

Reunião da Rede TB – 23/05/2011

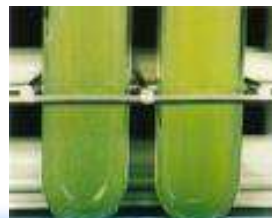
ÁREA VETERINÁRIA



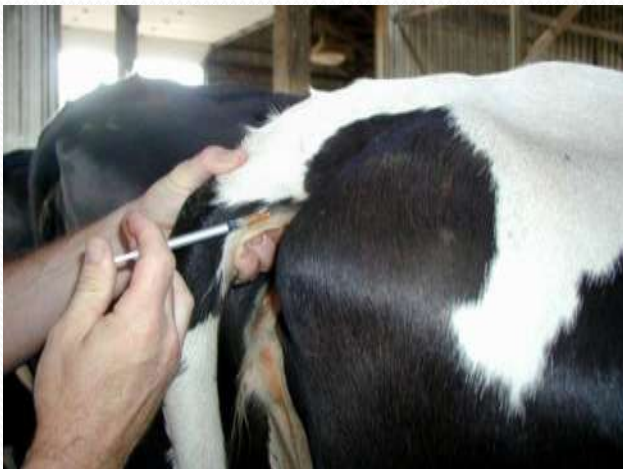
Odir Dellagostin (UFPel)
Walter Lilenbaum (UFF)

Tuberculose Bovina

- Prevalência média nacional de 1,3%;
- Perdas de 10 a 20%;
- Impedimento à exportação;
- Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose



Teste de tuberculina na prega caudal (TPC)



- Tuberculina (Derivado Protéico Purificado – PPD) é injetada via intradérmica na prega caudal.
- A leitura é feita 72 horas mais tarde.
- Aumento de volume significa resultado positivo.

Tuberculina cervical comparada (TCC)



Limitações do teste de tuberculina

- **Baixa especificidade**
- Sujeito a fraudes
- 72 horas para leitura
- Ocorrência de animais anérgicos

“o MAPA pretende atualizar e melhorar o padrão de diagnóstico, à medida que novos e melhores testes forem surgindo”



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Tuberculosis

journal homepage: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/tube>



BOVINE TUBERCULOSIS

Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS

Sibele Borsuk^{a,c}, Jane Newcombe^{b,c}, Tom A. Mendum^b, Odir A. Dellagostin^a, Johnjoe McFadden^{b,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^b School of Biomedical and Life Sciences, University of Surrey, Guildford, GU2 7XH Surrey, UK

Proteínas com potencial para uso no diagnóstico de TB bovina

Identificação	Gene	Tamanho do gene (pb)	Massa molecular (kDa)	Função
Rv2169	-	405	134	Provável proteína transmembrana conservada
Rv2970	<i>lipN</i>	1131	376	Provável lipase/esterase
Rv3276c	<i>purK</i>	1290	430	ATPase envolvida na biossíntese de purinas
Rv0130	<i>htdZ</i>	456	151	Provável 3-hidroxil-tioester desidratase
Rv1030	<i>kdpB</i>	2130	709	ATPase envolvida no transporte de potássio
Rv0485	-	1317	438	Proteína reguladora envolvida no mecanismo transcricional
Rv1857	<i>modA</i>	786	261	Proteína envolvida no transporte ativo de molibdênio

Trabalhos em andamento

- Clonagem e expressão heteróloga das principais proteínas encontradas EXCLUSIVAMENTE no PPD bovino
- Avaliação destas proteínas (*pool*) como um PPD recombinante
- Seleção preferencial de antígenos ausentes na cepa vacinal (BCG)

Avaliação de Novos Métodos de Diagnóstico no Monitoramento da Tuberculose Bovina no Brasil

Coordenador: Walter Lilenbaum

Universidades e instituições associadas:

Universidade Federal Fluminense - UFF

Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Química e Instituto de Microbiologia

Universidade Federal de Pelotas

Universidade de Cuiabá

Objetivos

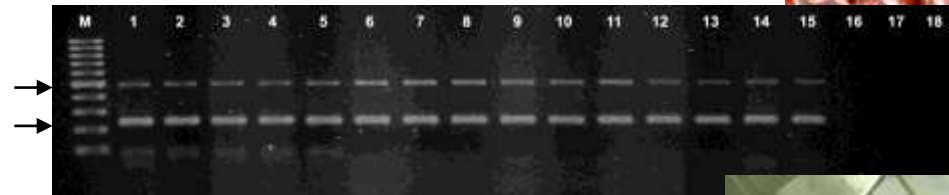
Avaliar e comparar:

- Métodos de tuberculinização simples e comparativa clássica com PPD padrão e com PPD recombinante;
- Imunoensaios do IFN- γ e do ELISA com multiantígenos purificados (quimeras ou combinados);
- Isolamento e caracterização molecular



Caracterização de amostras

- PCR multiplex;
- *Spoligotyping*;
- HPLC;
- MIRU-VNTR;



Inter-relações de Cooperação

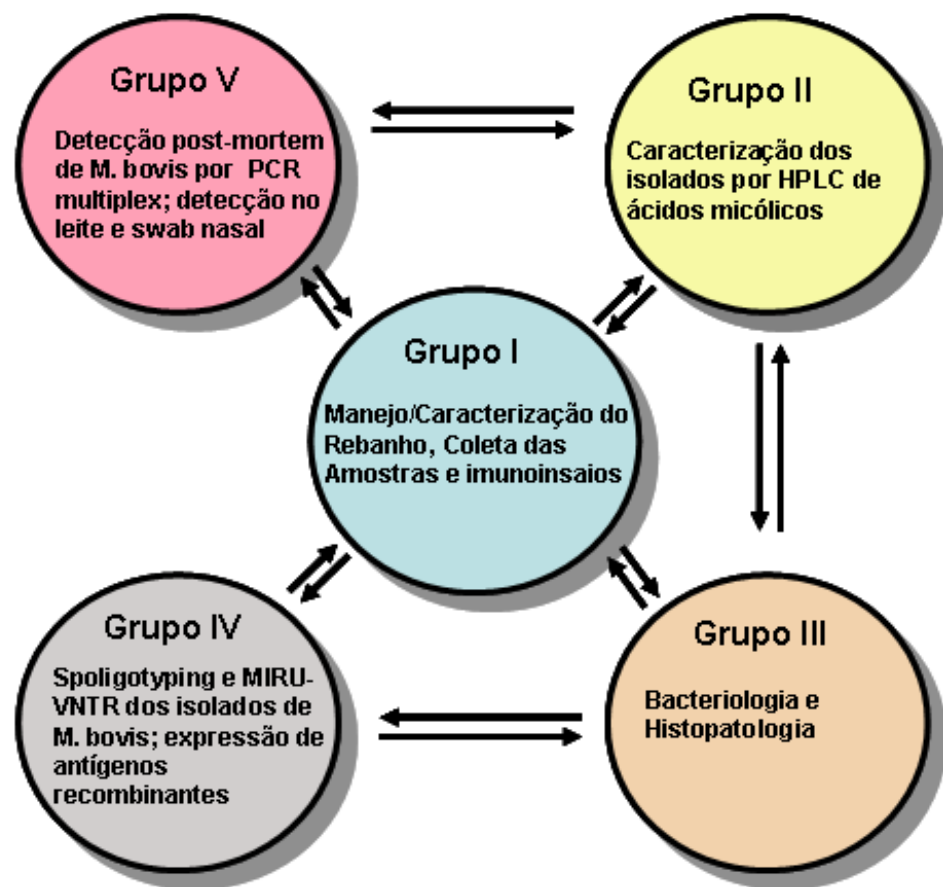
Grupo I – Coordenado pelo Dr **Walter Lilenbaum** (Faculdade de Veterinária da UFF). Responsável pelo trabalho de campo, testes imunológicos, articulação com veterinários e coordenação geral da pesquisa.

Grupo II – Coordenado pela Dra. **Vânia Margaret Flosi Paschoalin** (Instituto de Química da UFRJ). Responsável pela caracterização dos isolados por HPLC de ácidos micólicos.

Grupo III – Coordenado pela Dra. **Leila de Souza Fonseca** (Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Goes da UFRJ). Responsável pelo cultivo e identificação de micobactérias, histopatologia dos tecidos e auxílio na coordenação geral da pesquisa.

Grupo IV – Coordenado pelo Dr **Odir Antônio Dellagostin** (Universidade Federal de Pelotas). Responsável pelos testes de *spoligotyping* e MIRU-VNTR dos isolados de *M. bovis*.

Grupo V – Grupo emergente coordenado pela Dra. **Flavia Galindo Silvestre** (Hospital Geral Universitário da Universidade de Cuiabá - UNIC). Responsável pela detecção post-mortem de *M. bovis* por PCR multiplex e o diagnóstico da infecção pela análise molecular do leite e de swabs nasais.



Contribuições científicas esperadas

- Estabelecer padrões para o efetivo e mais completo diagnóstico da infecção, acelerando seu programa de controle;
- Conhecer aspectos epidemiológicos da doença;
- Promover competitividade do agronegócio em nível internacional;
- Oferecer produtos mais seguros á população brasileira.

Por que não se vacina
bovinos com BCG?

Porque a vacina interfere
com o teste de tuberculina!

BCG recombinante...

- Maior eficácia contra tuberculose bovina do que a cepa convencional
- Possibilidade de construção de uma **vacina multivalente**
- **Necessidade de um método capaz de diferenciar animal vacinado de infectado**

rBCG30 – Super expressão do Ag85B



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Vaccine 24 (2006) 1593–1600

Vaccine

www.elsevier.com/locate/vaccine

A novel live recombinant mycobacterial vaccine against bovine tuberculosis more potent than BCG

Marcus A. Horwitz*, Günter Harth, Barbara Jane Dillon, Saša Masleša-Galić

Department of Medicine, UCLA School of Medicine, University of California—Los Angeles, CHS 37-121, 10833 Le Conte Avenue, Los Angeles, CA 90095 1688, USA

Received 26 August 2005; received in revised form 30 September 2005; accepted 3 October 2005

Available online 11 October 2005

BCG - Anaplasmosose



Available online at www.sciencedirect.com



Vaccine 24 (2006) 6332–6339



www.elsevier.com/locate/vaccine

Immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing *Anaplasma marginale* MSP1a antigen

André Michelon^a, Fabricio Rochedo Conceição^a, Pedro Canisio Binsfeld^a,
Cristina Wetzel da Cunha^a, Ângela Nunes Moreira^a, Ana Paula Argondizzo^{a,b},
Douglas McIntosh^b, Geraldo R.G. Armôa^b, Adriano S. Campos^b, Marisa Farber^c,
Johnjoe McFadden^d, Odir Antônio Dellagostin^{a,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

^b Laboratory of Recombinant Technology, Bio-Manguinhos, Oswald Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Instituto de Biotecnología, CICV-INTA, Castelar, Argentina

^d School of Biomedical and Molecular Sciences, University of Surrey, Guildford, Surrey, UK

BCG - Babesiose



Available online at www.sciencedirect.com



Vaccine xxx (2006) xxx–xxx



www.elsevier.com/locate/vaccine

Mycobacterium bovis BCG as a delivery system for the RAP-1 antigen from *Babesia bovis*

M.P. Santangelo^a, D. McIntosh^b, F. Bigi^a, G.R.G. Armôa^b, A.S.D. Campos^b, P. Ruybal^a,
O.A. Dellagostin^c, J. McFadden^d, T. Mendum^d, B. Gicquel^e,
N. Winter^e, M. Farber^{a,*}, A. Cataldi^{a,*}

^a Institute of Biotechnology, CICVyA-INTA, Los Reseros y Las Cabañas, 1712 Castelar, Argentina

^b Laboratory of Recombinant Technology, Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Brazil

^d School of Biological Sciences, University of Surrey, UK

^e Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur, Paris, France

BCG - Leptospirose

Vaccine (2007) 26, 88–95

Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge

Fabiana Kömmling Seixas^a, Éverton Fagonde da Silva^a,
Daiane Drawanz Hartwig^{a,b}, Gustavo Maia Cerqueira^a,
Marta Amaral^{a,b}, Michel Quevedo Fagundes^a,
Robson Grando Dossa^a, Odir Antônio Dellagostin^{a,b,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário,
96010-900 Pelotas – RS, Brazil

^b Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, 96010-900 Pelotas – RS, Brazil



BCG recombinante...

Vaccine 27 (2009) 6495–6503



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Review

Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG

Reginaldo G. Bastos^a, Sibeles Borsuk^b, Fabiana K. Seixas^b, Odir A. Dellagostin^{b,*}

^a Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, WA 99164-7040, USA

^b Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas,

Novas “ferramentas”

Tuberculosis (2007) 87, 474–480

Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG

Sibele Borsuk^a, Tom A. Mendum^b, Michel Quevedo Fagundes^a,
Marcelo Michelon^a, Cristina Wetzel Cunha^a,
Johnjoe McFadden^b, Odir Antônio Dellagostin^{a,*}

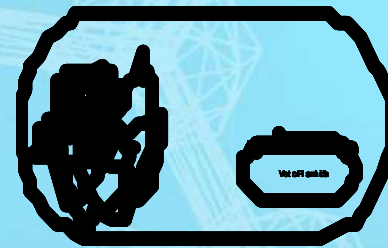
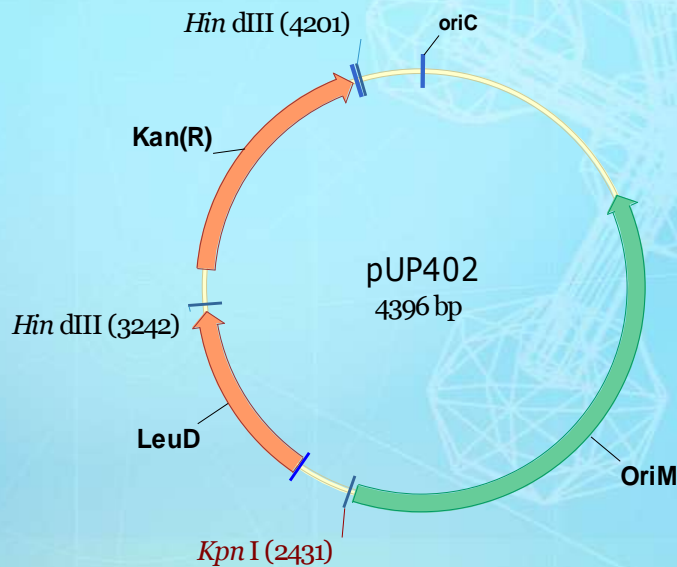
^aCentro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP-354, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

^bSchool of Biomedical and Life Sciences, University of Surrey, Guildford, Surrey, UK

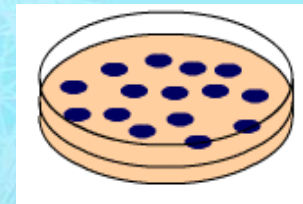


Vacina contra TB bovina

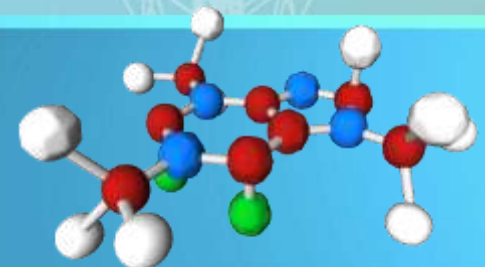
Obtenção de cepas de BCG recombinante super expressando o antígeno 85B



M. bovis BCG Δ *leuD*

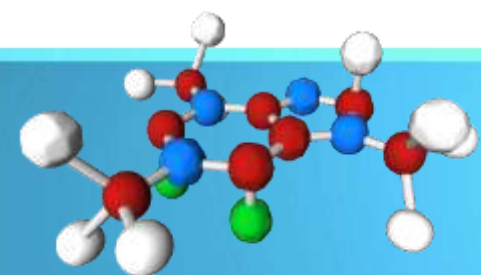
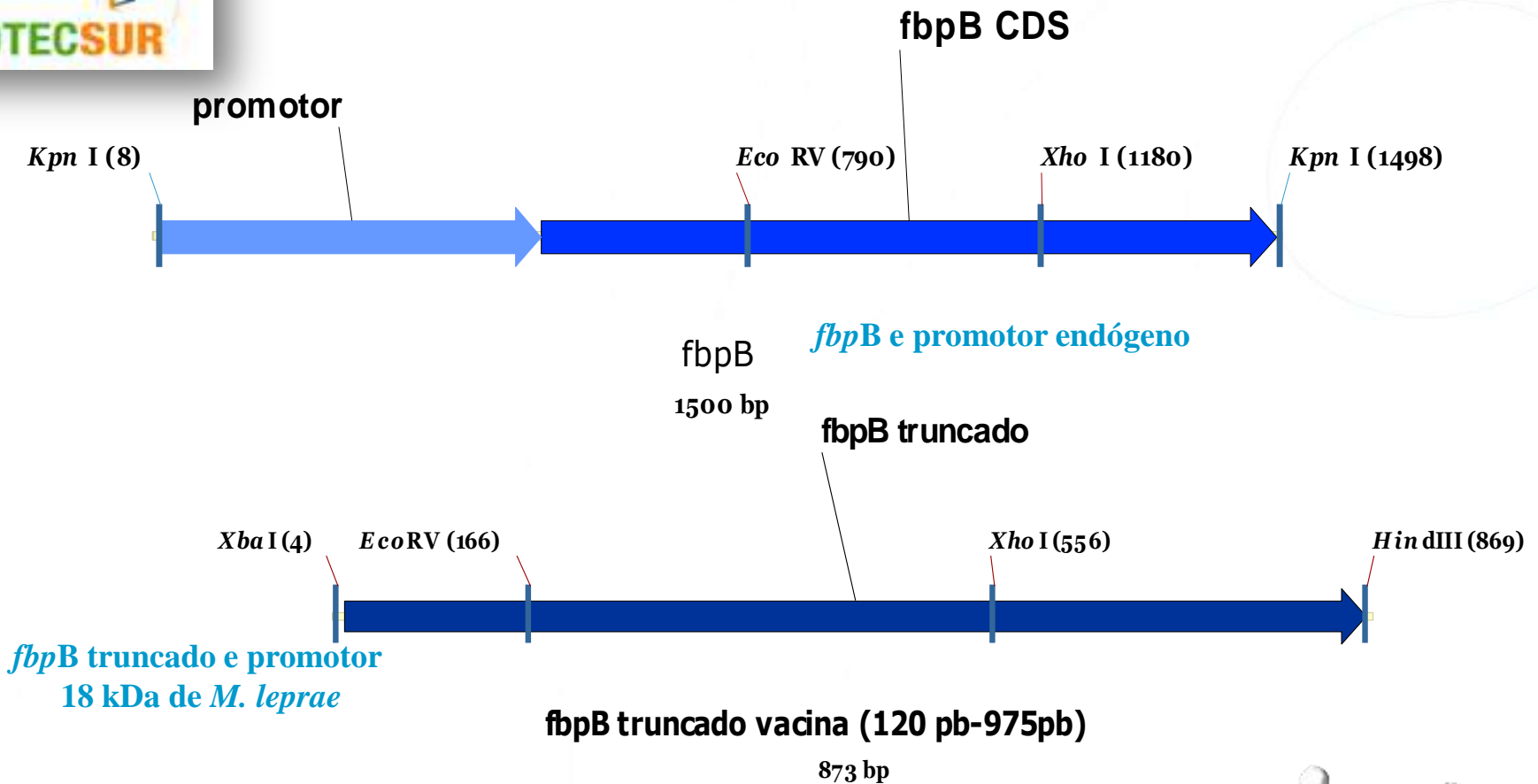


7H10



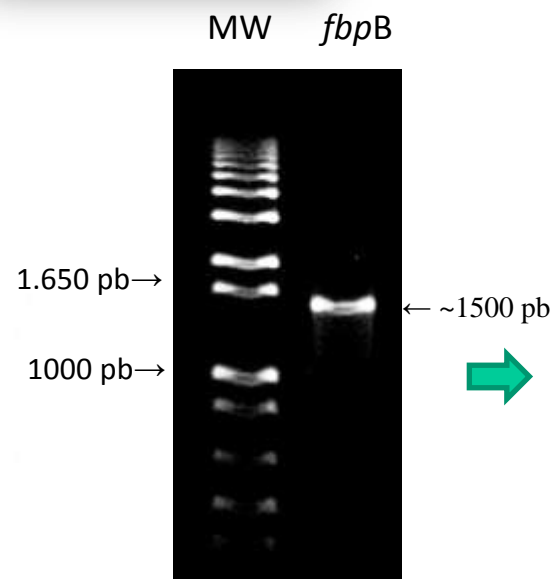


Vacinas BCG $\Delta leuD$

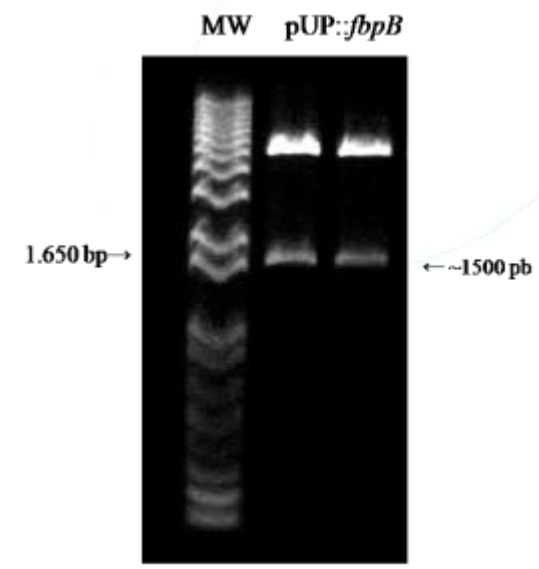
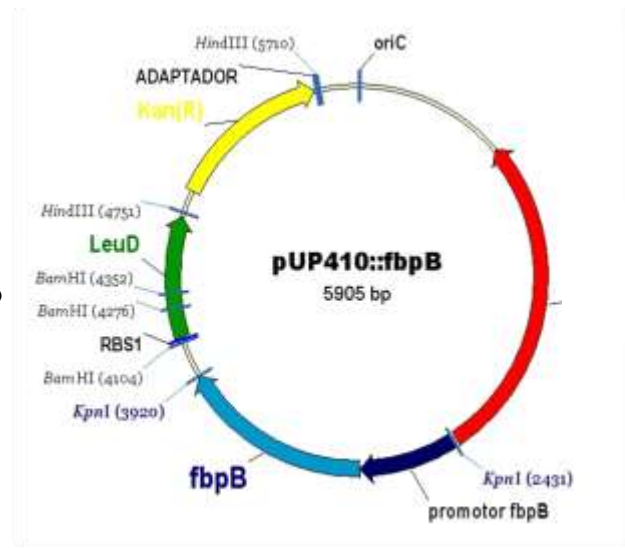


Construções para vacinas

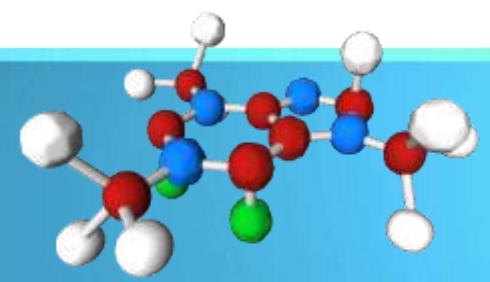
fbpB e promotor endógeno



Amplificação do gene *fbpB* + promotor endógeno por PCR



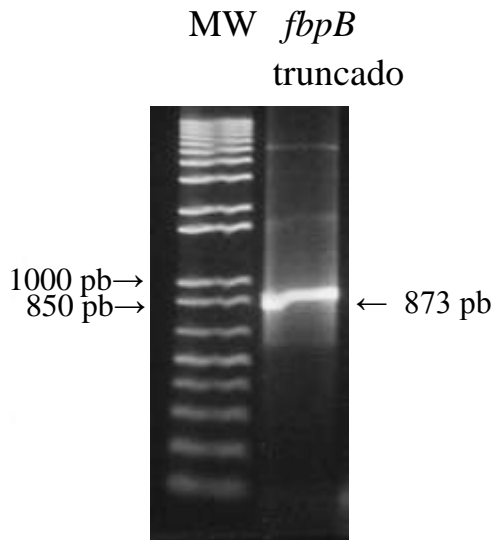
Clivagem dos clones recombinantes com *KpnI*



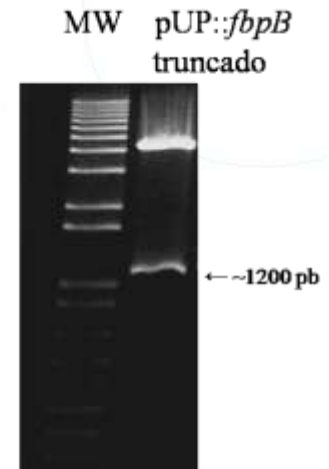
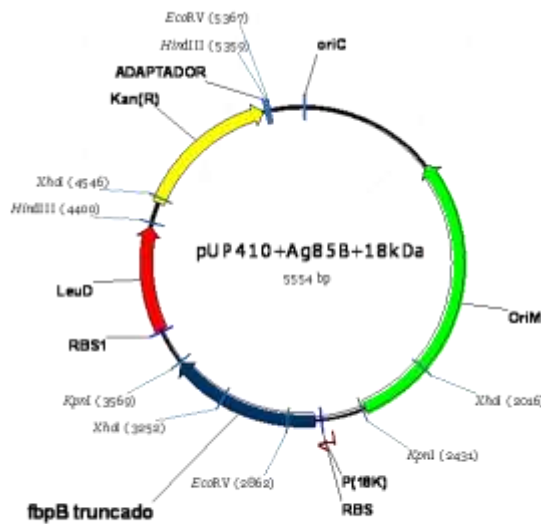


Construções para vacinas

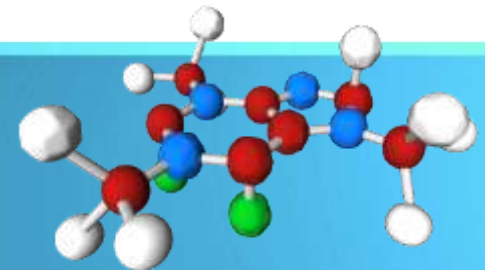
fbpB truncado e promotor 18 kDa de *M. leprae*



Amplificação do gene *fbpB* truncado por PCR



Clivagem com *XbaI* e *HindIII* para confirmação da clonagem



Colaboradores

UFPel – Centro de Biotecnologia

- Odir A. Dellagostin
- Sibeles Borsuk
- Fabiana K. Seixas
- Daniela Ramos
- Caroline Rizzi
- Daiane Hartwig
- Michel Fagundes
- André Grassmann

INTA - Argentina

- Angel Cataldi
- Marisa Romano
- Marisa Farber

University of Surrey

- Johnjoe McFadden
- Jane Newcombe
- Tom Mendum

FURG

- Pedro Almeida da Silva
- Carolina Felix

UFF

- Walter Lilenbaum
- Eduardo Figueiredo (UFRJ)



Muito obrigado!

Odir A. Dellagostin
odir@ufpel.edu.br