



Serviço Nacional de Aprendizagem Rural



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

NOVAS ABORDAGENS DIAGNÓSTICAS PARA TUBERCULOSE BOVINA

Flávio Ribeiro de Araújo

Pesquisador da Embrapa Gado de Corte

Campo Grande - MS

DIAGNÓSTICO TRADICIONAL DA TUBERCULOSE BOVINA

Regulamentação no Brasil

Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (MAPA).

Diagnóstico “ante-mortem”

- Testes intradérmicos de tuberculinização.

Diagnóstico “post-mortem”

- Inspeção sanitária em tecidos e órgãos;
- Lesões sugestivas de tuberculose;
- Confirmação da etiologia: cultura, bioquímica ou PCR.

DIAGNÓSTICO TRADICIONAL DA TUBERCULOSE BOVINA

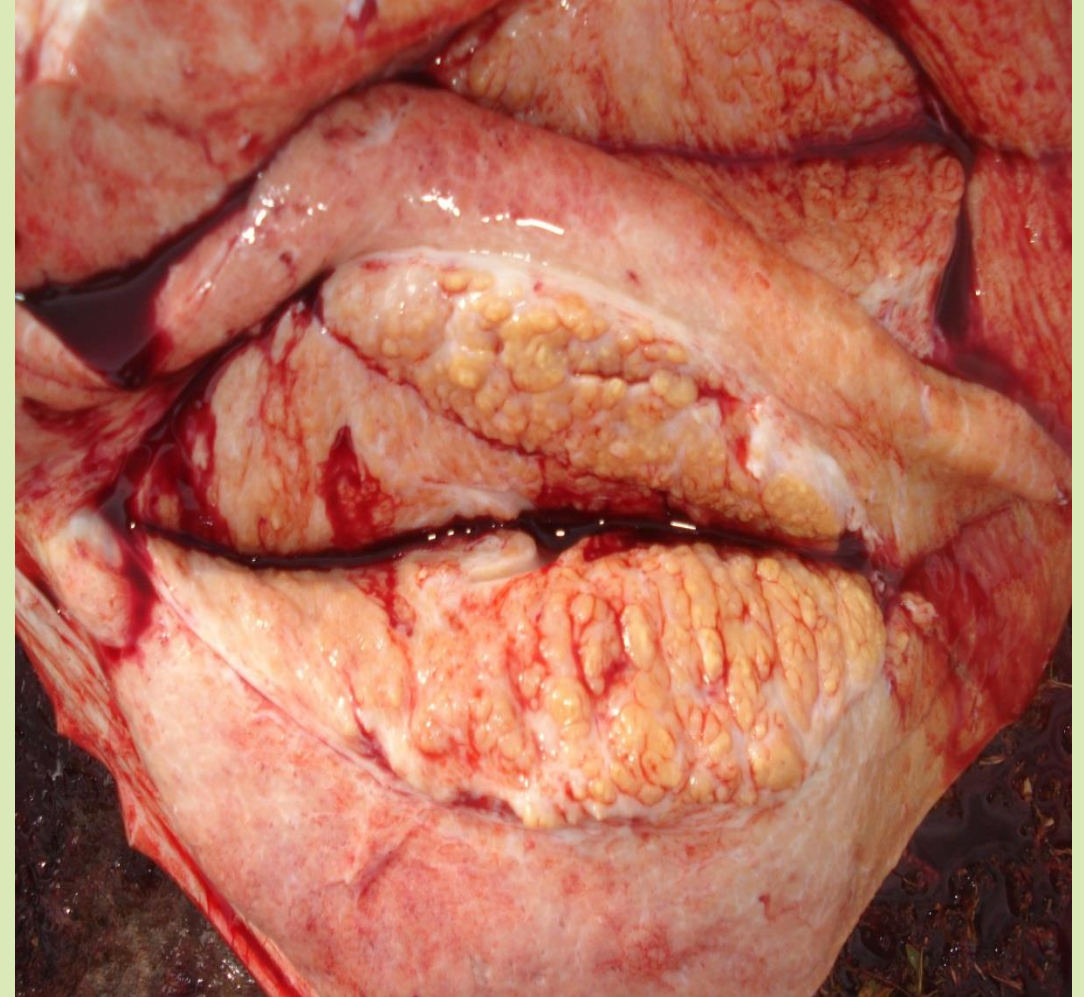
Limitações dos testes tradicionais

Tuberculinização intradérmica

- Detecta exclusivamente a resposta celular nos animais;
- Bovinos em avançado estágio de infecção: anergia.
- Animais falso-negativos no rebanho.

DIAGNÓSTICO TRADICIONAL DA TUBERCULOSE BOVINA

Animal anérgico, falso-negativo na tuberculinização



DIAGNÓSTICO TRADICIONAL DA TUBERCULOSE BOVINA

Limitações dos testes tradicionais

Tuberculinização intradérmica

- Duas contenções dos animais:
 - a) Leitura da dobra da pele e inoculação da tuberculina;
 - b) Leitura da dobra da pele 72h depois.

DIAGNÓSTICO TRADICIONAL DA TUBERCULOSE BOVINA



DIAGNÓSTICO TRADICIONAL DA TUBERCULOSE BOVINA

Limitações dos testes tradicionais

Tuberculinização intradérmica

- Reações cruzadas com micobactérias ambientais
 - Diferenciação usando tuberculina aviária;
 - Quando realiza-se tuberculinização simples, é necessário um intervalo mínimo de 60 dias para realizar a tuberculinização comparativa;
 - Reações inconclusivas: mínimo de 60 dias para re-teste.

OUTROS TESTES DISPONÍVEIS PARA TUBERCULOSE BOVINA

Novas tecnologias

PNCEBT Art. 5º A eficácia das ações sanitárias depende da qualidade e padronização dos métodos de diagnóstico e dos instrumentos profiláticos utilizados. Este Programa contempla e padroniza técnicas disponíveis no país e referenciadas pela Organização Mundial de Saúde Animal - OIE, que garantem sensibilidade e especificidade de diagnóstico adequadas. **Prevê-se a possibilidade de introduzir novos testes de diagnóstico e vacinas, de forma a acompanhar os avanços científicos e tecnológicos.**

OUTROS TESTES DISPONÍVEIS PARA TUBERCULOSE BOVINA

Teste de dosagem de interferon-gama (IFN- γ)

- Detecta a produção desta citocina em resposta à infecção por *M. bovis*
- Teste feito com sangue dos animais
- Incubado em placas com antígeno de *M. bovis*
- Avalia a resposta celular
- Não é usado oficialmente no Brasil

OUTROS TESTES DISPONÍVEIS PARA TUBERCULOSE BOVINA

ELISA (Idexx)

- Detecta a produção de anticorpos contra *M. bovis*;
- Teste feito com o soro dos animais;
- Pode detectar animais anérgicos;
- Certificado pela OIE;
- Usa MPB70/MPB3 recombinantes como antígeno.

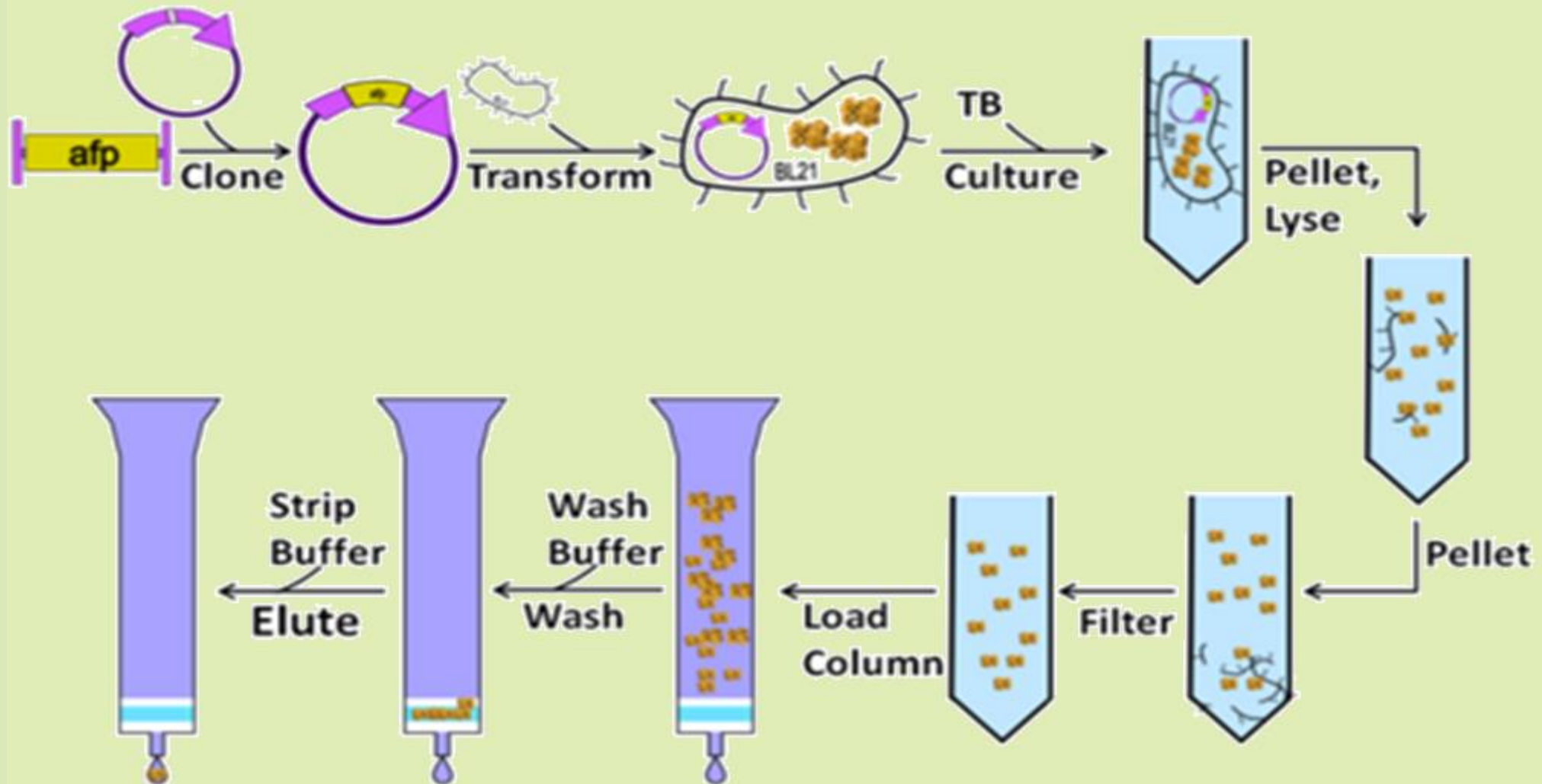
TECNOLOGIAS DESENVOLVIDAS NA EMBRAPA

GADO DE CORTE

ELISA Embrapa com proteínas recombinantes

- Detecta a produção de anticorpos contra *M. bovis*;
- Teste feito com o soro dos animais;
- Antígeno quimérico (fusão): MPB70 + MPB3 + ESAT-6 recombinantes;
- Pedido de patente submetido.

PROTEÍNAS RECOMBINANTES

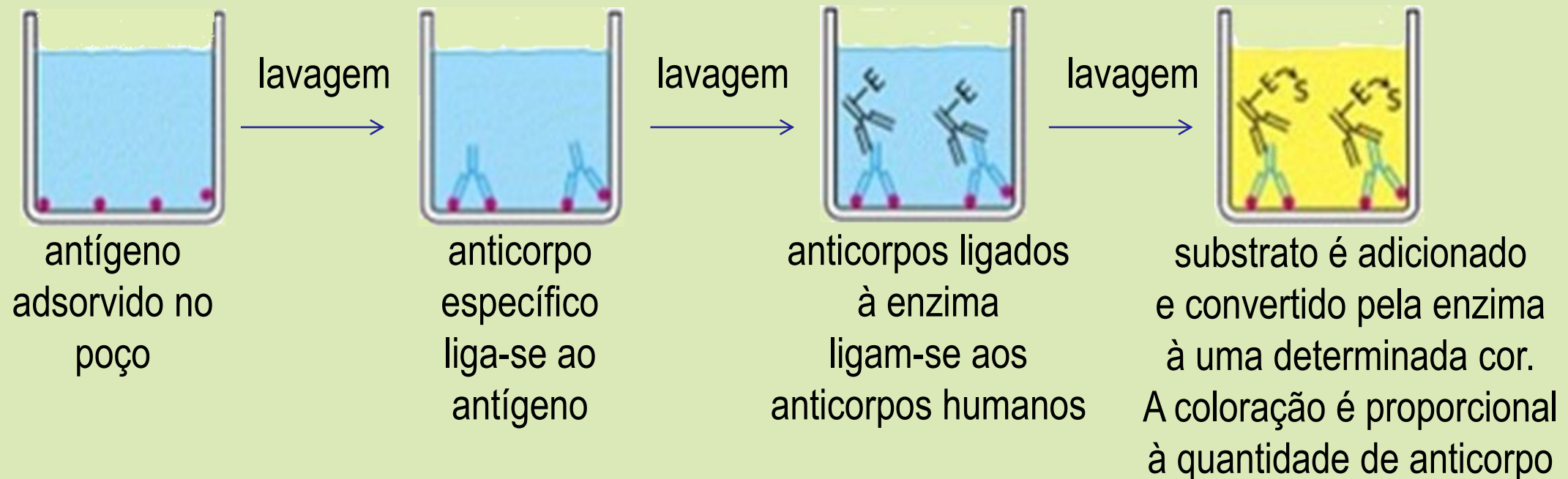


ELISA COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES

- **ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay***

Ensaio de imunoadsorção enzimática

ELISA indireto



ELISA COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Padronização

- Soros de 126 vacas com teste intradérmico negativo;
- Soros de 107 animais com teste intradérmico positivo;
 - Lesões sugestivas de tuberculose;
 - BAAR e PCR+.

ELISA COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Publicação de resultados

Souza et al. *SpringerPlus* 2012, 1:77
<http://www.springerplus.com/content/1/1/77>

 **SpringerPlus**
a SpringerOpen Journal

RESEARCH

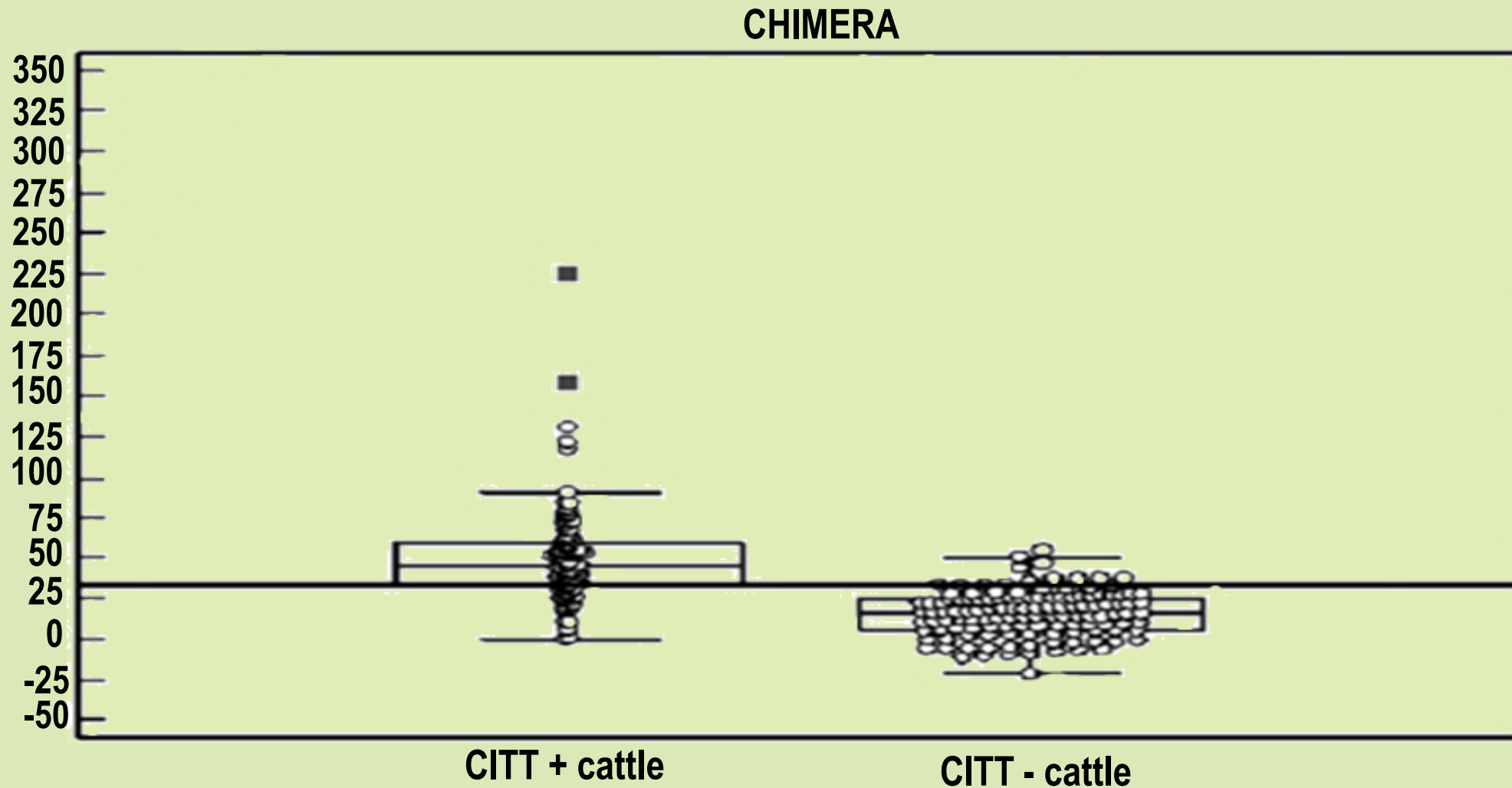
Open Access

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

Ingrid IF Souza¹, Elaine SP Melo¹, Carlos AN Ramos^{2*}, Thaís A Farias¹, Ana Luiza AR Osório¹, Klaudia SG Jorge¹, Carlos ES Vidal³, Altino S Silva⁴, Márcio R Silva⁵, Aiesca O Pellegrin⁶ and Flávio R Araújo⁷

ELISA COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Análise ROC

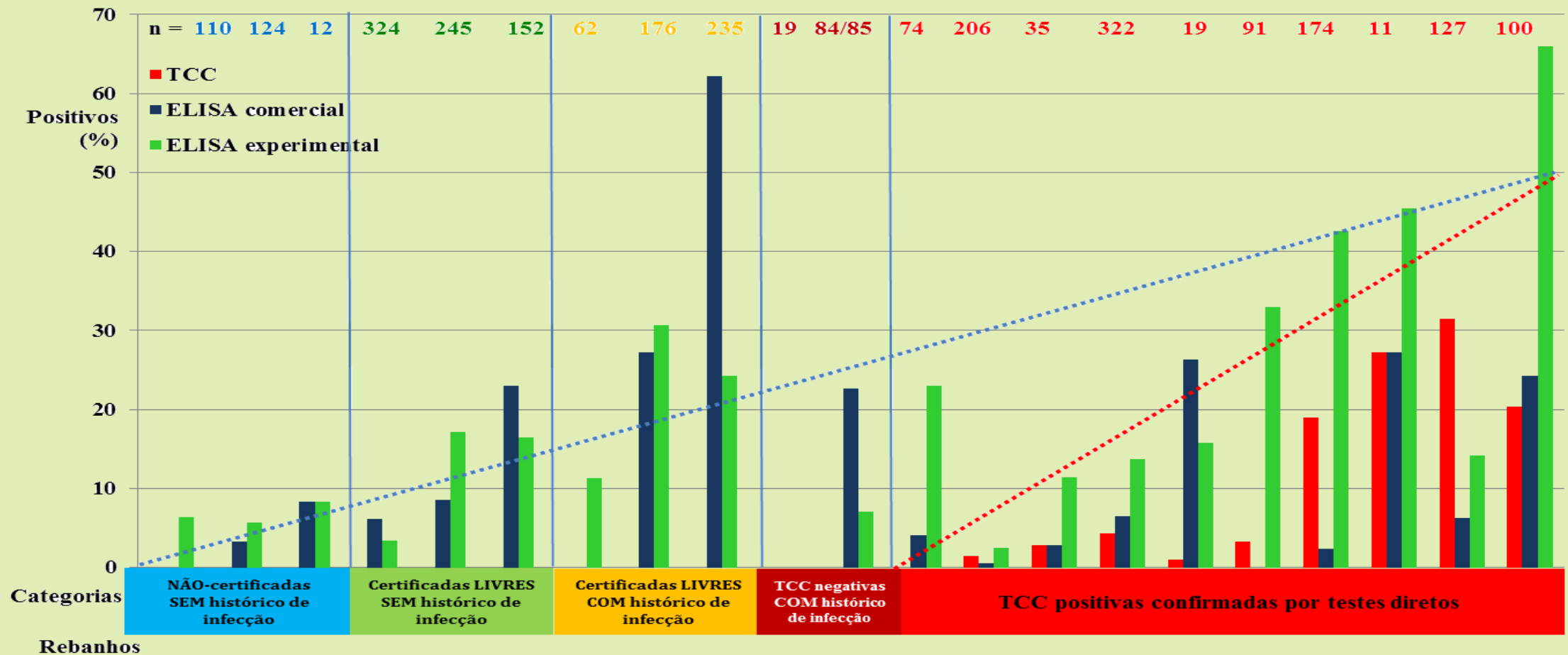


ELISA COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Resultados

- Concordância adequada com o teste intradérmico;
- 83,2% de sensibilidade e 86,5% de especificidade.

ELISA COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES

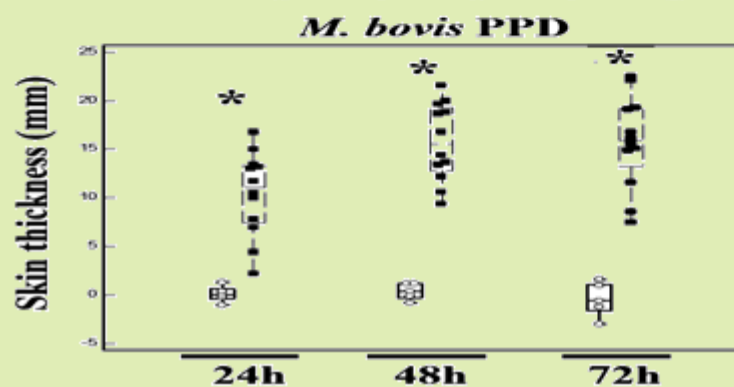
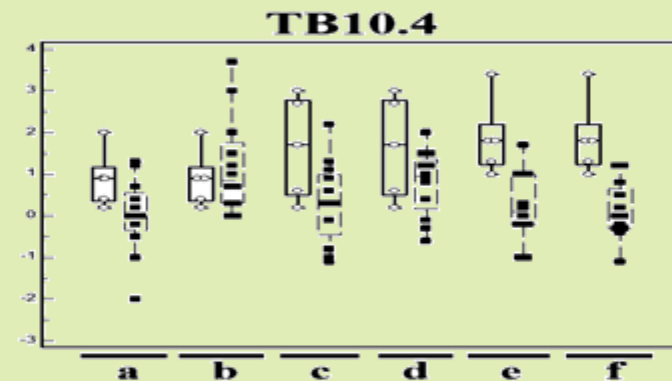
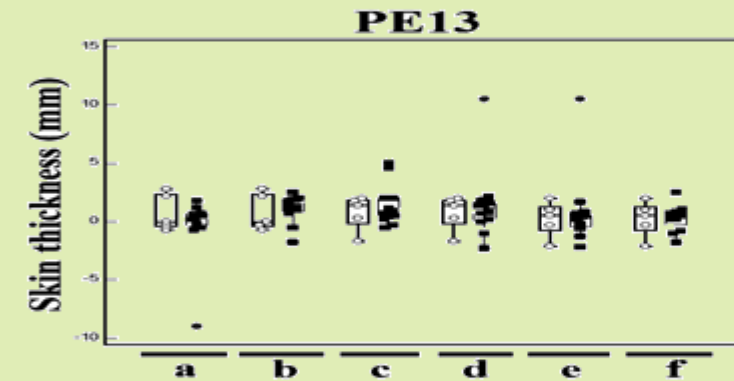
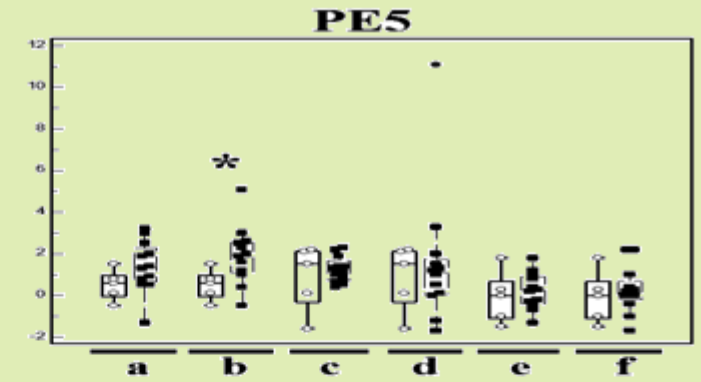
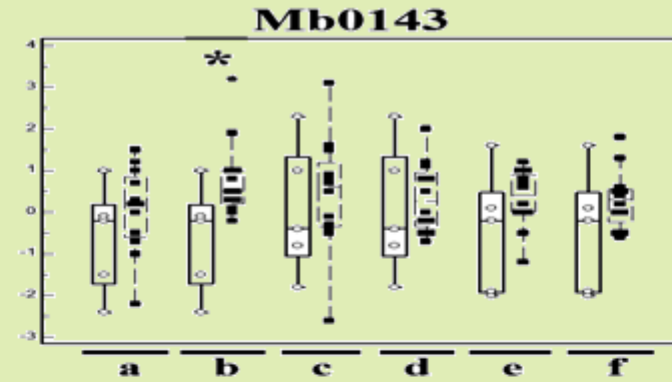
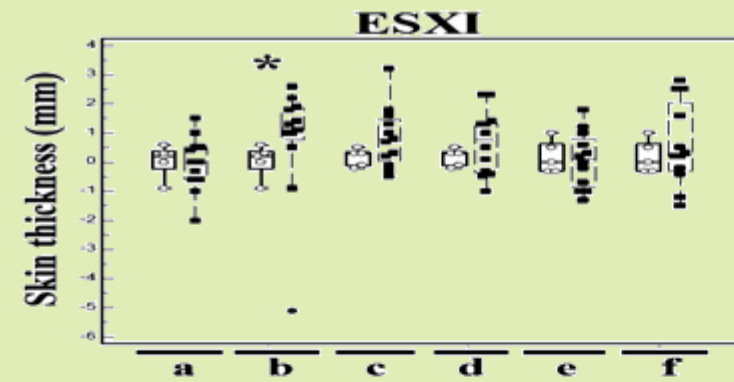


2703 amostras de soro (RS)
ELISA comercial – Idexx
ELISA experimental: Embrapa

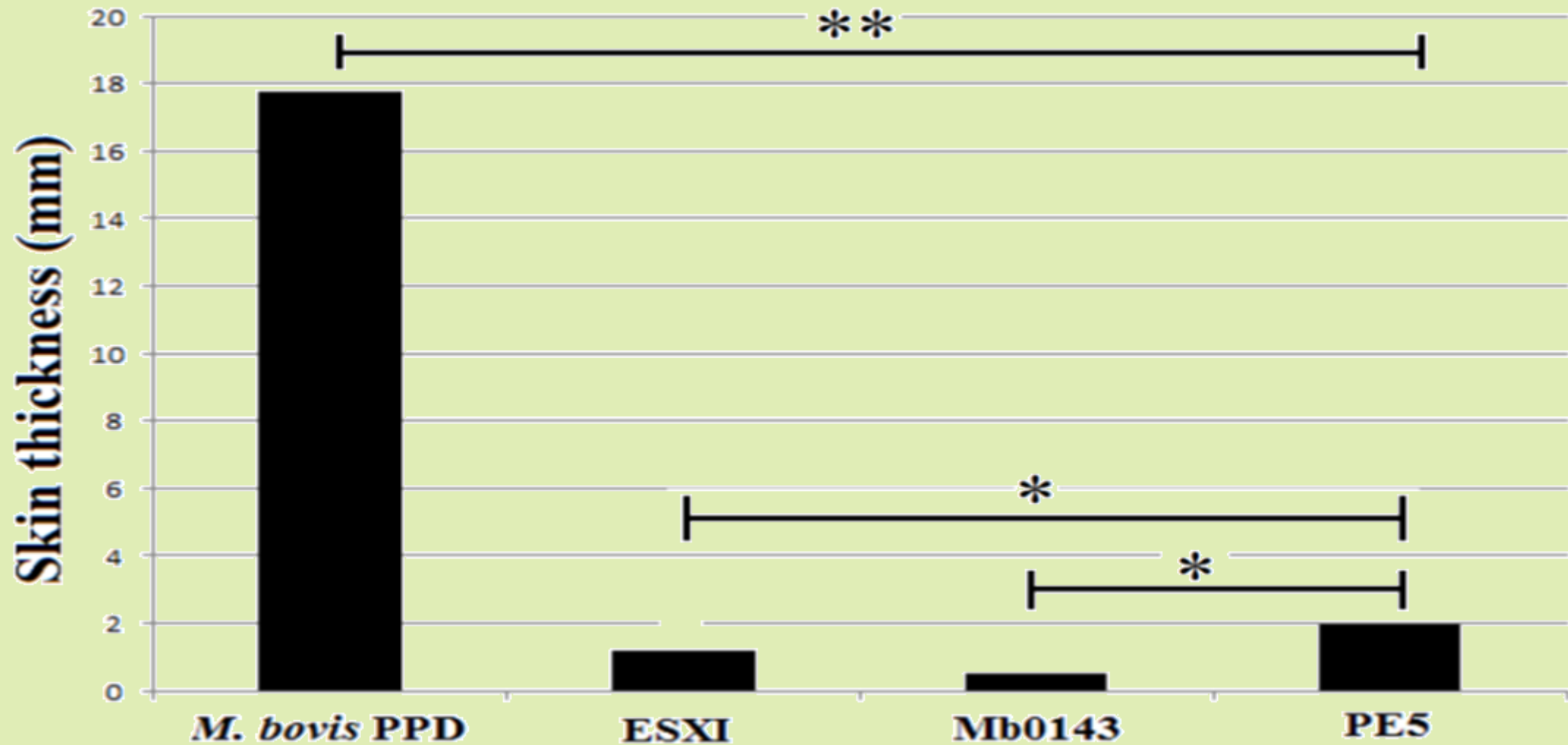
PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM TESTES INTRADÉRMICOS

- Bovinos de rebanho livre de *M. bovis*;
- 24 animais - AN5 inativada (10 mg);
- 5 animais – salina;
- Proteínas recombinantes - MB0143, PE5, PE13, TB10.4.

PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM TESTES INTRADÉRMICOS

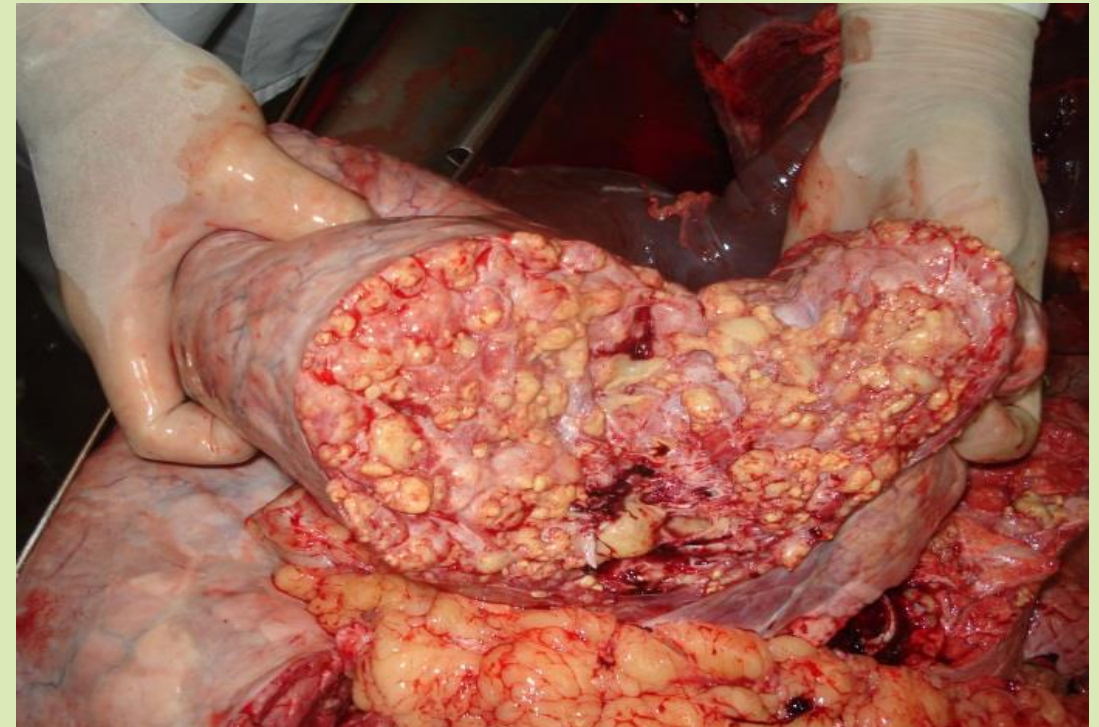


PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM TESTES INTRADÉRMICOS

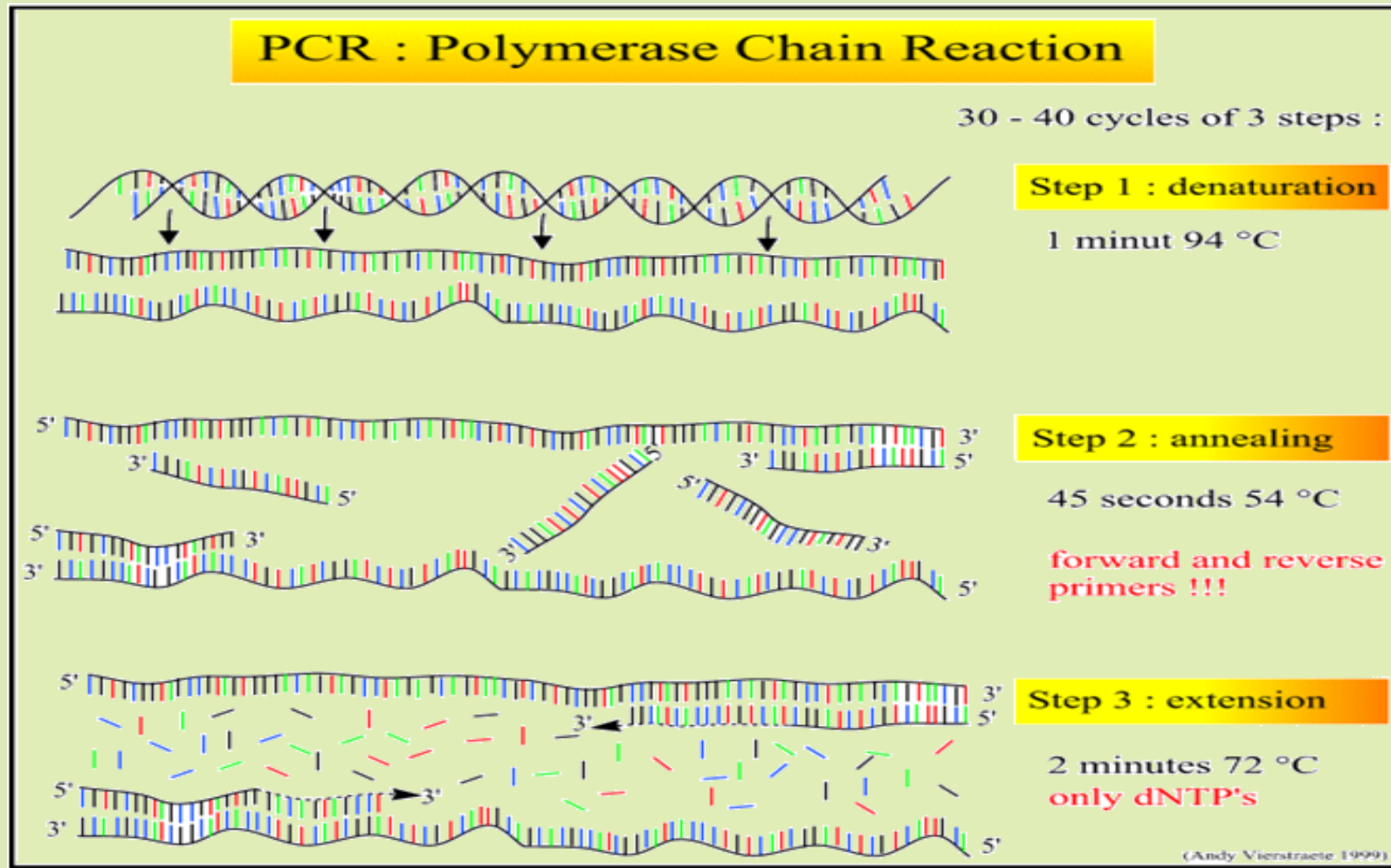


DETECÇÃO MOLECULAR DA TUBERCULOSE

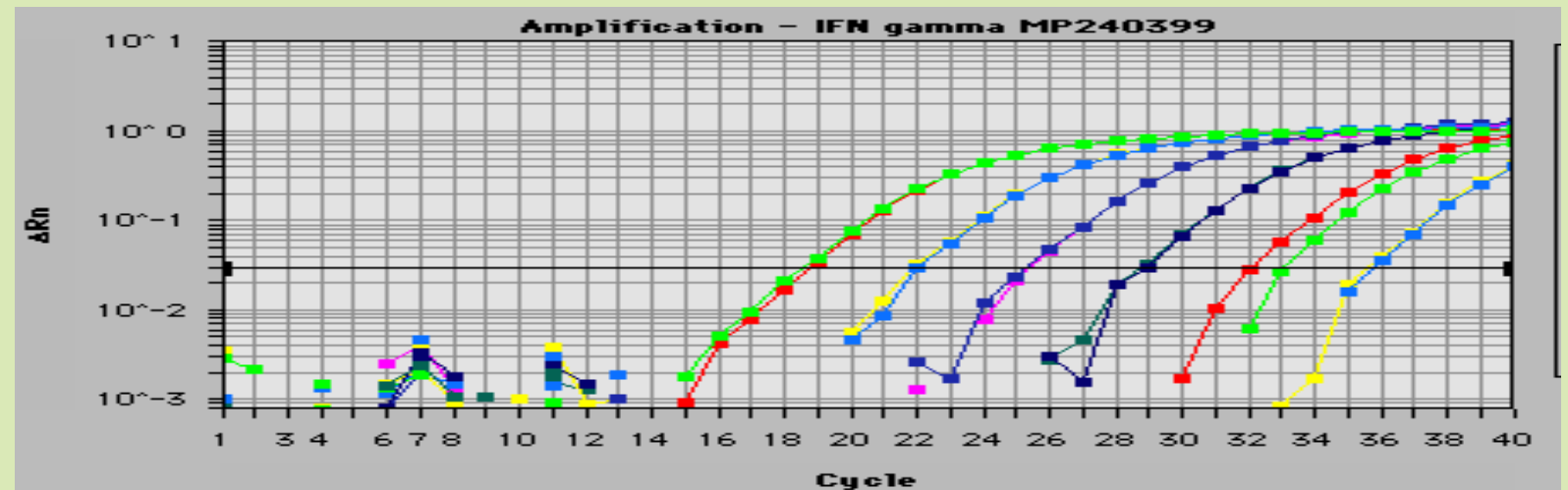
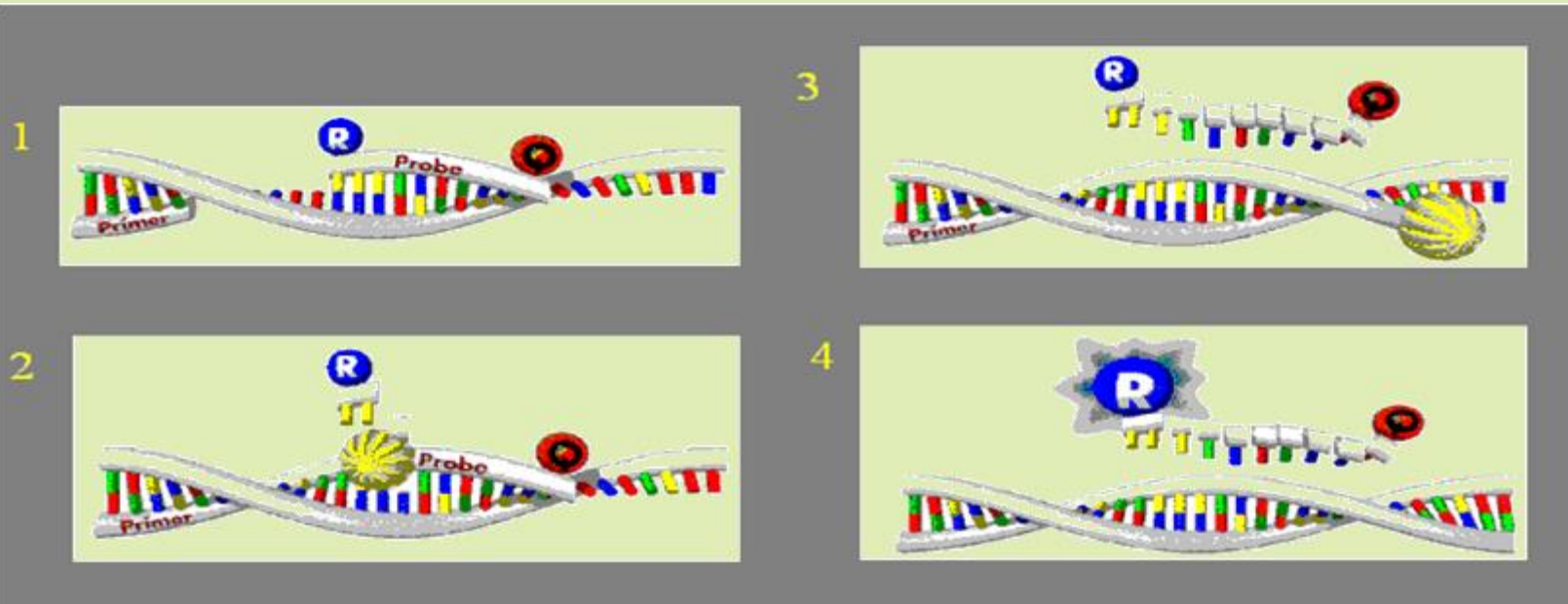
- União aduaneira – identificação etiológica de lesões sugestivas de tuberculose;
- 2012 – proibição de exportações de carne de propriedades com tuberculose/brucelose;
- Cultura - 90 dias;
- Necessidade de uma prova rápida.



REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR) CONVENCIONAL



PCR EM TEMPO REAL



NESTED-PCR PARA TUBERCULOSE

Região alvo

- TbD1;
 - Gene *mmpS6*;
 - Região 5' de *mmpL6*.;
 - Presente em *M. bovis* (incluindo cepas de BCG), *M. africanum*, *M. canettii* e isolados ancestrais *M. tuberculosis*;
 - Em linhagens modernas de *M. tuberculosis*, *mmpS6* está ausente e *mmpL6* é truncado.

NESTED-PCR PARA TUBERCULOSE

	70	80	90	310	320	330	340	350	360	510	520	530	540
Primers_Probe	---	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	---	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	TCGCGCAAGGCGA	AGCAATTCCATCGGCTGC	---	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA		
Mb_AF2122/97	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB_AN5	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB09-1192_11	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB09-1193_11	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB534_11	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB04-303_11	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB05-566_11	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB05-567_11	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB09-1191_11	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB18-08C	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB45-08B	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB05-566	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB0822-11	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB35	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB50	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB08-08BF2	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB49-09	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB32-08	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB61-09	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB_Pasteur_1173	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB_Tokyo_172_BC	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB_Moreau_RDJ_B	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB_Mexico_BCG	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MB_Korea_1168P_	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MT_TbD1	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MC_CIPT_1400700	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MC_CIPT_1400600	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	
MA_GM041182	GTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTAT	CGG	CCC	GCGGTCCT	CGCCAATGTT	GTCGCGCAAGGCGA	CAGCAATTCCATCGGCTGC	TTG	CTGTTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA	

NESTED-PCR PARA TUBERCULOSE

Especificidade analítica

M. tuberculosis H37Rv: sem amplificação;

Cepas clínicas de *M. tuberculosis*: sem amplificação;

M. abscessus: sem amplificação;

M. avium: sem amplificação;

M. fortuitum: sem amplificação;

M. gordonae: sem amplificação;

M. kansasii: sem amplificação;

M. smegmatis: sem amplificação;

Corynebacterium pseudotuberculosis: sem amplificação;

Rhodococcus equi: sem amplificação.

NESTED-PCR PARA TUBERCULOSE

Sensibilidade analítica

Detecção de DNA de *M. bovis* AN5 até:

1,56 ng por PCR convencional;

97,6 pg na PCR tempo real;

1,53 pg na nested-PCR.

- 50 amostras de DNA (de cultivo) isoladas a partir de lesões de animais naturalmente infectados com *M. bovis* do Ministério da Agricultura – LANAGRO: 49 (98%) foram positivas ;
- 42 amostras de DNA isoladas de culturas de *M. bovis* do Instituto Biológico, São Paulo: 42 positivas (100%).

NESTED-PCR PARA TUBERCULOSE

Status		Total	Cultura(%)	Nested-PCR (%)	P	OR para cultura+	OR para nested-PCR+
<i>Ante-mortem</i>	<i>Post-mortem</i>						
TCC-	SLV	51	1 (1.96) a	0 (0.00) a	1.00	1.00 A	1.00 A
Sem TCC	LCT	51	11 (21.57) a	21 (41.18) b	< 0.05	13.75 B	72.61 B
TCC+	SLV	47	11 (23.40) a	17 (36.17) a	0.17	15.27 B	59.10 B
TCC+	LCT	80	50 (62.50) a	49 (61.25) a	1.00	83.33 C	161.86 C
Total		229	73 (31.87)	87 (37.99)	0.087	-	-

TCC = Teste cervical comparativo

LCT = Lesão compatível com tuberculose

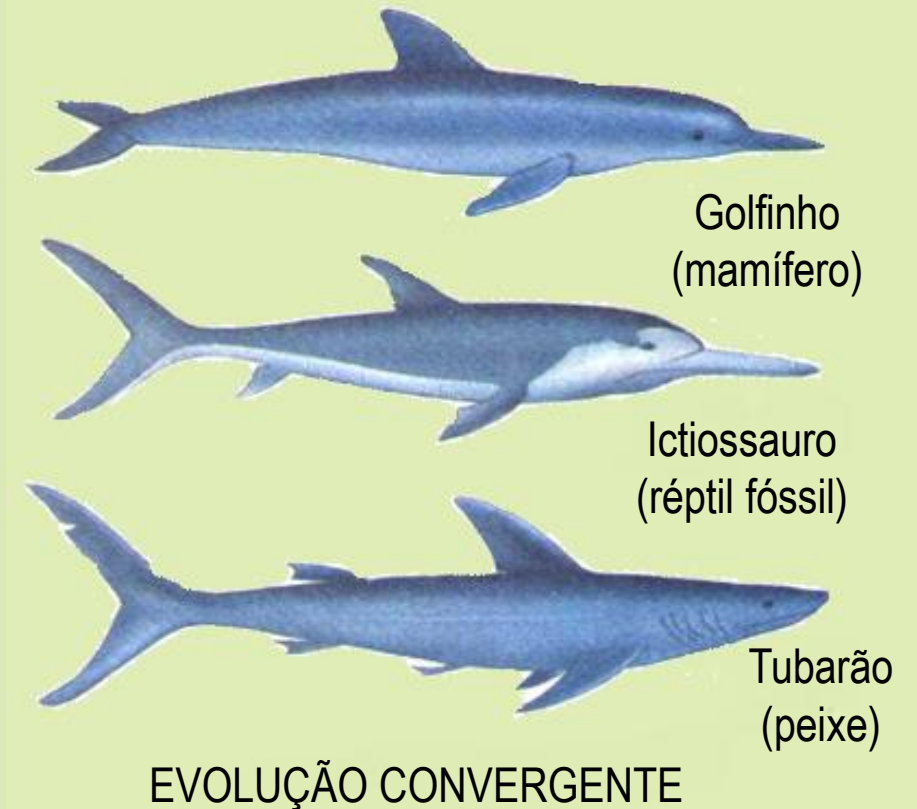
SLV = Sem lesões visíveis

ANÁLISE GENÔMICA

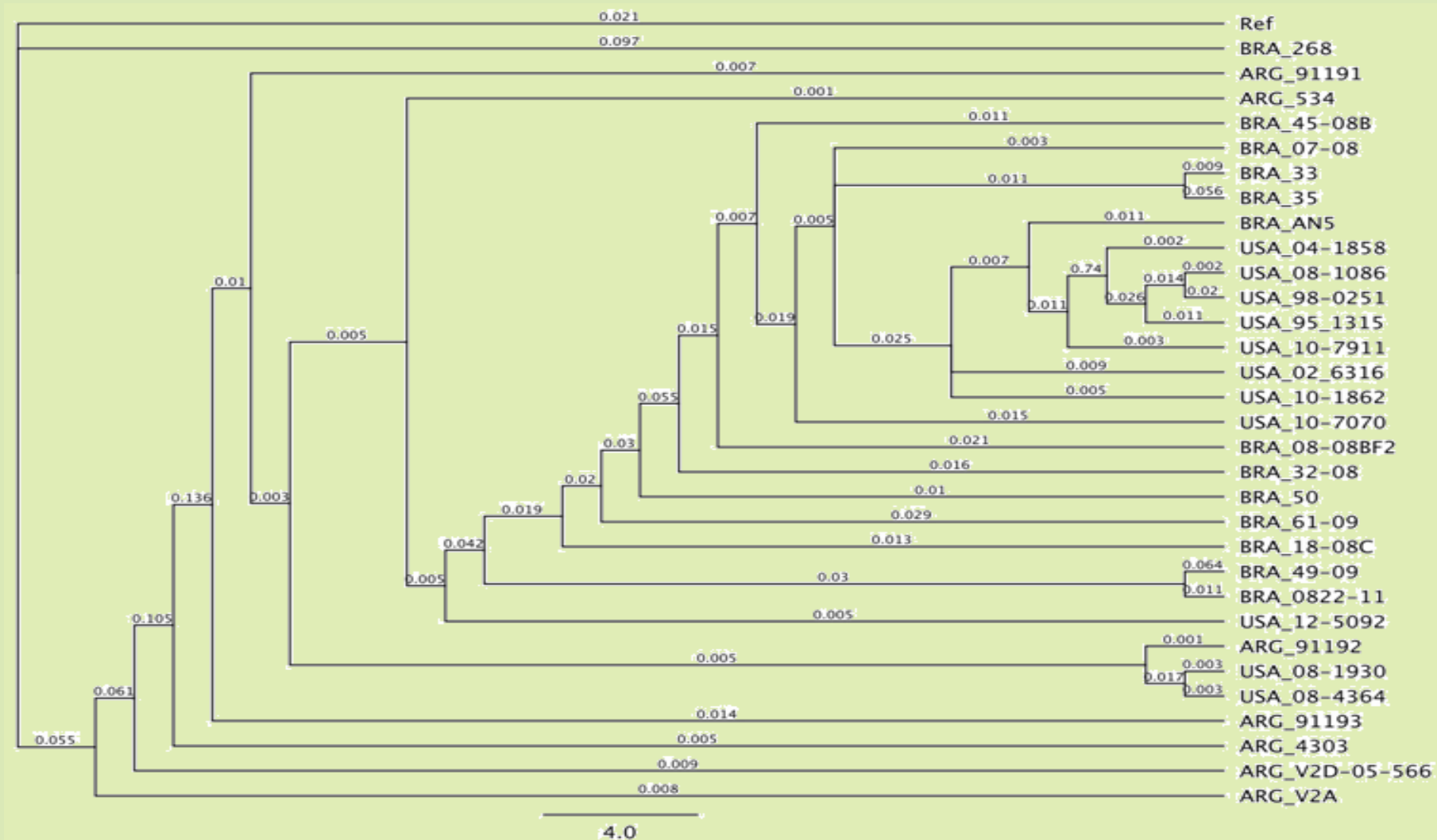
- Projeto em colaboração com o Instituto Biológico, LANAGRO, UFMS, USP, INTA (Argentina) e NADC/USDA (EUA);
- Diversidade de isolados das Américas do Sul e Norte;
- Prospeção de alvos para diagnóstico molecular.

ANÁLISE GENÔMICA

- Complexo *M. tuberculosis* tem baixa diversidade genética
- Marcadores comumente utilizados possuem baixo poder discriminativo
- Problema da evolução convergente
 - *Spoligotyping*
 - *MIRU*

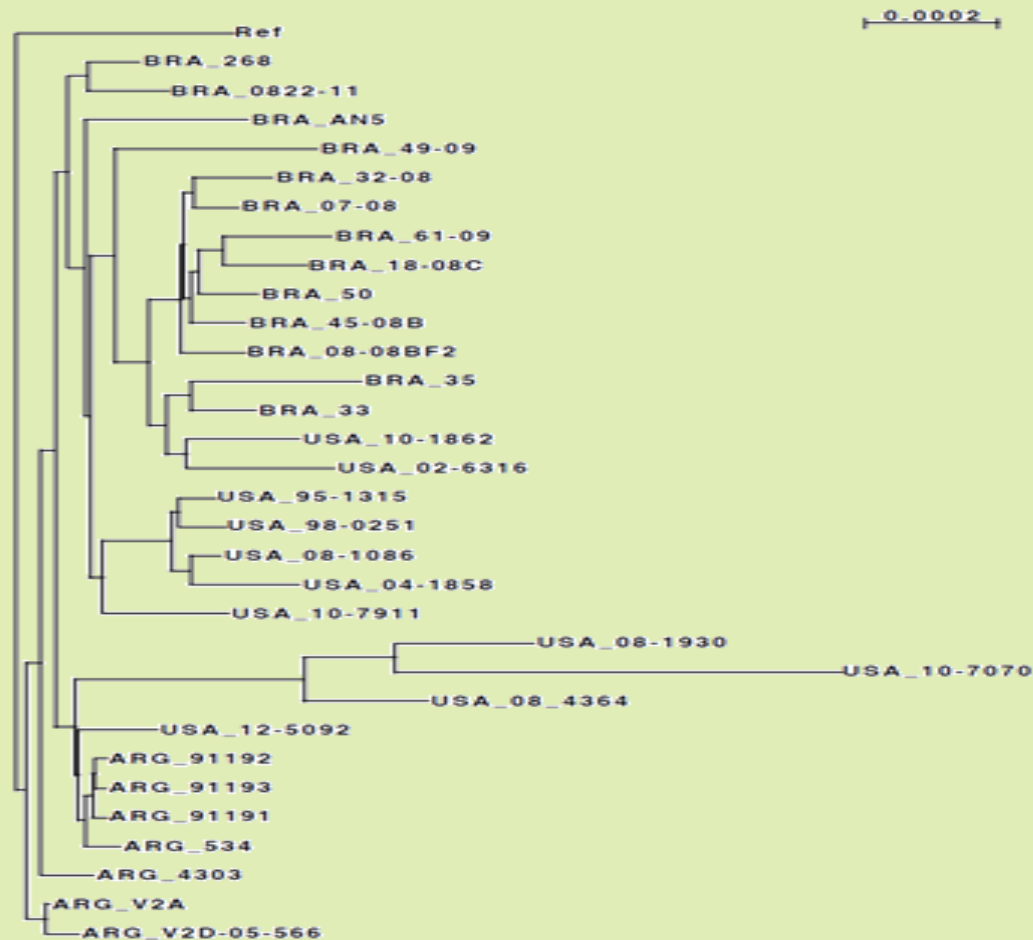


Polimorfismos de sítio único



ANÁLISE GENÔMICA

Genes codificantes para famílias de proteínas com ortólogos de cópia única





**O diagnóstico e controle da tuberculose bovina é um caminho
difícil ...**



...mas há momentos na vida em que não há nada a fazer, senão seguir em frente.



Obrigado.



Flávio Ribeiro de Araújo
Pesquisador da Embrapa Gado de Corte



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

