-se às ligações da amida I, II e III. A presença da MPB70r no hidrogel pode ser comprovada nos espectros da Figura 19b nas regiões $1680-1620 \text{ cm}^{-1}$, $1580-1480 \text{ cm}^{-1}$ e 1246 cm^{-1} , onde se caracterizam as regiões de absorção das amidas I, II, -II (modo estiramento), respectivamente.

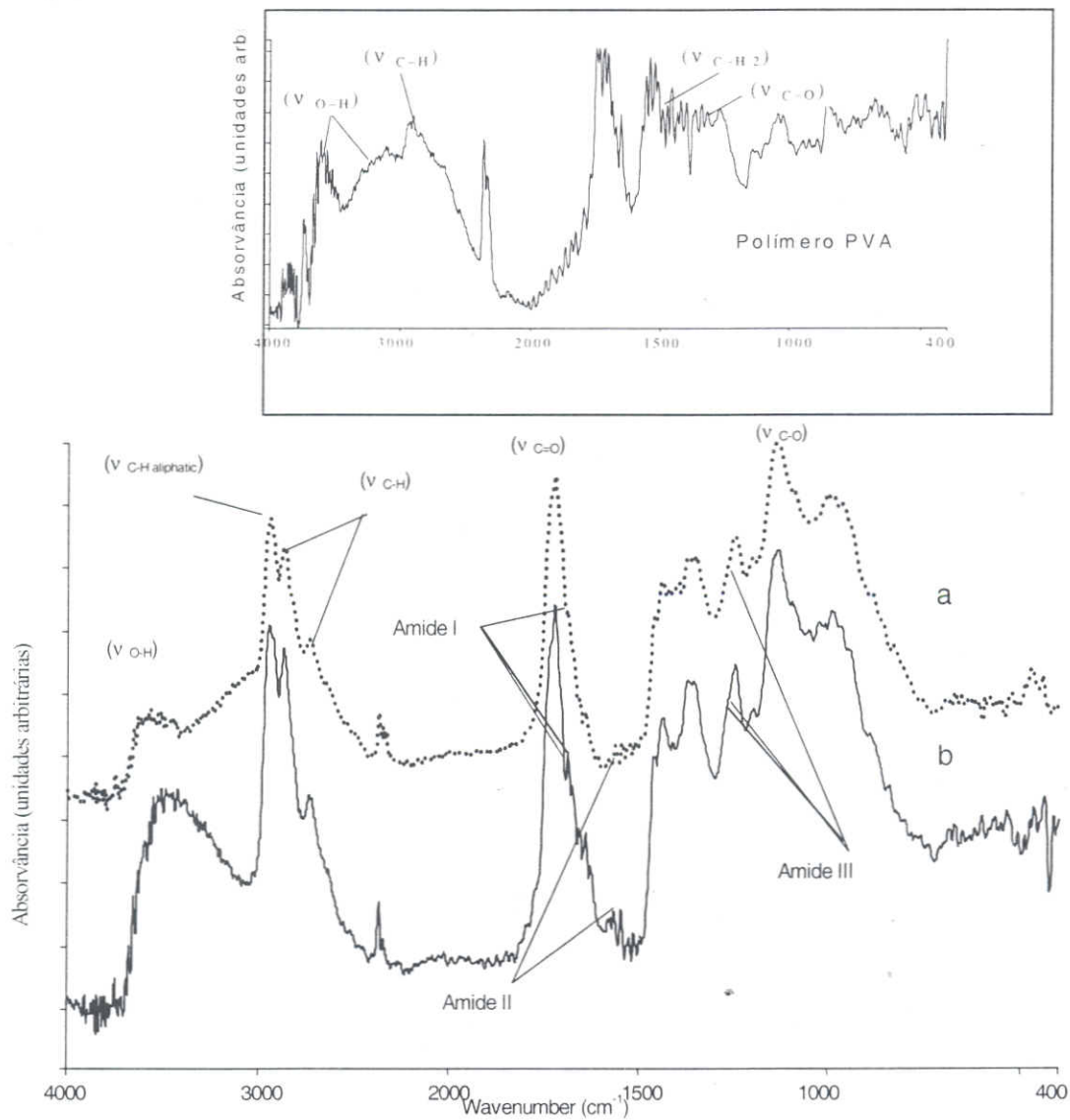


Figura 19. Espectro de FTIR do hidrogel de PVA adsorvido ou não com MPB70r: Em destaque na parte superior o espectro da base polimérica de PVA onde estão indicadas as regiões de absorção das ligações (v_{O-H}), (v_{C-H}), (v_{C-H₂}) e (v_{C-O}) em 3570 - 3200 cm⁻¹, 3000 - 2850 cm⁻¹ e próximo a 1465cm⁻¹, e em 1300 - 1000 cm⁻¹, respectivamente; a) hidrogel PVA+GA com indicação das regiões de absorção das ligações específica dos aldeídos (v_{C-H}) e (v_{C=O}) em 2850 - 2750 cm⁻¹ e 1740 - 1720 cm⁻¹ respectivamente; b) hidrogel PVA+GA+MPB70r onde estão indicadas as regiões de absorção das ligações referentes às amidas I, II e III em 1680 - 1620 cm⁻¹, 1580 - 1480 cm⁻¹ e 1246 cm⁻¹ respectivamente.

Comparado-se os três espectros da Figura 20 a formação do híbrido PVA+GA+TEOS é comprovada pela identificação dos picos referentes às ligações (ν_{C-H} alifático), ν_{C-H} , e $\nu_{C=O}$ indicativos da presença do GA e da presença dos grupamentos característicos do TEOS nas regiões $1100 - 1000 \text{ cm}^{-1}$, $950 - 900 \text{ cm}^{-1}$ e $800 - 700 \text{ cm}^{-1}$ os quais são devidas às absorções das ligações $\nu_{Si-O-Si}$ (modo de estiramento assimétrico), ligações ν_{Si-OH} (modo de estiramento) e ligações $\nu_{Si-O-Si}$ (modo de estiramento simétrico) respectivamente (Pereira et al., 1999; Mansur et al., 2000; Mansur et al., 2001). O espectro de FTIR do TEOS (Figura 20c) foi produzido a partir de uma subtração dos espectros da Figura 20a e 20b para evidenciar as modificações no perfil do

espectro ocorridas após a adição do GA e a formação do disco híbrido PVA+GA+TEOS. A ligação Si-O ocorre quando há ligação de um único grupo alcoxi reativo ao polímero. Os tipos de ligação Si-O-Si que podem ocorrer revelam os possíveis arranjos entre as cadeias poliméricas. Assim, a formação de uma ponte entre estas cadeias poliméricas é observada quando ocorre a ligação de dois grupos alcoxi reativos em duas cadeias lineares do polímero. A formação de reações cruzadas entre as cadeias do polímero ocorre quando há a ligação de três grupos reativos a três cadeias do polímero e por fim a formação de rede polimérica ocorre quando houver ligação dos quatro grupos funcionais ao polímero.

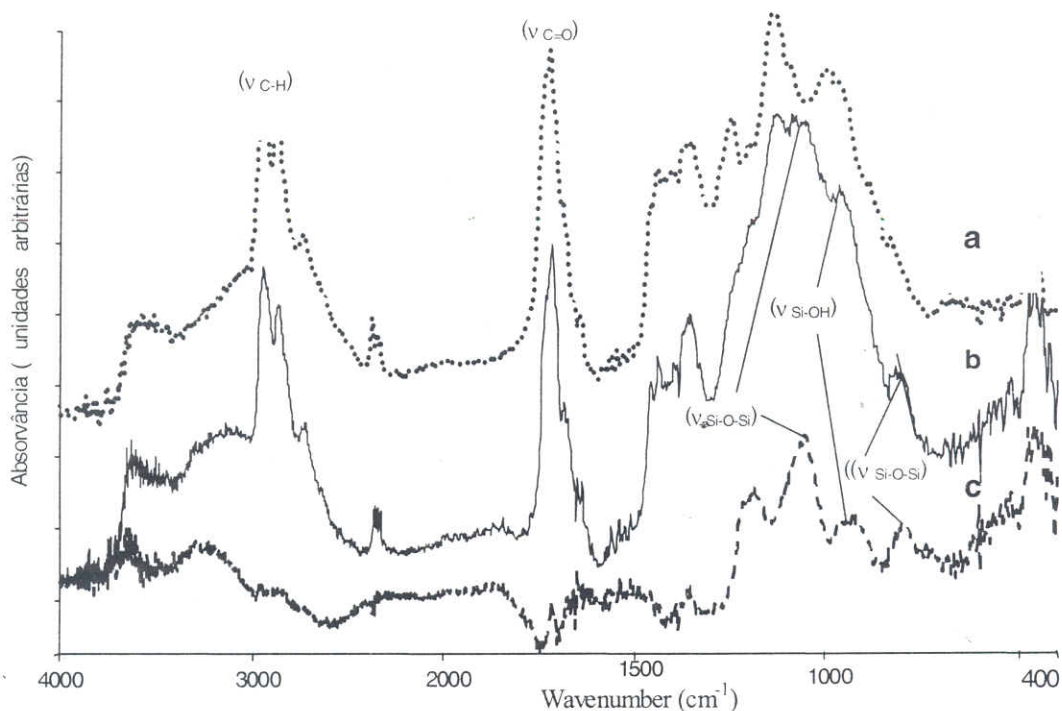


Figura 20. Espectros de FTIR dos hidrogéis e discos híbridos de PVA: a) hidrogel PVA+GA com indicação das regiões de absorção das ligações específica dos aldeídos (ν_{C-H}) e ($\nu_{C=O}$) em $2850 - 2750 \text{ cm}^{-1}$ e $1740 - 1720 \text{ cm}^{-1}$ respectivamente; b) disco híbrido PVA+GA+TEOS onde estão indicadas as regiões específicas do TEOS ($\nu_{Si-O-Si}$), (ν_{Si-OH}) e ($\nu_{Si-O-Si}$) em $1100-1000 \text{ cm}^{-1}$, $950-900 \text{ cm}^{-1}$ e $800-700 \text{ cm}^{-1}$; c) TEOS - resultado de subtração dos espectros (a) e (b) onde também estão indicadas suas regiões de absorção específicas.

5.3.2 - Adsorção da MPB70r nas matrizes poliméricas dos hidrogéis sintetizados

A imobilização de proteínas em suportes sólidos tem sido um dos campos mais promissores da área da bioengenharia. A interação proteína-superfície é influenciada por fatores como tipo de ligação, carga superficial e composição química, inerentes tanto ao material quanto à proteína e ao ambiente onde se desenvolve a reação. Nesse trabalho foi realizada a imobilização da MPB70r nos hidrogéis PVA+GA e PVA+GA+TEOS.

Na Figura 21 estão os espectros de FTIR dos dispositivos que sofreram adsorção

direta da MPB70r. A Figura 21a mostra o espectro do disco híbrido PVA + GA + MPB70r onde estão indicadas as regiões de absorção das amidas I, II, III em $1680 - 620 \text{ cm}^{-1}$, $1580 - 1480 \text{ cm}^{-1}$ e 1246 cm^{-1} , respectivamente. Essas bandas de absorção não foram visualizadas no espectro PVA + GA (Figura 19a). Ainda na Figura 21 está o espectro de FTIR do disco híbrido PVA + GA + TEOS + MPB70r mostrando também as regiões de absorção das ligações químicas das amidas I, II, III as quais não foram observadas no espectro PVA + GA + TEOS (Figura 20b). A Figura 21, portanto comprova que ocorreu a adsorção direta da MPB70r nos dispositivos sintetizados.

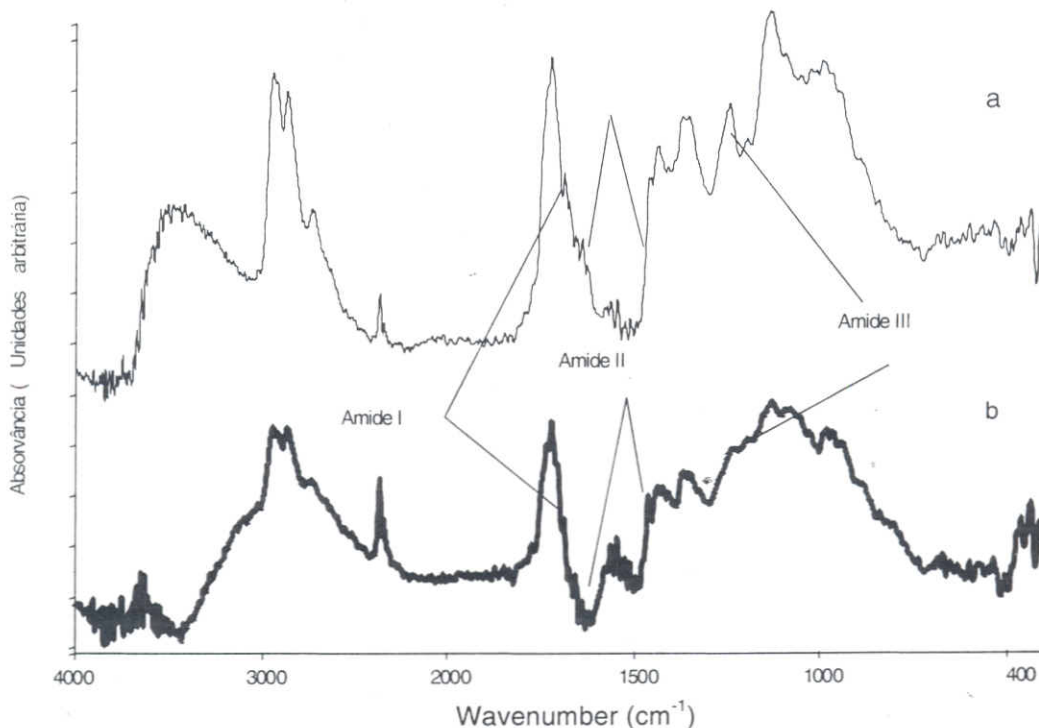


Figure 21. Espectros de FTIR dos hidrogéis e discos híbridos de PVA adsorvidos ou não com MPB70r. a) PVA+GA+rMPB70r; b) PVA+GA+TEOS+MPB70r). As ligações típicas encontradas em proteínas estão nas regiões de absorção das ligações referentes às amidas I, II e III em $1680 - 1620 \text{ cm}^{-1}$, $1580 - 1480 \text{ cm}^{-1}$ e 1246 cm^{-1} , respectivamente.

Através das análises dos espectros de FTIR realizados ficou comprovado o sucesso da síntese dos hidrogéis.

5.3.3 – Análises dos Hidrogéis como suportes nos ensaios de ELISA indireto com proteína MPB70r purificada em sistema de FPLC.

A partir da confirmação da formação dos dispositivos bem como a certeza de que a MPB70r estava neles adsorvida, foram feitos os testes para determinar a presença de anticorpos anti-MPB70 em soros de animais reagentes à tuberculinização. O teste realizado na placa Maxisorp[®] Nunc foram detectados anticorpos anti-MPB70r no soro imune de coelho anti-MPB70r e no soro do bovino reagente à tuberculinização e não foram detectados os anticorpos no soro imune de coelho anti-*M. avium* e soros dos bovinos não reagentes à tuberculinização como se esperava (Tabela 10).

Nos testes de ELISA realizados com PVA, PVA+TEOS e PVA+TEOS+GA adsorvidos com MPB70r não houve reação (dados não mostrados). Já no hidrogel PVA+GA foram detectados anticorpos com resultados semelhantes ao teste de ELISA realizado com a placa Nunc. Porém no ELISA realizado fazendo-se a mudança dos hidrogéis nos orifícios da placa a cada etapa do ELISA não foram mais detectados os anticorpos anti-MPB70r, sendo detectado somente nos orifícios onde não foram colocados os hidrogéis (Tabela 10). Estes dados mostram que a MPB70r foi removida durante as etapas do ELISA sugerindo que no período de adsorção da MPB70r ao hidrogel houve formação de ligações fracas do tipo van der Waals que foram facilmente desfeitas durante a etapa de lavagem. Nos ensaios de FTIR a proteína foi adsorvida e incubada a 42°C por no mínimo três horas já nos ensaios de ELISA o tempo de adsorção foi apenas de 1 hora a 37°C. O tempo e a temperatura inferior poderiam ter influenciado negativamente no processo de adsorção da MPB70r aos hidrogéis. Ainda em relação à interação dispositivo-proteína, o que também poderia ter contribuído para a formação de ligações fracas entre as

superfícies foi o uso do tampão Tris (pH 9,0) para a adsorção da MPB70r. Nessas condições a MPB70r passaria a ter carga negativa em uma superfície hidrofílica.

As placas utilizadas no ELISA onde foram alojados os hidrogéis eram placas destinadas para cultura de células que foram previamente tratadas com ácido nítrico, como foram detectados anticorpos anti-MPB70r, isto indica que o sistema melhor para adsorção da MPB70r deveria ter caráter mais hidrofóbico. Este caráter poderia ser conseguido adicionando-se aos hidrogéis grupos funcionais tais como amina (NH₂) e grupos mercaptanos (SH).

Outra abordagem poderia ser feita em relação a concentração de proteína usada no sistema. Nos ensaios de ELISA foram utilizados 0,5µg/50µl. Essa quantidade foi suficiente para ensaios utilizando placas convencionais, que é um sistema de superfície funcionalizada para se obter maior adsorção protéica. Uma concentração maior da MPB70r poderia ser testada no processo de adsorção aos dispositivos para definir a concentração protéica melhor a ser utilizada nesse novo sistema.

Em relação aos dispositivos, poderiam ser realizados testes para verificar a presença ou não de poros nos dispositivos. A porosidade pode influenciar também na interação superficial entre dispositivo e proteína, uma vez que, dependendo do modo de ligação poderiam ser escondidos epítomos de interesse.

Barros e colaboradores (2002) produziram discos de PVA-Glutaraldeído e polisiloxano como suporte em ELISA para detecção de anticorpos contra *Yersinia pestis* e mostraram haver semelhanças com adsorção de antígenos nas placas convencionais para ELISA. Coelho e colaboradores (2003) utilizando técnica de sol-gel produziram discos de álcool polivinílico e polisiloxano, como suporte no ELISA para detecção de IgG anti-*Toxocara canis* e verificaram semelhanças entre o suporte desenvolvido e placa convencional. Nestes dois trabalhos os autores não

mencionam se os dispositivos eram trocados ou não dos orifícios da placa a cada etapa do ELISA. Em nosso ELISA mostramos a importância desse

procedimento, pois mostramos que a MPB70r adsorveu no orifício e não nos dispositivos.

Tabela 10: ELISA indireto com MPB70r purificada em sistema de FPLC utilizando hidrogéis de PVA + GA como suporte

	PVA+GA ¹ A492nm	PVA+GA ² A492 nm	Sem hidrogel A492 nm
Soro imune de coelho anti-MBP70r	0,510	0,027	0,611
Soro bovino reagente à tuberculinização	0,250	0,049	0,511
Soro imune de coelho anti- <i>M. avium</i>	0,022	0,011	0,074
Soro bovino não reagente à tuberculinização	0,058	0,024	0,046

¹: hidrogel mantido no mesmo orifício da placa a cada etapa do ELISA.

²: Hidrogel removido do orifício da placa a cada etapa do ELISA.

Todos os valores foram médias.

6 – CONCLUSÕES

A expressão da MPB70r foi observada a partir de 1 hora após indução por IPTG, sendo produzida de forma solúvel em temperatura de incubação da cultura bacteriana a 25°C. A MPB70r produzida mostrou 100% de identidade com a seqüência teórica da proteína imunogênica MPB70 do *M. bovis*, e com a MPT70 do *M. tuberculosis*.

O melhor processo de purificação para a MPB70r produzida foi por FPLC.

A MPB70r foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal 4C/17 anti-MPB70, pelos soros de bovinos reagentes à tuberculinização, pelos soros imunes de coelho anti-*M. bovis* e anti-MPB70r. Não apresentou reação cruzada com soro imune de coelho anti-*M. avium* ou soros de bovinos com paratuberculose.

O ELISA estudado mostrou alta especificidade e baixa sensibilidade.

As análises dos espectros de FTIR mostraram que os hidrogéis e híbridos de PVA adsorvidos ou não com a MPB70r foram sintetizados com sucesso. Porém, sua utilização como suporte alternativo em imunodiagnósticos, nas condições em que foram realizados os testes ELISA não ofereceu vantagens em relação aos suportes convencionais.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUER, L. A. Assessment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Australian Veterinary Journal*, v.64, n.6, p.172 -176, 1987.

BAPTISTA, F. *Tuberculose e outras causas de condenação de bovinos em frigoríficos de Minas Gerais*. 1999. 60p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Medicina Veterinária da UFMG, Belo Horizonte.

BARROS, A. E. L.; ALEMIDA, A. M. P.; CARVALHO JR., L. B. et al. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, v.35, n.4, p.459-463, 2002.

BELCHIOR, A. P. *Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais*. 2001. 55p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Medicina Veterinária da UFMG, Belo Horizonte.

BÖDDINGHAUS, B.; ROGALL, T.; FLOHR, T. et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal Clinical Microbiology*, v.28, n.8, p. 1751-1759, 1990.

BOVINE TUBERCULOSIS. In: Manual of standards diagnostic tests and vaccines 2000. Disponível em: < <http://www.oie.int/>> Acesso em 02 maio 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 2, 10 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de janeiro de 2001.

BYFIELD, M. P.; ABUKNESHA, R. A. Biochemical aspects of biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, v.9, n.4-5, p.373-400, 1994.

CARR, M. D.; BLOEMINKE, J. M.; DENTTEN, E. et al. Solution structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex protein MPB70. *Journal Biological Chemistry*, v.278, n.44, p.43736- 43743, 2003.

COELHO, R. A. L.; YAMASAKI, H.; PEREZ, E. The use of polysiloxane/polyvinyl alcohol beads as solid phase in IgG anti-*Toxocara canis* detect using a recombinant antigen. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, n.3, p.391-393, 2003.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, v.4, n.1, p.59-70, 1998.

COSTELLO, E.; O'REILLY, P. F.; YEARSLEY, D. K. A study of an Enzyme-Linked Immunosobent assay for the diagnosis of tuberculosis in cattle. *Irish Veterinary journal*, v.50, n.1, p.35-38, 1997.

FIFIS, T.; COSTOPOULOS, C.; CORNER, L. A. et al. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Veterinary Microbiology*, v.30, n.4, p.343-354, 1992.

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

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings National Academy Sciences United States America*, v.100, n.13, p.7877-7882, 2003.

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

GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R. D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, v.45, n.1-2, p. 23-41, 2000.

HARBOE, M.; NAGAI, S. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *American Review Respiratory Disease*, v.129, n.3, p.444-452, 1984.

HARBOE, M.; NAGAI, S.; PATARROYO, M. E. et al. Properties of proteins MPB64, MPB70 and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection Immunity*, v.52, n.1, p.293-302, 1986.

HARBOE, M.; WIKER, H. G.; DUNCAN, J. R. et al. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal Clinical Microbiology*, v.28, n.5, p.913-921, 1990.

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

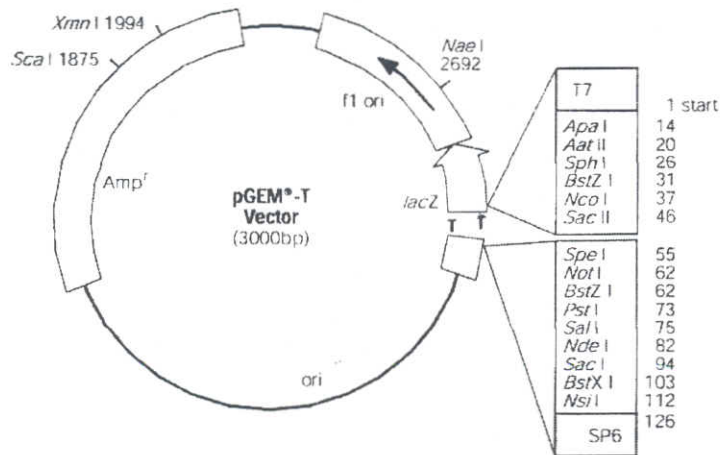
LIGHTBODY, K. A.; SKUCE, R. A.; NEILL, S. D. et al. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: a ELISA with potential to confirm disease status. *Veterinary Record*, v.142, n.12, p.295-300, 1998.

- LIGHTBODY, K. A.; McNAIR, J.; NEILL, S. D. et al. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunized and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Veterinary Microbiology*, v.75, n.2, p.177-188, 2000.
- LU, C. F.; NADARAJAH, A.; CHITTUR, K. A comprehensive model of multiprotein adsorption on surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, v.168, n.1, p.152-161, 1994.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, v.193, n.1, p. 265-275, 1951.
- MALMSTEN, M. Biopolymers at interface: protein on surfaces. K. Chittur (ed.). New York: Marcel Dekker Inc., 1998, p. 143.
- MANSUR, H. S.; ORÉFICE, R. L.; LOBATO, Z. I. P. et al. Adsorption/desorption behavior of bovine serum albumin and porcine insulin on chemically patterned porous gel networks. *Adsorption*, v. 7, p.105-116, 2001.
- MANSUR, H. S.; VASCONCELOS, W. L.; LENZA, R. F. S et al. Sol-gel silica based networks with controlled chemical properties. *Journal Non-Crystalline Solids*, v.273, n.1-3, p.109-115, 2000.
- MATSUO, T.; MATSUMO, T. S. OHARA, N. et al. Differential transcription of the MPB70 genes into major groups of *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *Microbiology*, v.141, n.Pt7, p.1601-1607, 1995.
- MCLEAN, M. A.; STAYTON, P. S.; SLIGAR, S. G. Engineering protein orientation at surfaces to control macromolecular recognition events, *Analytical Chemistry*, v.65, n.19, p.2676-2678, 1993.
- MIURA, K.; NAGAI, S.; KINOMOTO, M. et al. Comparative studies with various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG on the production of an antigenic protein, MPB70. *Infection Immunity*, v.39, n.2, p.540-545, 1983.
- MONAGHAM, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D. et al. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1-2, p.111-124, 1994.
- MOTA, P. M. P.; LOBATO, F. C. Tuberculose bovina: uma revisão. In: LAGE, A. P.; LOBATO, F. C.; MOTA, P. M. P. et al. Atualização em tuberculose bovina. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998. 63p.
- NAGAI, S.; MATSUMOTO, J.; NAGASUGA, T. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection Immunity*, v.31, n.3, p.1152-1160, 1981.
- NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOFD, E. A. M. G. ; GRAAT, F. A. M. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen: Wageningen Pers, 1997. 445p.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Infrared spectroscopy. In: ___ Introduction to spectroscopy, 2 ed. Saunders College. 1996. Cap.2.
- PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos biomateriais: híbrido orgânico-inorgânico bioativos. *Polímeros*, v.9, n.4, p.104-109, 1999.
- PEPPAS, N. A.; HUANG, Y.; TORRES-LUGO, M. et al. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual Review Biomedical Engineering*, v.2, p.9-29, 2000.
- POLLOCK, J. M.; DOUGLAS, A. J.; MACKIE, D. P. Identification of bovine T-cell epitopes for three *Mycobacterium bovis* antigens: MPB70, 19,000 MW and MPB57. *Immunology*, v.82, n.1, p.9-15, 1994.
- RADFORD, A. J.; WOOD, P. R.; BILLMAN-JACOB, H. et al. Epitope mapping of the *Mycobacterium bovis* secretory protein MPB70 using overlapping peptide analysis. *Journal General Microbiology*, v.136, n.2, p.265-272, 1990.

- RADFORD, A. J.; DUFFIELD, B. J.; PLACKETT, P. Cloning of a species-specific antigen of *Mycobacterium bovis*. *Infection Immunity*, v.56, n.4, p.921-925, 1988.
- RADUNZ, B. L.; LEPPER, W.D. Suppression of skin reactivity to bovine tuberculin in repeat tests. *Australian Veterinary Journal*, v.62, n.6, p.191-194, 1985.
- RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique Technique Office International Epizooties*. v.20, n.1, p.21-54, 2001.
- RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; BARRERA, L. et al. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Journal Veterinary Medicine*, v.B37, n.1, p.19-27, 1990.
- RHODES, S. G., GAVIER-WIDEN, D.; BUDDLE, M. B. et al. Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. *Infection immunity*, v.68, n.5, p.2573-2578, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F; MANIATIS, M. Molecular cloning: a Laboratory manual. 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SANGER, F. COULSON, A. R.; BARREL, B.G. ET AL. Cloning in single strand bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *Journal Molecular Biological*, v.143, n.2, p.161-178, 1980.
- SMITH, R. D. Veterinary clinical epidemiology: a problem-oriented approach. Boca Raton: CRC, 1994. 234p.
- SOUZA, V. A.; ANTUNES E SOUZA, C. F.; SOUZA, R. M. et al. A importância da tuberculose bovina como zoonose. *Higiene Alimentar*, v.13, n.59, p.22-27, 1999.
- SUGDEN, E. A.; STILWELL, K.; ROHONCZY, E. B. et al. Competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycobacterium bovis* infections based on MPB70 and lipoarabinomannan antigens. *Canadian Journal Veterinary Reserch*, v.61, n.1, p 8-14, 1997.
- TERASAKA, K.; YAMAGUCHI, R.; MATSUO, K. et al. Complete nucleotide sequence of immunogenic protein MPB70 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Federation European Microbiological Societies Microbiology Letters*, v.49, n.2-3, p.273-276, 1989.
- THOEN, C.O; BLOOM, B. R. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In: THOEN, C. O., STEELE, J. H. (eds.). *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa State University: Ames, 1995, p.3-14.
- VORDERMEIER, H. M.; COCKLE, P. C.; WHELAN, A. et al. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection cattle. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v.6; n.5, p.675-682, 1999.
- WIKER, H. G.; HARBOE, M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological Reviews*, v.56, n.4, p.648-661, 1992.
- WOOD, P. R.; CORENER, L. A.; ROTHEL, et al. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v.31, n.1, p.71-79, 1992.
- WOOD, P. R.; RIPPER, J.; RADFORD A. J. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Mycobacterium bovis*. *Journal General Microbiology*, v.134, n.9, p.2599-2604, 1988.

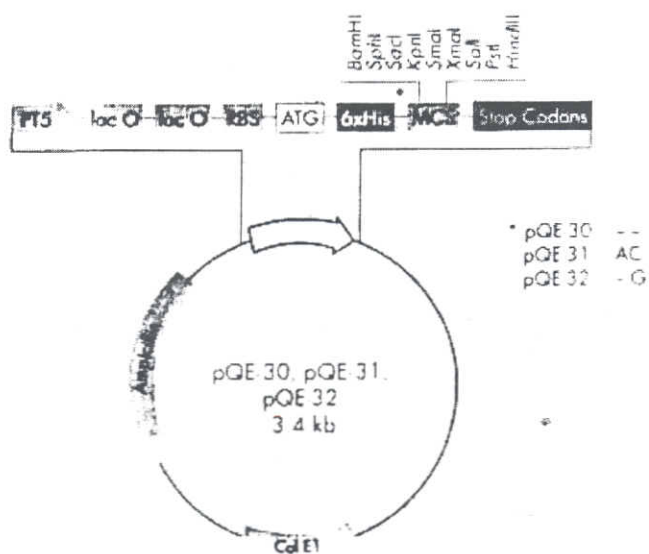
Anexo 1: Vetor de clonagem molecular pGEM[®] - T

A clonagem realizada usando o Kit "pGEM[®] - T and pGEM[®] - T easy vector systems" (Promega Corporation, USA) foi escolhida, pois permite a ligação do produto de PCR diretamente no plasmídeo. O pGEM[®] - T é fornecido na forma linear, sendo que em ambas extremidades 3' há uma timidina para evitar o retorno à forma circular. Essa timidina melhora a eficiência de ligação do produto de PCR no sítio de inserção, pois a polimerase termoestável desse kit adiciona uma única deoxiadenosina ao final 3' de cada fragmento amplificado. A inativação da região codificadora dos α -peptídeos da enzima β -galactosidase permite identificar clones recombinantes através da cor. O mapa esquemático do pGEM[®] - T abaixo evidencia a região múltipla de clonagem dentro da região codificadora α -peptídeo da enzima β -galactosidase.



Anexo 2: Vetor de expressão pQE30.

A clonagem foi realizada usando o "QIAexpress Kit" (QIAGEN Inc., USA) e vetor de expressão o plasmídeo pQE-30. Esse plasmídeo possui o promotor do fagoT5 e duas seqüências do operador *lac* que promovem a repressão do promotor T5, mantendo baixa a expressão de genes que estão sob seu controle. Possui RBSII (synthetic ribosomal binding site) para altas taxas de tradução, e seqüência codificadora para seis Histidinas (que auxilia no sistema de purificação por cromatografia de afinidade), sitio múltiplo de clonagem contendo sítios para 9 enzimas de restrição. Possui também o gene β -lactamase (*bla*) que confere resistência ao antibiótico ampicilina. A expressão de proteínas recombinantes por pQE30 é rapidamente induzida após adição de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) que se liga à proteína do repressor *lac* inativando-a. Esse plasmídeo insere na proteína de interesse seis histidinas que podem se localizar na porção N ou C-terminal. Essas histidinas promovem a ligação da proteína recombinante em resinas constituídas por níquel ou zinco simplificando seu o processo de purificação por um passo único de cromatografia por afinidade de metal. O mapa esquemático do pGEM[®]-T abaixo evidencia a posição do RBSII, O ATG inicial, a região das seis histidinas, região múltipla de clonagem e os códigos de terminação.



Anexo 3: Resultado das fases de leituras da MPB70r feitas através do programa "Translate Tool"

EXPASy Home page	Site Map	Search ExPASy	Contact us	Proteomics tools
----------------------------------	--------------------------	-------------------------------	----------------------------	----------------------------------

Search Swiss-Prot/TrEMBL for

Translate Tool - Results of translation

Please select one of the following frames:

5'3' Frame 1

X **Met** R G S H H H H H H G S G D L V G P G C A E Y A A A N P T G P A S V Q G **Met** S Q D P V A V A A S N
N P E L T T L T A A L S G Q L N P Q V N I V D T L N S G Q Y T V F A P T N A A F S K L P A S T I D E L K T
N S S L L T S I L T Y H V V A G Q T S P A N V V G T R Q T L Q G A S V T V T G Q G N S L K V G N A D V V
C G G V S T A N A T V Y **Met** I D S V L **Met** P P A **Stop** N

5'3' Frame 2

X **Stop** E D R I T I T I T D P A I W W A R A A R N T R Q I P L G R P R C R E C R R T R S R W R P R T I R S
Stop Q R **Stop** R I H C R A S S I R K **Stop** T W W T P S T A V S T R C S H R P T R H L A S C R H P R S T S S R
P I R H C **Stop** P A S **Stop** P T T **Stop** W P A K P A R P T S S A P V R P S R A P A **Stop** R **Stop** P V R V T A S R S
V T P T S S V V G C L P P T R R C T **Stop** L T A C **Stop** C L R R K

5'3' Frame 3

X E R I A S P S P S R I R R S G G P G L R G I R G S Q S H W A G L G A G N V A G P G R G G G L E Q S G V D
N A D G C T V G P A Q S A S K P G G H P Q Q R S V H G V R T D Q R G I **Stop** Q A A G I H D R R A Q D Q F
V T A D Q H P D L P R S G R P N Q P G Q R R R H P S D P P G R Q R D G D R S G **Stop** Q P Q G R **Stop** R R R
R L W W G V Y R Q R D G V H D **Stop** Q R A N A S G V K

3'5' Frame 1

I L R R R H **Stop** H A V N H V H R R V G G R H P T T D D V G V T D L E A V T L T G H R H A G A L E G L T
G A D D V G R A G L A G H Y V V G Q D A G Q Q **Stop** R I G L E L V D R G C R Q L A K C R V G R C E H R V
L T A V E G V H Q V Y L R I E L A R Q C S R Q R C Q L R I V R G R H R D R V L R H S L H R G R P S G I G C
R V F R A A R A H Q I A G S V **Met** V **Met** V **Met** R S S H X

3'5' Frame 2

F Y A G G I S T L S I **Met** Y T V A L A V D T P P Q T T S A L P T L R L L * P **Stop** P V T V T L A P W R V **Stop** R
V P T T L A G L V W P A T T W **Stop** V R **Met** L V S S D E L V L S S S I V D A G S L L N A A L V G A N T V Y
Stop P L L R V S T R F T C G L S W P D S A A V S V V N S G L F E A A T A T G S C D I P C T E A G P V G L A
A A Y S A Q P G P T R S P D P **Stop** W **Stop** W **Stop** C D P L X X

3'5' Frame 3

F T P E A L A R C Q S C T P S R W R **Stop** T P H H R R R R R Y R P **Stop** G C Y P D R S P S R W R P G G S D G
C R R R W P G W F G R P L R G R S G C W S A V T N W S **Stop** A R R S W **Met** P A A C **Stop** **Met** P R W S V R
T P C T D R C **Stop** G C P P G L L A D **Stop** A G P T V Q P S A L S T P D C S R P P P R P G P A T F P A P R P A
Q W D W L P R I P R S P G P P D R R I R D G D G D A I L S X X

EXPASy Home page	Site Map	Search ExPASy	Contact us	Proteomics tools
----------------------------------	--------------------------	-------------------------------	----------------------------	----------------------------------

<http://au.expasy.org>

Anexo 4: Resultado da Análise de identidade da seqüências nucleotídica da MPB70r no "GenBank" pelo programa Basic Local Alignment Search Tool – BLAST N "



results of BLAST

BLASTN 2.2.8 [Jan-05-2004]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1082049474-11293-3013190092.BLASTQ3

Query=

(492 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
2,230,922 sequences; 10,421,193,701 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the BLAST FAQs

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 41352756 emb BX842581.1 Mycobacterium tuberculosis H37R...	975	0.0
gi 6469701 gb AF189006.1 AF189006 Mycobacterium tuberculosi...	975	0.0
gi 31619628 emb BX248344.1 Mycobacterium bovis subsp. bovi...	975	0.0
gi 44192 emb X17086.1 MBMPB70 M.bovis DNA for immunogenic ...	975	0.0
gi 531028 dbj D37968.1 MSGMPT70 Mycobacterium tuberculosis ...	975	0.0
gi 1008918 dbj D38230.1 MSGMPB70B Mycobacterium bovis DNA f...	975	0.0
gi 1008916 dbj D38229.1 MSGMPB70A Mycobacterium bovis DNA f...	975	0.0
gi 149975 gb M33916.1 MSGMPBAA M.bovis secreted protein MPB...	975	0.0
gi 13882714 gb AE007118.1 AE007118 Mycobacterium tuberculos...	967	0.0
gi 148925 gb M37840.1 MSGANTMPB M.bovis antigen MPB70 gene,...	967	0.0
gi 1482523 emb X99760.1 MKMPB70AN M.kansasii MPB70 gene ana...	100	5e-18
gi 994767 dbj D64165.1 MSGMPB Mycobacterium bovis gene for ...	62	1e-06
gi 27348543 dbj AP005936.1 Bradyrhizobium japonicum USDA 1...	59	2e-05
gi 1181246 emb X94597.1 MTMPT83GN M.tuberculosis mpt83 gene	56	7e-05
gi 1431859 gb U28743.1 MBU28743 Mycobacterium bovis lipopro...	56	7e-05
gi 27353424 dbj AP005954.1 Bradyrhizobium japonicum USDA 1...	42	1.0
gi 27350476 dbj AP005943.1 Bradyrhizobium japonicum USDA 1...	42	1.0
gi 24427855 emb AL939119.1 SCO939119 Streptomyces coelicolo...	42	1.0
gi 24413728 emb AL939106.1 SCO939106 Streptomyces coelicolo...	42	1.0
gi 31201952 ref XM_309824.1 Anopheles gambiae ENSANGP00000...	40	4.0
gi 21114943 gb AE912487.1 Xanthomonas campestris pv. campe...	40	4.0
gi 45236682 gb AC132584.4 Mus musculus chromosome 7 clone ...	40	4.0
gi 8052319 emb AJ400878.1 MMU400878 Mus musculus Asc13 gene...	40	4.0

Alignments -

" [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Anexo 5: Resultado da Análise de identidade da MPB70r com proteínas depositadas no "GenBank" pelo programa Basic Local Alignment Search Tool – BLAST X**



BLASTX 2.2.8 [Jan-05-2004]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1092632105-8312-190644595255.BLASTQ3

Query= PQ30-F

(531 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS

translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF

2,768,312 sequences; 778,115,222 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

Taxonomy reports

Related Structures

Sequences producing significant alignments:

	Score (bits)	E Value
gi 39769 pir AA37195 major secreted protein MPB70 precursor...	317	8e-86
gi 15619012 ref NP_217391.1 mpt70 [Mycobacterium tuberculo...	317	8e-86
gi 6469734 gb AAF13402.1 Mpt70 [Mycobacterium tuberculosis]	317	8e-86
gi 34910488 pdb 1NY0 A Chain A, Solution Structure Of The A...	313	8e-86
gi 149926 gb AAA25355.1 antigen MPB70	313	9e-85
gi 15610010 ref NP_217389.1 mpt83 [Mycobacterium tuberculo...	246	2e-64
gi 14310660 gb AAB03901.1 p23	246	2e-64
gi 46365904 ref ZP_00228327.1 COG2335: Secreted and surfac...	209	2e-53
gi 28770 pir AA3502 MPB70 protein - Mycobacterium bovis (f...	189	3e-38
gi 6469702 gb AAF13400.1 Mpt83 [Mycobacterium tuberculosis]	137	1e-27
gi 6919923 sp Q49614 MP70_MYCA Immunogenic protein MPT70 a...	134	7e-27
gi 21319169 ref NP_624948.1 putative lipoprotein [Streptom...	132	5e-30
gi 21224687 ref NP_630966.1 putative secreted protein [Str...	105	7e-22
gi 23124534 ref ZP_00106516.1 COG2335: Secreted and surfac...	94	2e-18
gi 16269095 ref NP_435628.1 Nex18 Symbiotically induced co...	94	2e-18
gi 6010628 gb AAF01193.1 unknown [Sinorhizobium meliloti]	94	2e-18
gi 15809426 ref NP_294172.1 osteoblast specific factor 2-r...	92	4e-18
gi 23039544 ref ZP_00071102.1 COG2335: Secreted and surfac...	90	3e-17
gi 44214540 gb EAM74262.1 unknown [environmental sequence]	89	4e-17
gi 21244428 ref NP_644010.1 conserved hypothetical protein...	89	6e-17
gi 27377585 ref NP_769114.1 blr2474 [Bradyrhizobium japoni...	88	1e-16
gi 44501918 gb EAK25985.1 unknown [environmental sequence]	87	1e-16
gi 7638019 gb AAF65308.1 putative cell adhesion protein Sy...	87	2e-16
gi 37521719 ref NP_925096.1 hypothetical protein glr2150 [...]	86	5e-16
gi 23109080 ref ZP_00094322.1 COG2335: Secreted and surfac...	85	7e-16
gi 21229208 ref NP_635130.1 hypothetical protein [Methanos...	85	9e-16
gi 16332163 ref NP_442911.1 transforming growth factor ind...	84	1e-15
gi 49608229 ref ZP_00160569.1 COG2335: Secreted and surfac...	84	1e-15
gi 39933299 ref NP_945575.1 Beta-Ig-H3/Fasciclin domain [R...	84	2e-15
gi 44419350 gb EAG13884.1 unknown [environmental sequence]	84	2e-15
gi 44490413 gb EAG63689.1 unknown [environmental sequence]	83	2e-15
gi 27375618 ref NP_767147.1 bli0507 [Bradyrhizobium japoni...	84	2e-15
gi 43990201 gb EAD59168.1 unknown [environmental sequence]	84	2e-15

Anexo 6: Resultados da análise das Características da
MPB70r através do programa ProtParam tool*



ProtParam tool

User-provided sequence:

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1 MRGSHHHHHH GSGDLVGPGC AEYAAANPTG PASVQGMSQD PVAVAASNNP ELTTLTAALS   60
61 GQLNPQVNLV DTLNSGQYTV FAPTNAAFSK LPASTIDELK TNSSLTSIL TYHVVAGQTS   120
121 PANVVGTRQT LQGASVTVTG QGNSLKVGMNA DVVCGGVSTA NATVYMIDSV LMPPA
    
```

References and documentation are available

Number of amino acids: 175

Molecular weight: 17704.7

Theoretical pI: 5.89

Amino acid composition:

Ala (A)	21	12.0%
Arg (R)	2	1.1%
Asn (N)	12	6.9%
Asp (D)	6	3.4%
Cys (C)	2	1.1%
Gln (Q)	9	5.1%
Glu (E)	3	1.7%
Gly (G)	17	9.7%
His (H)	7	4.0%
Ile (I)	3	1.7%
Leu (L)	15	8.6%
Lys (K)	3	1.7%
Met (M)	4	2.3%
Phe (F)	2	1.1%
Pro (P)	11	6.3%
Ser (S)	17	9.7%
Thr (T)	18	10.3%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	4	2.3%
Val (V)	19	10.9%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 9

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 5

Atomic composition:

Carbon	C	762
Hydrogen	H	1219

Anexo 7: Resultados da análise das Características da
MPB70 nativa através do programa ProParam tool*



ProtParam tool

User-provided sequence:

```

      1           11           21           31           41           51
      |           |           |           |           |           |
1  GDLVGFPCAE YAAAHPTSPA SVQGMSQDPV AVAASNPEL TTLTAALSGQ LNFQVNLVDY 60
61 LNSGQYTVFA PTNAAPSKLP ASTIDELKTN SSLTSILTY HVVAGQTSFA NVVGTRQTLQ 120
121 GASVTVTGGG NSLKVGNADV VCGGVSTANA TVYMTDSVIM PFA
  
```

References and documentation are available.

Number of amino acids: 163

Molecular weight: 16306.3

Theoretical pI: 4.31

Amino acid composition:

Ala (A)	21	12.9%
Arg (R)	1	0.6%
Asn (N)	12	7.4%
Asp (D)	6	3.7%
Cys (C)	2	1.2%
Gln (Q)	9	5.5%
Glu (E)	3	1.8%
Gly (G)	15	9.2%
His (H)	1	0.6%
Ile (I)	3	1.8%
Ieu (L)	15	9.2%
Lys (K)	3	1.8%
Met (M)	3	1.8%
Phe (F)	2	1.2%
Pro (P)	11	6.7%
Ser (S)	15	9.2%
Thr (T)	16	11.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	4	2.5%
Val (V)	19	11.7%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 9

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 4

Atomic composition:

Carbon	C	765
Hydrogen	H	1149