

MARCELO MALAGHINI

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Mycobacterium tuberculosis* PARA
AUXÍLIO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE**

**Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Processos Biotecnológicos,
Área de Concentração: Saúde Animal e
Humana, Setor de Tecnologia, Universidade
Federal do Paraná.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

Co-orientador: Dr. Christian Macagnan Probst

CURITIBA

2008

À minha família, especialmente aos meus filhos, à minha esposa e aos nossos pais, pelo carinho e presença constante sem os quais não seria possível a concretização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol, do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, orientadora desta tese, por seu constante estímulo e apoio, e cuja ética e visão de futuro seguirão comigo como uma referência de atuação profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, exemplo de excelência desta Instituição, pela oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger e ao Dr. Christian Macagnan Probst, pesquisadores do Instituto de Biologia Molecular do Paraná e co-orientadores desta tese, pela disponibilização desta Instituição para realização de passos fundamentais deste projeto e pelos conhecimentos transmitidos que ajudaram a nortear o trabalho.

À equipe de profissionais e estudantes do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, em especial, ao Biólogo Msc. Henrique Preti, pela valiosa colaboração em etapas cruciais desta empreitada.

À Prof.^a Dr.^a Marion Burger, do Instituto Pelé Pequeno Príncipe de Pesquisa e da Secretaria Municipal da Saúde, pela colaboração sempre espontânea e afável.

À equipe do Laboratório Central do Estado, em particular ao Prof. Marcelo Pilonetto, diretor, e a Farmacêutica-Bioquímica Sônia Regina Brockelt, responsável pelo Serviço de Diagnóstico da Tuberculose, pelo fornecimento de isolados clínicos.

À equipe de profissionais e estudantes do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Médico Veterinário Jessé Henrique Truppel, pela importante colaboração em etapas dos experimentos.

À equipe da Divisão de Antígenos do Instituto de Tecnologia do Paraná, em especial ao seu gerente, o Médico Veterinário Jorge Victor Bacila Agottani, e a sua subgerente, a Bióloga Tânia Regina Penha, por disponibilizar esta Instituição e pela espontânea colaboração em momentos fundamentais do projeto.

Aos colegas do Laboratório Frischmann Aisengart, especialmente à gerente de produção, Dra. Kazuko Koto, e à equipe do Setor de Biologia Molecular, pelo apoio e segurança proporcionados ao longo desta jornada.

Ao Estatístico Augustus Caesar Portella pelo auxílio na avaliação estatística dos resultados.

À Bióloga Dra. Samira Chahad Ehlers pela gentil colaboração para elaboração do resumo em língua inglesa.

Ao Perito Criminal Dr. Carlos Roberto Martins Lima, diretor do Instituto de Criminalística do Paraná, pelo apoio e confiança que permitiram a dedicação de tempo indispensável para realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Instituto de Criminalística do Paraná, em especial ao Prof. Dr. Renato Dall’Stella e ao Prof. Dr. Paulo Fontoura, pela confiança e apoio do início ao final desta caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular Forense pela paciência e compreensão, e, em especial, á Sr.^a Maria Madalena Tomen, pela valiosa colaboração durante período importante dos trabalhos experimentais.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS | viii |
| LISTA DE QUADROS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | xiv |
| RESUMO | xvi |
| ABSTRACT | xvii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 3 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 3 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 3.1 MICRORGANISMO E COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 4 |
| 3.2 TUBERCULOSE..... | 5 |
| 3.3 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DA DOENÇA | 6 |
| 3.4 TRANSMISSÃO | 9 |
| 3.5 EPIDEMIOLOGIA: SITUAÇÃO NO MUNDO, NO BRASIL E NO PARANÁ..... | 11 |
| 3.6 VARIABILIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS CIRCULANTES DE <i>M. tuberculosis</i> | 16 |
| 3.7 DIAGNÓSTICO | 18 |
| 3.7.1 História Clínica..... | 18 |
| 3.7.2 Baciloscopia..... | 19 |
| 3.7.3 Cultivo..... | 21 |
| 3.7.4 Exame Radiológico | 21 |
| 3.7.5 Teste Tuberculínico | 22 |
| 3.8 PROPRIEDADES IMUNOGÊNICAS DE ANTÍGENOS DE SECREÇÃO DE <i>M. tuberculosis</i> | 24 |

| | |
|--|----|
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4.1 CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i> | 29 |
| 4.1.1 Origem do Material Estudado..... | 29 |
| 4.1.2 Identificação..... | 29 |
| 4.1.3 Repique das Cepas e Crescimento em Meio Sólido..... | 30 |
| 4.1.3.1 Repique das cepas em meio nutriente ágar LJ..... | 30 |
| 4.1.3.2 Repique das cepas em meio nutriente Middlebrook..... | 31 |
| 4.1.4 Manutenção das Cepas em Laboratório e Revitalização..... | 31 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE <i>M. tuberculosis</i> | 31 |
| 4.2.1 Extração de DNA..... | 33 |
| 4.2.2 Leitura das Concentrações de DNA..... | 34 |
| 4.2.3 Procedimentos para Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ... | 34 |
| 4.2.4 Eletroforese e Detecção de DNA em Gel..... | 37 |
| 4.2.5 Análise dos Genótipos..... | 37 |
| 4.3 SELEÇÃO DE PROTEÍNAS DE SECREÇÃO DE <i>M. tuberculosis</i> , AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO..... | 38 |
| 4.3.1 Pesquisa e Seleção de Proteínas Candidatas para Produção de Antígenos Recombinantes..... | 40 |
| 4.3.2 Amplificação dos Genes..... | 41 |
| 4.3.3 Purificação dos Produtos de PCR Contendo o Sítio de Recombinação <i>attB</i> | 42 |
| 4.3.4 Clonagem em Sistema Gateway®..... | 52 |
| 4.3.4.1 Reação de recombinação BP e transformação de células competentes | 49 |
| 4.3.4.2 Confirmação dos clones de entrada..... | 50 |
| 4.3.4.3 Reação de recombinação LR e transformação de células competentes..... | 52 |
| 4.3.4.4 Obtenção e confirmação dos clones de destino..... | 53 |
| 4.3.5 Expressão das Proteínas..... | 53 |
| 4.3.6 Purificação das Proteínas..... | 55 |
| 4.3.6.1 Cromatografia por afinidade a metal imobilizado..... | 56 |
| 4.3.6.2 Eluição com imidazol e eletroforese..... | 58 |
| 4.3.6.3 Eletroforese SDS-PAGE em gel preparativo..... | 59 |

| | |
|--|----|
| 4.3.6.4 Eletroeluição | 59 |
| 4.3.6.5 Tratamento com Triton X-114..... | 60 |
| 4.3.6.6 Dosagem da concentração de proteína..... | 60 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES..... | 60 |
| 4.4.1 Avaliação da Imunidade Humoral por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)..... | 60 |
| 4.4.2 Avaliação da Imunidade Celular por Ensaio Biológico | 62 |
| 4.4.2.1 Preparação dos inóculos de <i>M. tuberculosis</i> para sensibilização de <i>Cavia porcellus</i> | 63 |
| 4.4.2.2 Sensibilização dos cobaios com inóculo de <i>M. tuberculosis</i> | 65 |
| 4.4.2.3 Preparo das diluições das proteínas recombinantes | 66 |
| 4.4.2.4 Provas de potência relativa | 67 |
| 5 RESULTADOS | 70 |
| 5.1 SUBCULTIVOS E BACILOSCOPIA DE COLÔNIAS DE <i>M. tuberculosis</i> | 70 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 71 |
| 5.2.1 Concentrações de DNA das Amostras..... | 71 |
| 5.2.2 Mixed-linker PCR DNA Fingerprinting..... | 72 |
| 5.3 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SECREÇÃO DE <i>M. tuberculosis</i> | 77 |
| 5.3.1 Seleção de Isolados Clínicos..... | 77 |
| 5.3.2 Amplificação e Purificação dos Genes | 77 |
| 5.3.3 Purificação dos Produtos de PCR | 80 |
| 5.3.4 Obtenção e Confirmação dos Clones de Entrada | 82 |
| 5.3.5 Obtenção e Confirmação dos Clones de Destino..... | 83 |
| 5.3.6 Expressão e Purificação das Proteínas..... | 85 |
| 5.4 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL: ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS RECOMBINANTES EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS..... | 92 |
| 5.4.1 Ensaio Imunoenzimático..... | 92 |
| 5.4.2 Análise Estatística dos Resultados..... | 96 |

| | |
|--|-----|
| 5.5 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR: BIOENSAIOS EM <i>C. porcellus</i> E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS..... | 98 |
| 5.5.1 Bioensaios – Provas de Potência Relativa | 98 |
| 5.5.2 Análise Estatística dos Resultados..... | 103 |
| 6 DISCUSSÃO | 108 |
| 6.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>M. tuberculosis</i> | 108 |
| 6.2 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNOGÊNICAS DE <i>M. tuberculosis</i> | 113 |
| 6.3 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES – RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR..... | 119 |
| 7 CONCLUSÕES | 125 |
| 8 PERSPECTIVAS | 127 |
| REFERÊNCIAS | 128 |
| ANEXO 1- RELAÇÃO DOS GENES SUBMETIDOS À AMPLIFICAÇÃO POR PCR E DAS RESPECTIVAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS | 140 |
| ANEXO 2- GÉIS DE ELETROFORESE COM IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 149 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| 1 RELAÇÃO DAS 25 PROTEÍNAS DE SECREÇÃO EM CULTURA DE <i>M. tuberculosis</i> SELECIONADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE SEUS REPECTIVOS GENES..... | 40 |
| 2 RELAÇÕES DOS ISOLADOS E DE SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES E RAZÕES DE ABOSORBÂNCIAS A 260 E 280 nm | 72 |
| 3 RELAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE IS6110 POR ISOLADO CLÍNICO DE <i>M. tuberculosis</i> | 73 |
| 4 RESULTADOS DE PCR PARA OS TRÊS ISOLADOS CLÍNICOS E 25 GENES SELECIONADOS | 79 |
| 5 RESULTADOS DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NA FASE DE TESTE E DE PRODUÇÃO | 86 |

| | | |
|---|---|-----|
| 6 | ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>M. tuberculosis</i> EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO..... | 94 |
| 7 | MÉDIA DE ABSORBÂNCIAS E DESVIO PADRÃO POR PROTEÍNA NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENO E DE SORO TESTADAS..... | 96 |
| 8 | RESULTADOS DO TESTE DE CONCORDÂNCIA ENTRE PPD PADRÃO E AS DIFERENTES PROTEÍNAS RECOMBINANTES TESTADAS ISOLADAMENTE E COMBINADAS, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES TESTADAS..... | 105 |
| 9 | DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS MÉDIO DE ENDURAÇÃO PRODUZIDOS EM DECORRÊNCIA DAS DIFERENTES PROTEÍNAS E CONCENTRAÇÕES TESTADAS..... | 107 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | NÚMERO DE CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE PULMONAR BACILÍFERO, TODAS AS FORMAS E COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA POR 100.000 HABITANTES NO ANO DE 2004 NAS 22 REGIONAIS DE SAÚDE NO PARANÁ..... | 16 |
| 2 | SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DO LINKER E NA AMPLIFICAÇÃO POR MIXED-LINKER PCR DNA FINGERPRINTING..... | 35 |
| 3 | RENDIMENTO DO PROCESSO DE CLONAGEM E EXPRESSÃO, EM CONCENTRAÇÃO, QUANTIDADE FINAL E PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES, APÓS DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO..... | 91 |
| 4 | RENDIMENTO INDIVIDUAL E ACUMULADO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DOS PROCESSOS DE AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNOGÊNICAS DE <i>M. tuberculosis</i> | 92 |
| 5 | RESULTADOS GERAIS DAS LEITURAS (EM MILÍMETROS) DOS TAMANHOS DAS ENDURAÇÕES RESULTANTES DAS INOCULAÇÕES INTRADÉRMICAS REALIZADAS EM <i>C. porcellus</i> SENSIBILIZADOS PREVIAMENTE COM <i>M. tuberculosis</i> | 101 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|---|---|----|
| 1 | NÚMERO ESTIMADO DE NOVOS CASOS DE TUBERCULOSE NO MUNDO EM 2005 | 13 |
| 2 | NÚMERO ANUAL DE CASOS NOVOS E DE ÓBITOS POR TUBERCULOSE NO BRASIL NOS ANOS DE 1995 A 2005 | 14 |

| | | |
|----|--|----|
| 3 | COEFICIENTES DE INCIDÊNCIA DE TUBERCULOSE NO ESTADO DO PARANÁ, NA REGIÃO SUL E NO BRASIL ENTRE OS ANOS 1993 E 2005 | 15 |
| 4 | REPRESENTAÇÃO DE MUNICÍPIOS SEGUNDO TAXA DE INCIDÊNCIA (POR 100 MIL HABITANTES) PARA TUBERCULOSE, NO ESTADO DO PARANÁ, EM 2005..... | 15 |
| 5 | DESENHO ESQUEMÁTICO DO ELEMENTO DE INSERÇÃO IS6110 DE <i>M. tuberculosis</i> , COM 1.355 BP, ILUSTRANDO OS PONTOS DE CORTE COM DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRIÇÃO..... | 18 |
| 6 | PREPARAÇÃO MICROSCÓPICA DE <i>M. tuberculosis</i> PELA TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN OBSERVADA NO AUMENTO DE 1000 X | 20 |
| 7 | ARVORE FILOGENÉTICA PARA A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS CFP-10/ESAT-6 DE <i>M. tuberculosis</i> | 26 |
| 8 | FLUXOGRAMA DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 33 |
| 9 | FLUXOGRAMA DOS PROCESSOS DE SELEÇÃO DE PROTEÍNAS DE SECREÇÃO, AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO..... | 39 |
| 10 | POSSIBILIDADES DE UTILIZAÇÃO DO SISTEMA GATEWAY® A PARTIR DA OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA CONTENDO O GENE DE INTERESSE | 44 |
| 11 | ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO BP DE FORMAÇÃO DO CLONE DE ENTRADA COM A SEQUÊNCIA DE INTERESSE | 45 |
| 12 | DESENHO ESQUEMÁTICO DO VETOR DOADOR pDONR TM 221 | 45 |
| 13 | ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO BP DE FORMAÇÃO DO CLONE DE ENTRADA COM A SEQUÊNCIA DE INTERESSE | 46 |
| 14 | ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO LR DE FORMAÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO COM A SEQUÊNCIA DE INTERESSE | 47 |
| 15 | DESENHO ESQUEMÁTICO DO VETOR DE DESTINO PLASMÍDEO pDONRTM17 | 48 |
| 16 | ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO LR DE FORMAÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO COM A SEQUÊNCIA DE INTERESSE | 49 |
| 17 | ESTRUTURA QUÍMICA DO Ni-NTA | 56 |
| 18 | LIGAÇÃO QUÍMICA DO Ni-NTA COM RESÍDUOS DE HISTIDINA..... | 57 |
| 19 | ESTRUTURA QUÍMICA DO IMIDAZOL E DA HISTIDINA | 58 |
| 20 | PESAGEM DE MASSA ÚMIDA DE <i>M. tuberculosis</i> CULTIVADAS EM MEIO SÓLIDO DE MIDDLEBROOK PARA PREPARO DO INÓCULO PARA SENSIBILIZAÇÃO DE <i>C. porcellus</i> | 63 |
| 21 | ROMPIMENTO DA MASSA ÚMIDA DE MICOBACTÉRIAS PARA PREPARO DO INÓCULO DE <i>M. tuberculosis</i> PARA SENSIBILIZAÇÃO DE <i>C. porcellus</i> | 64 |
| 22 | HOMOGENEIZAÇÃO DA DA MASSA ÚMIDA DE MICOBACTÉRIAS COM ÓLEO MINERAL E PEDRA POME PARA PREPARO DO INÓCULO DE <i>M. tuberculosis</i> PARA SENSIBILIZAÇÃO DE <i>C. porcellus</i> | 64 |

| | | |
|----|---|----|
| 23 | INÓCULO DE <i>M. tuberculosis</i> INATIVADO E ENVASADO PRONTO PARA SENSIBILIZAÇÃO DE <i>C. porcellus</i> | 65 |
| 24 | <i>C. porcellus</i> SENSIBILIZADOS COM CEPAS VIRULENTAS INATIVADAS DE <i>M. tuberculosis</i> | 66 |
| 25 | ANIMAL DEPOIS DE DEPILADO E EM FASE DE INOCULAÇÃO | 68 |
| 26 | REPRESENTAÇÃO DOS LOCAIS DE APLICAÇÕES EM <i>C. porcellus</i> . OITO REGIÕES DE APLICAÇÕES, IDENTIFICADAS PELAS LETRAS A a H | 69 |
| 27 | CRESCIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>M. tuberculosis</i> EM MEIO NUTRIENTE LÖWENSTEIN-JENSEN, APÓS 30 DIAS | 71 |
| 28 | CLASSIFICAÇÃO DOS ISOLADOS ANALISADOS QUANTO AO NÚMERO DE CÓPIAS DE IS6110..... | 74 |
| 29 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 75 |
| 30 | DENDROGRAMA MOSTRANDO AS CORRELAÇÕES ENTRE OS 62 ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> OBTIDOS A PARTIR DE PACIENTES ATENDIDOS NO ESTADO DO PARANÁ | 76 |
| 31 | PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO DE AMOSTRAS AMPLIFICADAS POR PCR EXEMPLIFICANDO PADRÕES DE RESULTADOS..... | 78 |
| 32 | PADRÃO ELETROFORÉTICO OBTIDO A PARTIR DOS PRODUTOS DE PCR ANTES (IMAGEM SUPERIOR) E APÓS (IMAGEM INFERIOR) PURIFICAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO COM PEG..... | 81 |
| 33 | PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA CONFIRMANDO A PRESENÇA DA SEQÜÊNCIA DESEJADA..... | 82 |
| 34 | PERFIL ELETROFORÉTICO DOS CLONES DE ENTRADA (pDONR) PURIFICADOS CONFIRMANDO AS SEQÜÊNCIAS DESEJADAS | 83 |
| 35 | PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA CONFIRMANDO A PRESENÇA DA SEQÜÊNCIA DESEJADA..... | 84 |
| 36 | PERFIL ELETROFORÉTICO DOS CLONES DE DESTINO (pDEST) PURIFICADOS CONTENDO AS SEQÜÊNCIAS DESEJADAS | 85 |
| 37 | PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) COM PROTEÍNAS EXPRESSAS..... | 87 |
| 38 | PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES APÓS PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE EM COLUNA DE NI-NTA E ELUIÇÃO POR IMIDAZOL..... | 88 |
| 39 | PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES APÓS PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE EM COLUNA DE NI-NTA E ELUIÇÃO POR IMIDAZOL..... | 88 |

| | | |
|----|---|-----|
| 40 | PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES APÓS PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE EM COLUNA DE NI-NTA E ELUIÇÃO POR IMIDAZOL..... | 89 |
| 41 | PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES APÓS PURIFICAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL PREPARATIVO E ELETROELUIÇÃO..... | 90 |
| 42 | ABSORBÂNCIA OBTIDA NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>M. tuberculosis</i> EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO, POR TESTE ELISA, COM OS SEGUINTE PARÂMETROS: CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO = 250 ng/POÇO; DILUIÇÃO DE SORO = 1:100; CTB = CONTROLE POSITIVO; NEG = CONTROLE NEGATIVO E DE REAÇÃO INESPECÍFICA | 95 |
| 43 | ABSORBÂNCIA OBTIDA NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>M. tuberculosis</i> EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO, POR TESTE ELISA, COM OS SEGUINTE PARÂMETROS: CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO = 1.000 ng/POÇO; DILUIÇÃO DE SORO = 1:100; CTB = CONTROLE POSITIVO; NEG = CONTROLE NEGATIVO E DE REAÇÃO INESPECÍFICA. | 95 |
| 44 | MÉDIAS DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>M. tuberculosis</i> EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DE SORO TESTADA..... | 97 |
| 45 | MÉDIAS DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>M. tuberculosis</i> EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO TESTADA..... | 98 |
| 46 | REAÇÃO DE ENDURAÇÃO, PRODUZIDA NO LOCAL DE APLICAÇÃO DE ANTÍGENO DE <i>M. tuberculosis</i> . OS ASSINALAMENTOS FEITOS COM CANETA PARA RETROPOJETOR NO CENTRO E AO REDOR DO ERITEMA DELIMITARAM AS DIMENSÕES DA REAÇÃO E FACILITARAM AS LEITURAS | 100 |
| 47 | LEITURA DOS TAMANHOS DAS REAÇÕES DE ENDURAÇÃO EM <i>C. porcellus</i> PREVIAMENTE SENSIBILIZADOS COM <i>M. tuberculosis</i> 24 HORAS APÓS A INJEÇÃO | 100 |
| 48 | DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE DIÂMETRO MÉDIO DE ENDURAÇÃO E DE DESVIO PADRÃO DO PPD REFERÊNCIA E DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM COBAIOS <i>C. porcellus</i> PREVIAMENTE SENSIBILIZADOS COM <i>M. tuberculosis</i> | 102 |
| 49 | DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE DIÂMETRO DE ENDURAÇÃO PRODUZIDOS PELAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES INOCULADAS EM COBAIOS <i>C. porcellus</i> PREVIAMENTE SENSIBILIZADOS COM <i>M. tuberculosis</i> EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES | 103 |

| | | |
|----|---|-----|
| 50 | CORRELAÇÃO ENTRE DIÂMETRO DE ENDURAÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE INOCULADA | 106 |
| 51 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 150 |
| 52 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 151 |
| 53 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 152 |
| 54 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 153 |
| 55 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 154 |
| 56 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 155 |
| 57 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 156 |
| 58 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 157 |
| 59 | GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> | 158 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------|---|
| % | - Porcentagem |
| ≥ | - Maior ou igual |
| α | - Alfa |
| β | - Beta |
| γ | - Gama |
| ηg | - Nanograma |
| ηm | - Nanômetro |
| μg | - Micrograma |
| μL | - Microlitro |
| fmol | - Fentomol |
| pg | - Picograma |
| pmol | - Picomol |
| 6xHis | - Seis Resíduos Consecutivos de Histidina |
| A | - Adenina |
| AIDS | - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| BAAR | - Bacilo Álcool-Ácido Resistente |
| BCG | - Bacilo de Calmette e Guérin |
| C | - Citosina |
| CD4 | - Marcador de Membrana de Linfócitos T Auxiliares |
| CD8 | - Marcador de Membrana de Linfócitos T Citotóxicos |
| CFF | - Cultura Filtrada Fenolizada |
| CRPHF | - Centro de Referência Professor Hélio Fraga |
| CTAB | - Brometo de Cetiltrimetilamônio |
| DAN/TECPAR | - Divisão de Antígenos do Instituto de Tecnologia do Paraná |
| DNA | - Ácido Desoxirribonucléico |
| EDTA | - Ácido Etilenodiamonotetracético |
| FIND | - <i>Foundation for Innovative New Diagnostics</i> |
| FUNASA | - Fundação Nacional de Saúde |
| g | - Grama |
| G | - Guanina |
| HIV | - Vírus da Imunodeficiência Humana |
| IFN-γ | - Interferon Gama |
| IPTG | - Isopropil-β-D-Tiogalactopiranosídeo |
| kb | - Quilobase |
| LJ | - Löwenstein-Jensen |
| mL | - Mililitro |

| | |
|---------------|---|
| MS | - Ministério da Saúde |
| Ni-NTA | - Ácido Nitrilo Acético em Complexo de Níquel |
| OMS | - Organização Mundial de Saúde |
| pb | - Pares de Base |
| PCR | - Reação em Cadeia da Polimerase |
| PEG | - Polietilenoglicol |
| pH | - Potencial Hidrogeniônico |
| PNCT | - Plano Nacional de Controle da Tuberculose |
| PPD | - Derivado Protéico Purificado |
| rpm | - Rotações por Minuto |
| qsp | - Quantidade Suficiente Para |
| SDS-PAGE | - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio |
| SUS | - Sistema Único de Saúde |
| T | - Timina |
| TDR | - <i>Special Programme for Research and Trainnig in Tropical Diseases</i> |
| TE | - Tris e EDTA |
| TNF- α | - Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| TRIS | - Hidroximetilamônio Metanol |
| U | - Unidade |
| UFC | - Unidade Formadora de Colônias |
| UFPR | - Universidade Federal do Paraná |
| UVP | - Luz Ultravioleta Pulsada |
| v/v | - Volume / Volume |
| WHO | - <i>World Health Organization</i> |

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver reagentes de potencial auxílio diagnóstico de tuberculose, elaborados a partir de proteínas recombinantes obtidas por clonagem, expressão e purificação de antígenos de secreção de *Mycobacterium tuberculosis*. Para seleção de cepas que representassem a diversidade genética de linhagens circulantes de *M. tuberculosis* foi realizada a caracterização molecular, pela técnica de mixed-linker PCR DNA fingerprinting, de 62 isolados clínicos obtidos a partir de amostras de pacientes com diagnóstico de tuberculose, atendidos pelo Sistema Único de Saúde no Estado do Paraná. A análise demonstrou que o número de cópias do elemento de inserção IS6110, por isolado, variou de quatro a 13, com um número médio de 8,5. Não foram observados isolados com ausência de cópias do elemento IS6110. A análise filogenética agrupou os 62 isolados em três grupos distintos: o primeiro grupo com cinco cepas, o segundo com 19 e o terceiro, mais heterogêneo, com 38 isolados. Apenas dois isolados (3,2%) formaram um *cluster*, ou seja, apresentaram padrão de polimorfismo com similaridade maior que 95%. Tais achados sugerem um predomínio de desenvolvimento da doença por reativação da infecção latente em relação à transmissão exógena no Estado do Paraná. A partir destes resultados, foram selecionados três isolados, com baixa similaridade e representativos de cada genogrupos, para serem submetidos ao processo de clonagem molecular. Foram selecionados 25 genes codificantes de proteínas de secreção de *M. tuberculosis* em cultura, reconhecidamente envolvidas na produção de resposta imune celular ou humoral. Após amplificação por PCR, clonagem em sistema Gateway® e expressão em *Escherichia coli*, as proteínas expressas foram purificadas por cromatografia de afinidade a metais, eletroforese SDS-PAGE em gel preparativo, seguido de eletroeluição e remoção de endotoxinas com Triton X-114. Ao todo, sete proteínas recombinantes foram obtidas (ESAT-6, CFP10, TB10.3, TB10.4, MTSP11, MPT70, MPT83). A avaliação de resposta imune humoral às proteínas recombinantes produzidas foi realizada com testes ELISA. Todas as sete proteínas recombinantes avaliadas apresentaram valores de absorvância superiores ao nível de corte do controle negativo e de reação inespecífica. Destas, as proteínas recombinantes ESAT-6, TB10.3, MTSP11 e MP70 tiveram valores superiores à média do controle positivo. As proteínas MPT70 E MTSP11 foram as mais reativas com valores de absorvância em média três vezes superiores ao controle positivo. A resposta celular de reação de hipersensibilidade tardia em cobaias (*Cavia porcellus*) foi avaliada em comparação com o derivado protéico purificado (PPD) padrão. Todas as sete proteínas recombinantes testadas produziram reação positiva de endurecimento em teste intradérmico em cobaias previamente sensibilizados com *M. tuberculosis*. Quando aplicadas em conjunto, na concentração de 0,04 mg/mL, os resultados de intradermorreação em *C. porcellus* foram expressivamente superiores aos obtido pelo PPD padrão (p-valor=0,00386). De posse destes resultados são discutidas perspectivas de uso das proteínas recombinantes produzidas para auxílio diagnóstico da tuberculose.

ABSTRACT

The present work had the objective of developing reagents with diagnostics potential of tuberculosis, prepared with recombinant proteins obtained by cloning, expression and purification of secreted antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. For selection of strains representing the genetic diversity of circulating *M. tuberculosis*, a molecular characterization was performed by the mixed-linker PCR DNA fingerprinting technique on 62 clinic isolates from samples of patients diagnosed with tuberculosis and admitted by SUS of Paraná State, Brazil (Brazilian Centralized Health Service System). The analysis demonstrated that the number of copies of the IS6110 sequence per isolates varied from four to 13 bands, with an average number of 8.5. Isolates with no copies of the IS6110 element were not observed. The phylogenetic analysis grouped the 62 isolates by similarity into three different groups: the first group contained five strains, the second 19 and the third, a more heterogeneous group, contained 38 isolates. Only two isolates (3.2%) formed a cluster, in other words, they presented a pattern of polymorphism with similarity above 95%. Such findings suggest that in the State of Paraná illness predominantly develops through reactivation of the latent infection as opposed to exogenous transmission. From these results, three isolates were selected with low similarity and representing each genogroup to be subjected to the molecular cloning process. A number of 25 protein-coding genes of *M. tuberculosis* secretion during culture, known to be involved in the production of cellular or humoral immune response were selected. After PCR amplification, Gateway® cloning system and expression in *Escherichia coli*, the expressed proteins were purified by metal ion affinity chromatography, analysed by SDS-PAGE followed by electroelution and endotoxin removal using Triton X-114. A total of seven recombinant proteins were obtained (ESAT-6, CFP10, TB10.3, TB10.4, MTSP11, MPT70, MPT83). The evaluation of humoral immune response to the produced recombinant protein was performed by ELISA test. All the recombinant proteins presented absorbance values above the negative and the nonspecific reactivity control. Four proteins (ESAT-6, TB10.3, MTSP11 and MP70) showed values above those of the average of positive control. MPT70 and MTSP11 were the most reactive proteins with values of absorbance three-fold higher than those observed for positive control. The cellular response of the delayed type hypersensitivity reaction in guinea pigs (*Cavia porcellus*) was evaluated by comparing the gold standard purified protein derivative (PPD). All seven recombinant proteins tested produced positive induration reaction by intradermal injection tests in guinea pigs sensitized by *M. tuberculosis* beforehand. Combined in pool at a concentration of 0.04 mg/mL, the results of intradermoreaction in *C. pocellus* were expressively higher than those obtained by PPD gold standard (p-value=0.00386). Given these results, perspectives for the use of recombinant proteins for the diagnosis of tuberculosis are discussed.

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é um alarmante problema de saúde pública afetando cerca de um terço da população global. No Brasil, estima-se que a população infectada pelo seu principal agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis*, seja da ordem de 40 milhões de pessoas (WHO, 2006). Nas Américas, em 2005, foram notificados 157.000 novos casos de doentes com baciloscopia positiva, 50% dos quais no Brasil e no Peru. Atualmente, o Brasil ocupa a quinta posição no *ranking* de casos do continente americano e a décima quinta no *ranking* mundial (ORGANIZACIÓN PAN-AMERICANA DE LA SALUD, 2004).

O rápido e acurado diagnóstico da tuberculose são fundamentais no controle da doença. O derivado protéico purificado (PPD) é comumente utilizado para auxílio diagnóstico da tuberculose por intradermoreação. Todavia, o PPD, uma mistura bruta de centenas de antígenos protéicos e polissacarídeos obtidos a partir do filtrado de culturas de *M. tuberculosis*, carece de especificidade devido a freqüentes reações cruzadas contra antígenos presentes em micobactérias não patogênicas e em *Mycobacterium bovis* (bacilo de Calmette e Guérin – BCG), cepa com virulência atenuada empregada como vacina contra tuberculose no Brasil há várias décadas (LALVANI et al., 2001).

Muito embora a tuberculina PPD seja largamente empregada em nosso país para auxílio diagnóstico de tuberculose, não existe produção nacional até o presente. A tuberculina empregada no teste imunológico no Brasil, PPD RT23 produzido pelo *Statens Serum Institut* da Dinamarca e fornecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), era entregue gratuitamente para toda a rede pública brasileira desde 1963. A partir de 1984, passou a ser distribuído pelo Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF) da Fundação Nacional de Saúde (Funasa), que já chegou a fornecer 3 milhões de doses ao ano, sendo a média anual de consumo de 1 milhão de doses. No final de 1998, o fornecimento do produto ao CRPHF/Funasa ficou prejudicado por disputa jurídica da OMS com o

Instituto dinamarquês, que fora privatizado e estocava o material pertencente a OMS. No Brasil, a consequência foi a falta do produto na rede do Sistema Único de Saúde (DALL'STELLA, 2003).

DALL'STELLA et al. (2007) desenvolveram um bioprocesso de produção de PPD a partir de cepas autóctones de *M. tuberculosis*. Todavia, observa-se que o processo de produção é lento e envolve a manipulação de grandes quantidades de massa bacteriana com rigores de biossegurança, dada a patogenicidade do organismo.

Estudos visando apontar novos antígenos e epítomos em *M. tuberculosis* como candidatos para desenvolvimento de reagentes de diagnóstico para a tuberculose têm propiciado a identificação e caracterização de proteínas de secreção presentes em filtrados de culturas de *M. tuberculosis*. A comparação do genoma de *M. tuberculosis* com o *M. bovis* BCG e com outras micobactérias não patogênicas tem permitido a identificação de regiões genômicas codificantes específicas em *M. tuberculosis* (BEHR et al., 1999; PYM et al., 2002). Dessa forma, novos horizontes se apresentam ao campo da biotecnologia para produção de reagentes diagnósticos elaborados a partir de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*, aliando padronização de fabricação com facilidade de ampliação de escala de produção e maior especificidade no diagnóstico.

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de novos reagentes para auxílio diagnóstico da tuberculose a partir da clonagem molecular, expressão e purificação de proteínas de secreção de *M. tuberculosis*, ausentes em *M. bovis* BCG ou em micobactérias não patogênicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver reagentes de potencial auxílio diagnóstico de tuberculose, elaborados a partir de antígenos recombinantes obtidos por clonagem, expressão e purificação de proteínas imunogênicas de *M. tuberculosis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar molecularmente isolados clínicos de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes com tuberculose atendidos no Estado do Paraná, com base no estudo do elemento de inserção IS6110 pela técnica de mixed-linker PCR DNA fingerprinting.
- Selecionar isolados que representem a diversidade genética de linhagens circulantes de *M. tuberculosis* para a clonagem de antígenos de secreção de *M. tuberculosis*.
- Clonar, expressar e purificar proteínas imunogênicas de *M. tuberculosis* reconhecidamente envolvidas no desencadeamento de resposta imune humoral ou de hipersensibilidade do tipo tardio.
- Pesquisar, por meio de ensaios imunoenzimáticos, a presença de anticorpos contra as proteínas recombinantes em soro de coelhos hiperimunizados.
- Inocular os antígenos recombinantes, isoladamente e em combinações, em cobaios previamente sensibilizados e estudar os resultados das reações provocadas pelo produto por testes de potência, avaliando a equivalência das reações cutâneas em relação ao PPD padrão (SSI Rt23).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MICRORGANISMO E COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mycobacterium tuberculosis*, segundo BERGEY'S (1986), possui a seguinte posição sistemática:

Reino: Bacteria,
Filo: Firmicutes,
Classe: Actinobacteria,
Ordem: Actinomycetales,
Subordem: Corynebacterineae,
Família: Mycobacteriaceae,
Gênero: *Mycobacterium*
Espécie: *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* é o único da família Mycobacteriaceae, sendo constituído pelo complexo *M. tuberculosis* e mais de 80 espécies de micobactérias atípicas, incluindo espécies patogênicas, oportunistas e não patogênicas (SOINI; MUSSER, 2001).

O complexo *M. tuberculosis* inclui as espécies *M. tuberculosis*, responsável pela maioria dos casos de tuberculose humana; *M. bovis*, causador da doença em gado, eventualmente podendo acometer outros animais, inclusive o homem; a cepa atenuada *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guérin), utilizada para vacinação; *M. africanum*, um grupo heterogêneo de isolados responsáveis por tuberculose na África (METCHOCK et al., 1999). *M. microti*, um patógeno isolado com pouca frequência, causador da doença em imunocomprometidos (VAN SOOLINGEN et al., 1998); *M. pinnipedii*, isolado em animais marinhos (COUSINS et al., 2003); e as subespécies recentemente identificadas – *M. tuberculosis* subsp. *caprae*, encontrado principalmente em caprinos (ARANAZ et al., 1999) e *M. tuberculosis* subsp. *canetti*, isolado na África e na Europa (MILTGEN et al., 2002).

Estudos genômicos têm mostrado que diferenças mais intensas entre espécies e linhagens se restringem a inserções e deleções de DNA, codificando um ou pequeno número de genes (COLE et al., 1998). Embora o significado funcional dessas diferenças, assim como as diversas substituições de nucleotídeos ocorridas entre diferentes espécies não tenham ainda sido esclarecidas, muitas destas podem resultar em alterações na patogenicidade observada entre espécies e linhagens distintas (FLEISCHMANN et al., 2002).

No homem, a doença é quase exclusivamente causada pelo *M. tuberculosis*, embora as diferentes espécies do complexo *M. tuberculosis* possam produzir quadro clínico semelhante à tuberculose, sendo necessário estabelecer diagnóstico diferencial por cultivo, identificação bioquímica ou por técnicas moleculares (METCHOCK et al., 1999).

A despeito de poder causar doença em humanos, o *M. bovis* é considerado uma zoonose que acomete mais comumente amígdalas, gânglios e intestino. Quando causa doença pulmonar, *M. bovis* não é transmissível facilmente, razão pela qual há uma tendência pelo seu desaparecimento (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

M. tuberculosis é uma forma de transição evolutiva entre as eubactérias e os actinomicetos. É um bacilo com 1 a 4 µm de comprimento por 0,3 a 0,6 µm de largura, não formador de esporos ou produtor de toxina, sem flagelos, espécie aeróbica estrita e intracelular facultativo, sendo capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior de células fagocitárias (KONEMAN et al., 2001).

3.2 TUBERCULOSE

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa, crônica, causada por micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. Seu principal agente etiológico é também chamado de bacilo de Koch e apresenta resistência à ação de agentes físicos como o calor e a radiação ultravioleta (HAAS; DÊS PREZ, 1995).

M. tuberculosis pode ser visualizado em secreções broncopulmonares por meio de microscopia direta e em culturas em meios específicos, apresentando uma propriedade de coloração típica de resistência à descoloração com álcool e ácidos. A sigla BAAR, de bacilos álcool-ácido-resistentes, baseia-se nesta propriedade (KONEMAN et al., 2001).

Acomete em especial os pulmões, mas pode atingir pele, rins, fígado, cérebro, ossos, assim como invadir a corrente sanguínea com disseminação por todo o corpo, sendo chamada então de tuberculose miliar. É um problema de saúde pública secular, pela sua gravidade e facilidade de propagação, podendo comprometer a saúde de pessoas de qualquer faixa etária (GOLDMAN; AUSIELLO, 2005).

3.3 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DA DOENÇA

A lesão típica observada na tuberculose é o granuloma, normalmente apresentando características bastante específicas. No centro da lesão existe uma ou mais células gigantes, circundadas por diversas células epitelióides. Na periferia encontram-se inúmeros linfócitos, alguns macrófagos e poucos plasmócitos. Dois ou mais destes granulomas podem fundir-se, originando nódulos bem delimitados e visíveis macroscopicamente, denominados de tubérculos. Frequentemente, ocorre uma necrose tecidual de extensão variável no centro do granuloma denominada de caseificação. Antes da fase de necrose a lesão pode curar-se completamente por resolução, entretanto, uma vez ocorridos os processos de necrose e caseificação, ela cicatriza-se por fibrose, encapsulamento, calcificação e formação de cicatriz (PROLLA et al., 2000).

A ruptura da lesão ocorre quando o *caseum* amolece e se liquefaz e é expelido através do sistema brônquico. Esse processo resulta na formação de uma cavidade no pulmão. A disseminação da doença pode ocorrer por extensão local, por via intrabrônquica, ou através da via linfo-hematogênica. As reações são

freqüentemente acompanhadas por fibrose extensiva e as lesões podem ser vistas em radiografias torácicas de pacientes afetados (GARAY, 2004).

A tuberculose é um exemplo clássico de doença causada por parasito intracelular. Embora os mecanismos imunopatogênicos da tuberculose ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que proteção imunológica é assegurada pelos mecanismos de imunidade celular, em vez daqueles associados a anticorpos. O controle imunológico dessa infecção é baseado na resposta imune celular, mediada predominantemente por células CD4 Th1. A produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas é induzida após a fagocitose do bacilo por essas células e direciona o desenvolvimento da resposta Th1 com produção de IFN- γ , que é a citocina crucial para o controle da infecção (LADEL et al., 1997).

A função principal do IFN- γ é ativar o macrófago infectado e assim induzir que esta célula exerça seu papel microbicida, pela ativação da produção de reativos de oxigênio e de nitrogênio, necessários para a eliminação do bacilo. Além disto, o IFN- γ estimula o macrófago a liberar TNF- α , citocina importante para a formação do granuloma e para o controle da infecção (ROACH et al., 2002).

Após a infecção, transcorrem em média quatro a 12 semanas para a detecção das lesões primárias. Epidemiologicamente, a maioria dos novos casos de doença pulmonar ocorre em torno de 12 meses após a infecção inicial. As infecções por micobactérias são freqüentes em indivíduos com AIDS, sendo os agentes etiológicos mais comumente identificados nestes pacientes o *M. avium* e o *M. tuberculosis* (MONTESSORI, 1996).

A probabilidade de o indivíduo vir a ser infectado e de que esta infecção evolua para a doença depende de múltiplas causas. As condições socioeconômicas são essenciais para esta multicasualidade. A evolução depende também da condição da infecção, se primo-infecção ou reinfecção exógena. A probabilidade de um indivíduo adoecer na primo-infecção depende também da virulência da cepa, da fonte infectante e das características genéticas dos

indivíduos infectados. Em novo contato, após uma infecção natural ou induzida pelo BCG, a resistência depende da resposta imunológica individual (BOOM et al., 2003).

São fatores de risco para a doença os extremos etários (infância e velhice), etnia negra, desnutrição, exposição maciça ao microrganismo, silicose, alcoolismo, uso de drogas endovenosas, uso de medicamentos como corticóides, além de portadores de doenças como diabetes, neoplasias e AIDS (BELLAMY, 1998). Todos os grupos etários são atingidos, embora cerca de 85% dos casos ocorram em adultos e 90% em sua forma pulmonar.

O bacilo tem capacidade de permanecer em estado de latência fisiológica durante longo tempo, assumindo uma condição de parasitismo intracelular. De cada 100 pessoas que se infectam com o bacilo, 10 a 20 adoecerão. Cepas resistentes a antibióticos são responsáveis por vários surtos da doença, principalmente em ambiente hospitalar, com conseqüente alto índice de infecção em trabalhadores da área de saúde e produção (STEWART et al., 2003).

Apesar de grande parte da população mundial ter sido infectada pelo bacilo, uma parcela relativamente pequena desenvolve a doença. Cerca de 90% dos indivíduos infectados desenvolve a forma latente e assintomática da doença. 10% das pessoas infectadas apresentam reativação da infecção podendo desenvolver tuberculose ativa, geralmente como conseqüência de uma infecção secundária, desnutrição, imunossupressão, consumo alcoólico, condições sanitárias precárias ou elevado grau de exposição ao agente etiológico. Raramente (5-10% dos casos) a infecção progride imediatamente após a infecção primária (FLYNN; CHAN, 2005).

Tratamento e profilaxia

Consideram-se hoje, para fim de tratamento, indivíduos que apresentem as seguintes características: material clínico positivo ao exame direto; cultura de material clínico positiva; adultos, sintomáticos, negativos persistentes à baciloscopia mas com suspeita radiológica de tuberculose pulmonar; crianças

doentes mesmo sem confirmação bacteriológica; não vacinados com BCG intradérmico e com histórico de contágio conhecido; reatores fortemente positivos pela intradermorreação à tuberculina PPD (BRASIL, 2002).

O tratamento da tuberculose é realizado com o uso de diferentes antibióticos por no mínimo seis meses. O longo período de tratamento e os efeitos colaterais dos medicamentos utilizados acabam resultando freqüentemente no abandono do mesmo. Por outro lado, a profilaxia da tuberculose é realizada pela administração da vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin), que foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin no Instituto Pasteur na França entre 1906 e 1919 (CHUNG; BIGGERS, 2001). Essa vacina é obtida a partir de uma cepa virulenta de *M. bovis* que foi atenuada após múltiplos cultivos por vários anos. Estima-se que mais de três bilhões de doses da vacina BCG foram administradas em todo o mundo. Apesar da relativa segurança e baixo custo, sua eficácia é altamente variável (FINE, 1989). A variabilidade da proteção conferida pela BCG está associada a vários fatores, tais como o contato prévio com micobactérias ambientais, características genéticas da população vacinada, inexistência de padronização da produção da BCG e a perda de segmentos gênicos após as sucessivas culturas do bacilo (HESS; KAUFMANN, 1999).

A eficácia variável da BCG, assim como o abandono do tratamento e o surgimento de cepas resistentes, são fatores que estão associados à ainda elevada incidência global da tuberculose (WHO, 2005).

3.4 TRANSMISSÃO

Apesar de ser conhecida desde a antiguidade, a transmissão da tuberculose foi evidenciada apenas em 1865 por Villemin (citado por BARIETY, 1965), que inoculou em animais de laboratório material clínico extraído de bovinos e pessoas doentes. Somente com os magistrais trabalhos de Robert Koch em 1892, foi definitivamente relacionada a etiologia da doença à micobactéria, hoje

denominada *Mycobacterium tuberculosis* (tipo humano). Posteriormente, dois outros tipos foram caracterizados, o tipo bovino (*Mycobacterium bovis*) e o aviário (*Mycobacterium avium*). A ingestão deixou de ser uma via comum de infecção, embora na época do leite não-pasteurizado e da tuberculose disseminada no gado, esta fosse uma via comum de infecção por *M. bovis* (FINKBEINER, 1994).

Apesar de ser uma doença infecto-contagiosa, a difusão da tuberculose é grandemente influenciada pelas condições econômicas e sociais da população. Prolifera em áreas de grande concentração humana, com precários serviços de infra-estrutura urbana, onde coexistem a fome e a miséria. Por estes motivos, a sua incidência é maior nas periferias das grandes cidades, podendo, no entanto, acometer qualquer pessoa mesmo em áreas rurais (BRASIL, 2002).

A infecção pelo bacilo da tuberculose pode ocorrer em qualquer idade, mas tende a acontecer na infância. A fonte de infecção primária é o indivíduo com a forma pulmonar da doença, eliminando bacilos para o exterior. Calcula-se que durante um ano, em uma comunidade, uma fonte de infecção típica poderá infectar, em média, de 10 a 15 pessoas que com ela tenham mantido contato. O risco de contágio de contactantes é de 2% e de contactantes casuais praticamente nula (MARKS, 1993).

A fala, o espirro e, principalmente, a tosse de um doente de tuberculose pulmonar bacilífera lançam no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados. As gotículas mais pesadas se depositam rapidamente e as mais leves permanecem no ar em suspensão. Somente o núcleo seco das gotículas – denominado de núcleo de Wells – com diâmetro menor que 5 μm e contendo de 1 a 3 bacilos consegue atingir os bronquíolos, e aí iniciar a sua multiplicação. Um paciente bacilífero produz, em média, 250 núcleos de Wells por hora. Estima-se que seja necessária uma exposição a cerca de 25.000 núcleos de Wells – aproximadamente 100 horas, portanto – para que o contágio ocorra (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000). As gotículas médias são, na maioria, retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios através do mecanismo

mucociliar. Os bacilos assim removidos são deglutidos, inativados pelo suco gástrico e eliminados nas fezes. Os bacilos que se depositam nas roupas, lençóis, copos e outros objetos dificilmente se dispersarão em aerossóis e, por isso, não desempenham papel importante na transmissão (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

Quatro fatores determinam a probabilidade da transmissão de *Mycobacterium tuberculosis*: 1) número de bacilos expelidos no ar; 2) concentração de organismos no ar, influenciados pelo espaço e ventilação; 3) tempo de exposição do indivíduo no ambiente contaminado e 4) estado imunológico do indivíduo exposto à contaminação (RIBEIRO et al., 1995).

O período de transmissibilidade se estende enquanto o doente estiver eliminando bacilos e não houver iniciado o tratamento. Com o início do esquema terapêutico recomendado, a transmissão é reduzida gradativamente em poucas semanas (BRASIL, 2002).

3.5 EPIDEMIOLOGIA: SITUAÇÃO NO MUNDO, NO BRASIL E NO PARANÁ

A despeito do grande progresso no tratamento e controle, a tuberculose ainda é uma das maiores causas de morte no mundo. Acredita-se que existam 2 bilhões de pessoas em todo o mundo infectadas pelo seu agente etiológico e com risco de desenvolver a doença (WHO, 2006).

Em 2005, estimativas globais apontavam a existência de aproximadamente 8,8 milhões de casos novos de tuberculose (136/100.000 hab.), dos quais 3,9 milhões possuíam baciloscopia positiva (60/100.000 hab.) e 969.000 (11%) eram adultos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A prevalência da doença no mesmo ano foi de 14 milhões de casos (217/100.000 habitantes). Cerca de 1,6 milhão de pessoas morreram de tuberculose em 2005 (24/100.000 habitantes), incluindo casos de co-infecção tuberculose/HIV (195.000

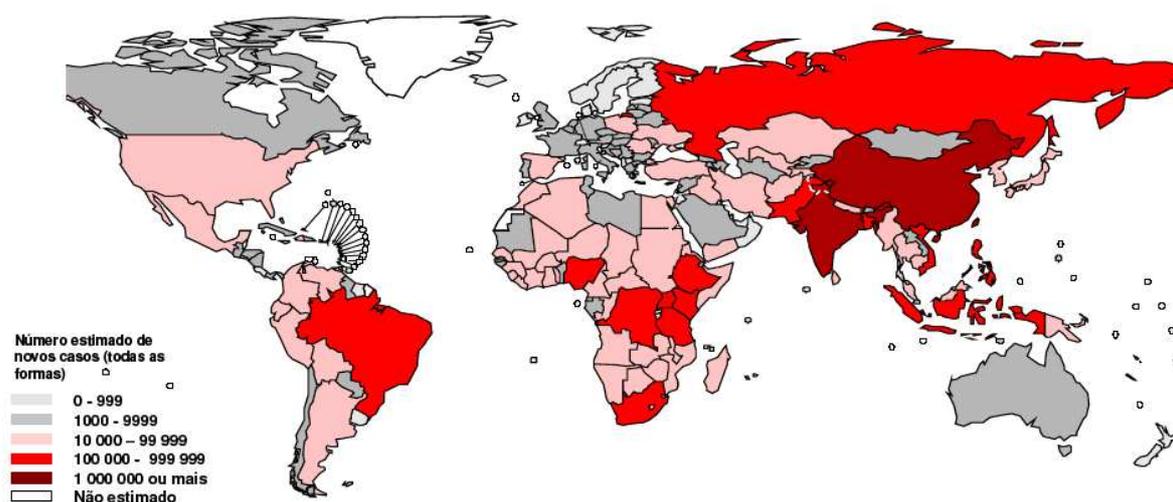
casos). A detecção global de casos em 2005 foi de 62% e o sucesso de tratamento foi de 84% em 2004 (WHO, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2005, dos cento e noventa e nove países que notificavam os casos de tuberculose, vinte e dois foram responsáveis por 80% dos casos em âmbito mundial e por 25% das mortes evitáveis, sendo, todos estes, países não desenvolvidos (Figura 1). No Brasil, os processos de exclusão social, debilidades do sistema de saúde, altas taxas de abandono do tratamento, além da magnitude da incidência de AIDS, determinam que a doença apresente elevadas taxas de morbidade e mortalidade (SOUZA et al., 2005).

Dado o recrudescimento de casos novos de tuberculose pelo surgimento da AIDS, muitos autores tendem a considerar a tuberculose como um problema reemergente de saúde pública. No entanto, esta alternativa parece ser válida apenas para países desenvolvidos. Em países em desenvolvimento como o Brasil, a tuberculose não é problema de saúde pública emergente, tampouco reemergente, mas um problema constante e presente em nosso meio (RUFFINONETO, 2002).

No ano de 2005, foram notificados nas Américas 157.000 novos casos de doentes com baciloscopia positiva, 50% dos quais no Brasil e no Peru. Atualmente, o Brasil ocupa a quinta posição no *ranking* de casos do continente americano e a décima quinta no *ranking* mundial (ORGANIZACIÓN PAN-AMERICANA DE LA SALUD, 2004).

FIGURA 1 - NÚMERO ESTIMADO DE NOVOS CASOS DE TUBERCULOSE NO MUNDO EM 2005

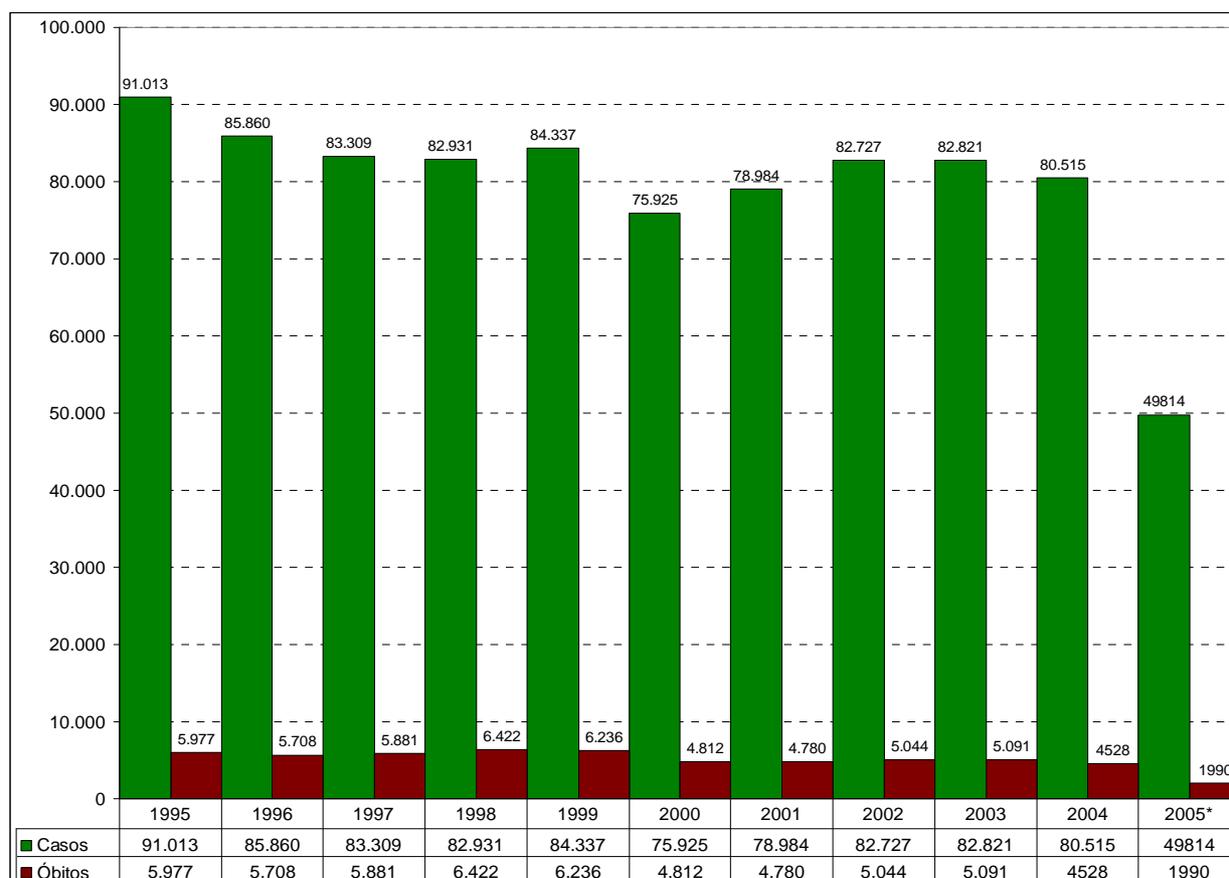


FONTE: WHO, 2006

No Brasil, segundo estimativas da OMS para o ano de 2005, os coeficientes de incidência e prevalência da doença foram 60/100.000 hab. e 76/100.000 hab., respectivamente. O coeficiente de incidência para os casos pulmonares bacilíferos foi de 26/100.000 hab., o coeficiente de mortalidade por tuberculose foi de 7,5/100.000 hab. e o percentual de co-infecção tuberculose/HIV foi de 14% (WHO, 2007). Fontes do Ministério da Saúde apontam a existência de aproximadamente 50 milhões de infectados em nosso país (CONSENSO BRASILEIRO DE TUBERCULOSE, 2004). Em 2005, foram notificados 80.209 casos de tuberculose, dos quais 66.083 eram casos novos pulmonares, sendo 42.093 com baciloscopia positiva (WHO, 2007). A Figura 2 mostra o número de casos novos e de óbitos por tuberculose no Brasil no período de 1995 a 2005 (BRASIL, 2006).

No Estado do Paraná, em 2005, foram notificados à Secretaria Estadual de Saúde 2.704 casos novos de tuberculose. O Estado apresenta taxa de incidência de 26,4/100 mil habitantes para tuberculose em todas as formas e de 13,8/100 mil habitantes para casos bacilíferos, menor que a média nacional e da região sul, conforme pode ser observado na Figura 3 (BRASIL, 2007). O Estado possui 10 municípios prioritários, com 49,89% de pacientes com a forma pulmonar bacilífera. Entre as 22 Regionais de Saúde que compõem o sistema de saúde do Governo do Estado do Paraná, a de Paranaguá apresenta o maior coeficiente de incidência, 69,48/100.000 habitantes e a de Pato Branco tem a menor taxa, 7,51/100.000 habitantes (Figura 4 e Quadro 1).

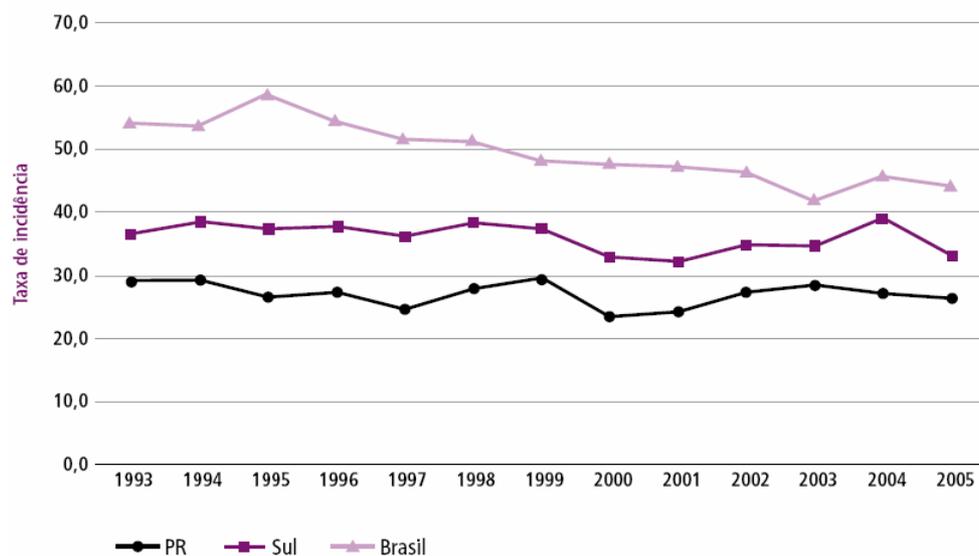
FIGURA 2 - NÚMERO ANUAL DE CASOS NOVOS E DE ÓBITOS POR TUBERCULOSE NO BRASIL NOS ANOS DE 1995 A 2005



FONTE: BRASIL, 2006

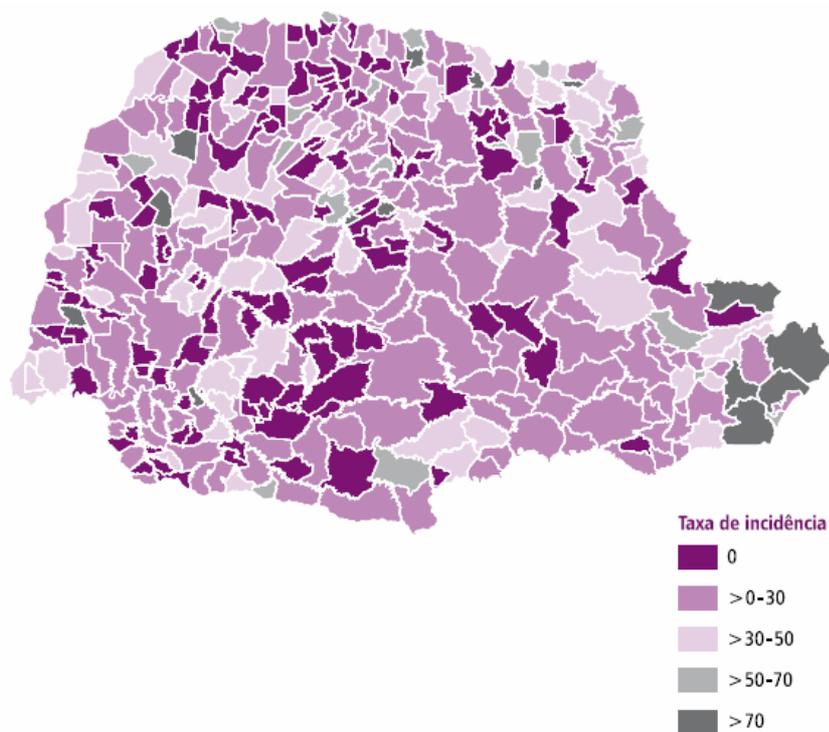
NOTA: * dados de 2005 se referem ao período de janeiro a agosto

FIGURA 3- COEFICIENTES DE INCIDÊNCIA DE TUBERCULOSE NO ESTADO DO PARANÁ, NA REGIÃO SUL E NO BRASIL ENTRE OS ANOS 1993 E 2005



FONTE: BRASIL, 2007

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DE MUNICÍPIOS SEGUNDO TAXA DE INCIDÊNCIA (POR 100 MIL HABITANTES) PARA TUBERCULOSE, NO ESTADO DO PARANÁ, EM 2005.



FONTE: BRASIL, 2007

QUADRO 1-NÚMERO DE CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE PULMONAR BACILÍFERA, TODAS AS FORMAS E COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA POR 100.000 HABITANTES NO ANO DE 2004 NAS 22 REGIONAIS DE SAÚDE NO PARANÁ

| REGIONAIS DE SAÚDE | ANO 2004 | | | | |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------|-----------------|---------------------------|
| | POPULAÇÃO | BACILÍFERA PULMONAR | COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA | TODAS AS FORMAS | COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA |
| 1ª R.S. - Paranaguá | 260.518 | 87 | 33,40 | 181 | 69,48 |
| 2ª R.S.M. - Curitiba | 3.085.800 | 507 | 16,43 | 957 | 31,01 |
| 3ª R.S. - Ponta Grossa | 547.901 | 50 | 9,13 | 131 | 23,91 |
| 4ª R.S. - Irati | 152.991 | 14 | 9,15 | 41 | 26,80 |
| 5ª R.S. - Guarapuava | 444.594 | 32 | 7,20 | 100 | 22,49 |
| 6ª R.S. - União da Vitória | 161.503 | 12 | 7,43 | 31 | 19,19 |
| 7ª R.S. - Pato Branco | 239.743 | 8 | 3,34 | 18 | 7,51 |
| 8ª R.S. - Francisco Beltrão | 317.878 | 24 | 7,55 | 37 | 11,64 |
| 9ª R.S. - Foz do Iguaçu | 413.462 | 85 | 20,56 | 169 | 40,87 |
| 10ª R.S. - Cascavel | 485.078 | 53 | 10,93 | 102 | 21,03 |
| 11ª R.S. - Campo Mourão | 330.106 | 49 | 14,84 | 72 | 21,81 |
| 12ª R.S. - Umuarama | 246.677 | 40 | 16,22 | 128 | 51,89 |
| 13ª R.S. - Cianorte | 127.830 | 8 | 6,26 | 22 | 17,21 |
| 14ª R.S. - Paranavaí | 251.391 | 24 | 9,55 | 57 | 22,67 |
| 15ª R.S. - Maringá | 672.602 | 87 | 12,93 | 155 | 23,04 |
| 16ª R.S. - Apucarana | 324.852 | 41 | 12,62 | 66 | 20,32 |
| 17ª R.S. - Londrina | 805.435 | 117 | 14,53 | 215 | 26,69 |
| 18ª R.S. - Campo Procopio | 247.939 | 29 | 11,70 | 54 | 21,78 |
| 19ª R.S. - Jacarezinho | 271.792 | 42 | 15,45 | 92 | 33,85 |
| 20ª R.S. - Toledo | 322.811 | 22 | 6,82 | 46 | 14,25 |
| 21ª R.S. - Telêmaco Borba | 162.694 | 24 | 14,75 | 43 | 26,43 |
| 22ª R.S. - Ivaiporã | 141.828 | 20 | 14,10 | 39 | 27,50 |
| PARANÁ | 10.015.425 | 1375 | 13,73 | 2756 | 27,52 |

FONTE: PARANÁ, 2007

3.6 VARIABILIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS CIRCULANTES DE *M. tuberculosis*

O estudo da variabilidade genética das linhagens circulantes em determinada população possibilita o conhecimento da dinâmica de transmissão das doenças infecciosas. Pesquisas recentes têm demonstrado que a diversidade

genética das linhagens isoladas de *M. tuberculosis* de diferentes populações humanas pode variar consideravelmente e que a identificação de grupos geneticamente idênticos reflete o aumento da circulação do microrganismo entre os hospedeiros humanos (KATO-MAEDA; SMALL, 2001).

Nos últimos dez anos, esses estudos têm sido possíveis pela disponibilidade cada vez maior de ferramentas moleculares, com conseqüentes mudanças nos estudos epidemiológicos das doenças infecciosas. Assim sendo, as técnicas moleculares têm sido utilizadas para detectar correntes de infecção ou casos atribuídos à transmissão recente de *M. tuberculosis* (BORGDOFF et al., 1998), identificar fatores de risco (GARCIA-GARCIA et al., 2000), documentar reinfecção exógena (LILLEBAEK et al., 2001), auxiliar no estudo dos padrões de resistência a drogas (DAVIES et al., 1999) e detectar contaminação laboratorial (GASCOYNE-BINZI et al., 2001).

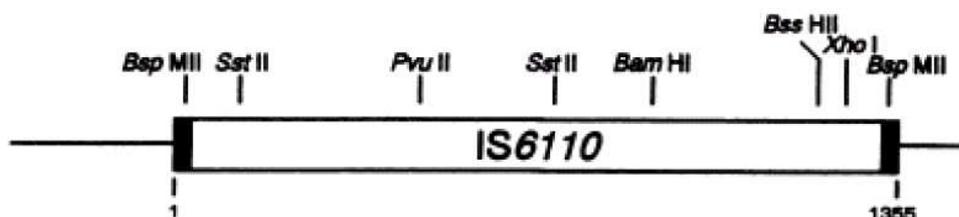
O genoma de *M. tuberculosis* é conservado e indica uma adaptação à espécie humana relativamente recente, como demonstram trabalhos de genética evolucionar (BIFANI et al., 2002; YOUNG, 2003).

No complexo *M. tuberculosis*, em razão da proximidade genética das subespécies, há um grau de polimorfismo de DNA associado a elementos repetitivos, tais como seqüências curtas de DNA repetitivo (DR) e seqüências de inserção (IS). Quatro diferentes IS foram identificadas em cepas do complexo *M. tuberculosis*, a saber: IS6110, IS1081, IS1547 e os IS-“like elements” (THIERRY et al., 1990; MARIANI et al., 1997; KREMER et al. 1999). A seqüência IS1081 está presente de cinco a sete cópias por cepa (FANG et al. 1998). As seqüências IS1547 e IS-“like elements” estão presentes em número reduzido de cópias por linhagem, apresentando baixo poder discriminatório para caracterização molecular (KREMER et al. 1999). A seqüência IS6110, por apresentar grande variação do número de cópias por linhagem, é a que melhor se presta para investigações epidemiológicas (FANG et al. 1998; KREMER et al. 1999).

A seqüência IS6110 possui 1.355 pares de base e pertence à família IS3 (Figura 5). O número de cópias oscila entre 0 e 25, e sua posição no genoma é variável entre diferentes isolados (MOSTROM et al., 2002).

A Identificação e diferenciação de linhagens de *M. tuberculosis* pela análise do polimorfismo do elemento de inserção IS6110 têm sido empregadas como ferramenta para estudos epidemiológicos em países desenvolvidos há mais de uma década (THIERRY et al., 1990; VAN SOOLINGEN et al., 1993; ALLAND et al., 1994). Todavia, existem poucos estudos dessa natureza realizados em países em desenvolvimento, como o Brasil (FANDINHO et al., 2000; SUFFYS et al. 2000; BAPTISTA et al., 2002; CALUSNI et al., 2003; BORSUK et al., 2005).

FIGURA 5- DESENHO ESQUEMÁTICO DO ELEMENTO DE INSERÇÃO IS6110 DE *M. tuberculosis*, COM 1.355 BP, ILUSTRANDO OS PONTOS DE CORTE COM DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRIÇÃO



FONTE: VAN EMBDEN et al., 1993

3.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tuberculose pode ser obtido através de vários métodos, tais como histórico clínico, baciloscopia, cultivo, exame radiológico e teste tuberculínico

3.7.1 História Clínica

Para a forma pulmonar da doença, dependendo de sua evolução, o paciente pode ser assintomático ou manifestar-se clinicamente com tosse, febre, perda de peso, sudorese noturna e inapetência. A temperatura corporal apresenta variação ao longo do dia, apresentando-se baixa ou normal durante a manhã e aumentando gradativamente até o final da tarde. À noite, a temperatura volta ao normal, sendo acompanhada de sudorese. A tosse está presente na maioria dos casos, sendo inicialmente seca, e com a progressão da doença, evolui para uma expectoração purulenta. Não raro, o escarro pode estar acompanhado de sangue, o que evidencia um comprometimento de vasos pulmonares. O volume de sangramento é variável e não indica necessariamente tuberculose ativa (GARAY, 2004). A tosse com expectoração por mais de três semanas é um sinal importante, e caracteriza o paciente sintomático respiratório (CONSENSO BRASILEIRO DE TUBERCULOSE, 2004).

3.7.2 Baciloscopia

As micobactérias não se coram facilmente através de métodos convencionais como a coloração de Gram, pela alta quantidade de lipídios presentes na parede celular. Dois tipos de colorações são realizados normalmente:

1- coloração de Carbofucsina (mistura de fucsina com fenol); que incluem as colorações de:

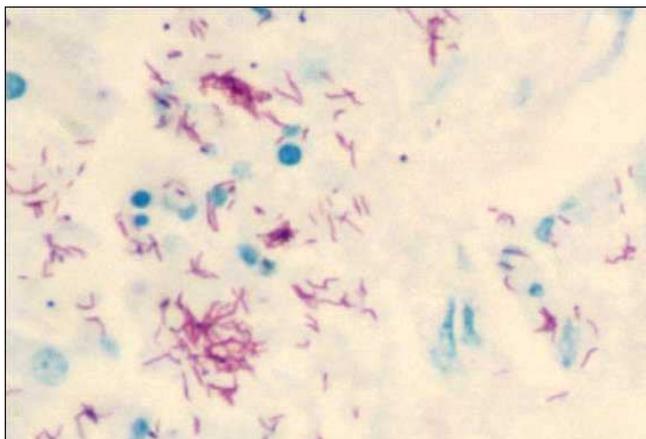
- a- Ziehl-Neelsen (coloração a quente)
- b- Kinyoun (coloração a frio)
- c- Ziehl-Gabbet (coloração a frio)

2- coloração de Fluorocromos: auramina O (KONEMANN, 2001)

Os métodos se baseiam na propriedade dos bacilos serem álcool-ácido-resistentes, ou seja, depois de tingidos pela fucsina básica (ou pelo fluorocromo), manterem coloração avermelhada ou rósea mesmo após serem submetidos à

ação de solução de álcool e ácidos fortes para descoloração (Figura 6). É um exame semiquantitativo, com a contagem do número de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) por campo microscópico (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

FIGURA 6- PREPARAÇÃO MICROSCÓPICA DE *M. tuberculosis* PELA TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN OBSERVADA NO AUMENTO DE 1000 X



FONTE: KONEMANN, 2001

A baciloscopia direta apresenta pouca sensibilidade e para ser positiva necessita de uma concentração mínima de 10^4 bacilos/mL, quantidade alcançada apenas em lesões razoavelmente extensas. Em casos de tuberculose pulmonar, a sensibilidade da baciloscopia varia entre 33% e 80% (GOESSENS et al., 2005, PETERSON et al., 1999; LIPSKY et al., 1984). Embora menos sensível que a cultura, a baciloscopia permite a detecção precoce de micobactérias e possibilita ao clínico direcionar os procedimentos necessários, ainda que não possibilite a diferenciação entre espécies. A coloração deve ser realizada em todos os materiais de cultura suspeitos de conter micobactérias (METCHOCK, 2001).

3.7.3 Cultivo

Apesar de mais trabalhosa e morosa quanto à obtenção de resultado, o cultivo do microrganismo é um método mais sensível que a baciloscopia,

necessitando de apenas 10 a 100 bacilos viáveis por mL de espécime clínico para apresentar resultados positivos (PALOMINO, 2005). A sensibilidade da cultura varia entre 80% e 85% (STAGER et al., 1991; MORGAN et al., 1983; ROBERTS et al., 1983) e sua especificidade é de 98% (SCHIRM et al., 1995). Pelo lento crescimento bacilar, as culturas são passíveis de leitura somente após três a seis semanas de inoculação em meios sólidos. É um complemento da baciloscopia, que permite o diagnóstico não apenas dos casos avançados, intensamente bacilíferos, como também dos casos mais recentes com discreta eliminação bacilar (BRASIL, 2002).

O procedimento de cultura utiliza meios solidificados que podem ser divididos em meios à base de ovo ou de agar. O meio de cultura mais amplamente utilizado para isolamento de micobactérias é o Löwenstein-Jensen (LJ), à base de ovo, contendo glicerol como fonte de carbono e asparagina como fonte de nitrogênio. Este meio é padronizado pelo Ministério da Saúde do Brasil para uso em laboratórios de referência e permite o crescimento da maioria das micobactérias de interesse médico (BRASIL, 2002). O meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 é comumente utilizado no subcultivo para estocagem de cepas. É o meio escolhido para o preparo do inóculo para testes de resistência e outros ensaios “in vitro”, sendo utilizado para a recuperação de micobactérias presentes em baixa contagem em materiais como o líquido (METCHOCK, 2001).

3.7.4 Exame Radiológico

O exame radiológico é auxiliar no diagnóstico da tuberculose justificando sua utilização nos indivíduos sintomáticos respiratórios, nos suspeitos de serem portadores de tuberculose extrapulmonar, nos portadores de infecção pelo HIV e nos contactantes (intradomiciliar ou extradomiciliar) de pacientes com tuberculose pulmonar (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

A maioria dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresenta alterações radiográficas sugestivas. Na tuberculose primária, o processo infeccioso recente é visto geralmente como um infiltrado no lobo médio ou inferior do pulmão (MCGUINNESS; RUBINOWITZ, 2004). A imagem radiográfica sugestiva é o aspecto bipolar, de aumento hilar, em decorrência da hipertrofia dos linfonodos regionais. A principal alteração parenquimatosa é representada por uma opacidade, com limites mal definidos, freqüentemente associada com adenopatia hilar ipsi-lateral. Raramente, os linfonodos aumentados podem comprimir os brônquios, dando origem a atelectasias. Com a progressão da doença, imagens cavitárias podem surgir, indicando uma forma mais grave (GARAY, 2004). As lesões podem regredir espontaneamente, resultando em seqüelas como alterações parenquimatosas calcificadas ou não (BRASIL, 2002).

O exame radiológico permite a identificação de pessoas portadoras de imagens sugestivas de tuberculose ou de outras patologias e permite, em pacientes com baciloscopia positiva, a exclusão de outra doença pulmonar associada que necessite de tratamento concomitante, além de avaliar a evolução radiológica dos pacientes, sobretudo naqueles que não responderam à quimioterapia (BRASIL, 2002).

3.7.5 Teste Tuberculínico

A prova tuberculínica é indicada para os indivíduos que tenham tido contato próximo com pessoas com tuberculose pulmonar ativa ou com o bacilo; pessoas que tenham apresentado determinados sintomas como cansaço, perda de apetite e peso, febre, suores noturnos e tosse persistente; e aqueles que possuem sistema imunológico comprometido (BRASIL, 2002).

A tuberculina é constituída por uma mistura purificada por fracionamento químico (derivado protéico purificado) de componentes solúveis de *M. tuberculosis* ativamente produzidos durante crescimento em meio líquido. A injeção intradérmica

deste derivado é conhecida como prova tuberculínica, ou teste de Mantoux, e é indicada como método auxiliar no diagnóstico da tuberculose. A resposta primária de um organismo infectado é desenvolver reação de hipersensibilidade do tipo tardia às proteínas de baixo peso molecular secretadas pelo bacilo, e como consequência apresentar reação positiva à tuberculina. Um resultado positivo indica, isoladamente, apenas infecção e não necessariamente tuberculose doença (BRASIL, 2002).

A prova tuberculínica é baseada nos fenômenos de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT). Quando proteínas estranhas, fragmentos protéicos ou o próprio bacilo da tuberculose são previamente introduzidos no organismo hospedeiro, macrófagos são ativados por mediadores solúveis (citocinas) secretados por linfócitos T antígenos-específicos resultando em uma resposta imune altamente sensível e um quadro de elevada sensibilidade na infecção subsequente. A infiltração de linfócitos e macrófagos no local de injeção produz uma área de endureção e tumefação ao redor da aplicação, sendo dimensionada com auxílio de régua milimetrada (HUEBNER et al., 1993).

É o método diagnóstico mais empregado em todo o mundo para demonstrar se uma pessoa foi infectada pelo bacilo. O derivado protéico purificado (PPD), apesar de ser denominado purificado, é, em verdade, uma mistura bruta de mais de duzentos antígenos protéicos e polissacarídeos obtidos a partir do filtrado de culturas de *M. tuberculosis* (LALVANI et al., 2001).

Há várias classes de testes para a prova intradérmica. O mais utilizado é o método de Mantoux PPD. O teste é realizado injetando-se 0,1 mL de antígeno PPD (equivalente a 2 unidades de tuberculina) por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço do paciente. A reação de hipersensibilidade de natureza tardia se manifesta três ou quatro dias após a infecção. A leitura do halo de endureção formado ao redor da aplicação, após este período, indicará se o indivíduo foi ou não infectado pelo bacilo (BRASIL, 2002).

BRENNAN (2003) assinalou que o teste de intradermorreação utilizando o derivado protéico purificado PPD é o único método atualmente disponível para avaliar populações em risco de infecção pelo *M. tuberculosis* e ainda é o melhor meio de se diagnosticar infecção latente de tuberculose, por seu baixo custo de produção e realização, não necessitando de equipamentos sofisticados para sua execução.

No entanto, o ensaio de PPD, apesar de mundialmente utilizado, carece de especificidade à infecção por *M. tuberculosis*, especialmente pelos seguintes motivos: (1) exposição ou infecção a micobactérias de outras espécies; (2) vacinação com BCG; (3) presença na tuberculina (PPD) de diversos antígenos compartilhados por outras micobactérias não patogênicas (CAMPOS-NETO et al. 2001).

3.8 PROPRIEDADES IMUNOGÊNICAS DE ANTÍGENOS DE SECREÇÃO DE *M. tuberculosis*

Antígenos espécie-específicos podem representar importantes fatores de virulência de *M. tuberculosis* e a busca, identificação e caracterização de novos marcadores imunogênicos é campo de fundamental importância no desenvolvimento de vacinas, novas drogas terapêuticas e ensaios diagnósticos (GELUK et al., 2002). Proteínas secretadas em meios de cultura por *M. tuberculosis* desempenham importante papel na geração e desenvolvimento de respostas imunes à doença (WEBB et al., 1998). Filtrados de proteínas de cultura obtidas de cultivo *in vitro* de *M. tuberculosis* são altamente antigênicos, levando-se em conta sua capacidade de estimular *in vitro* a proliferação e produção de citocinas de células T em ratos e cobaias infectados e de evidenciar testes positivos de PPD em humanos (YOUNG, 1992; ORME, 1993; BOESEN et al., 1995; ROBERTS et al., 1995).

O genoma de *M. tuberculosis* contém genes para aproximadamente 4.000 proteínas, das quais apenas metade foram devidamente descritas e

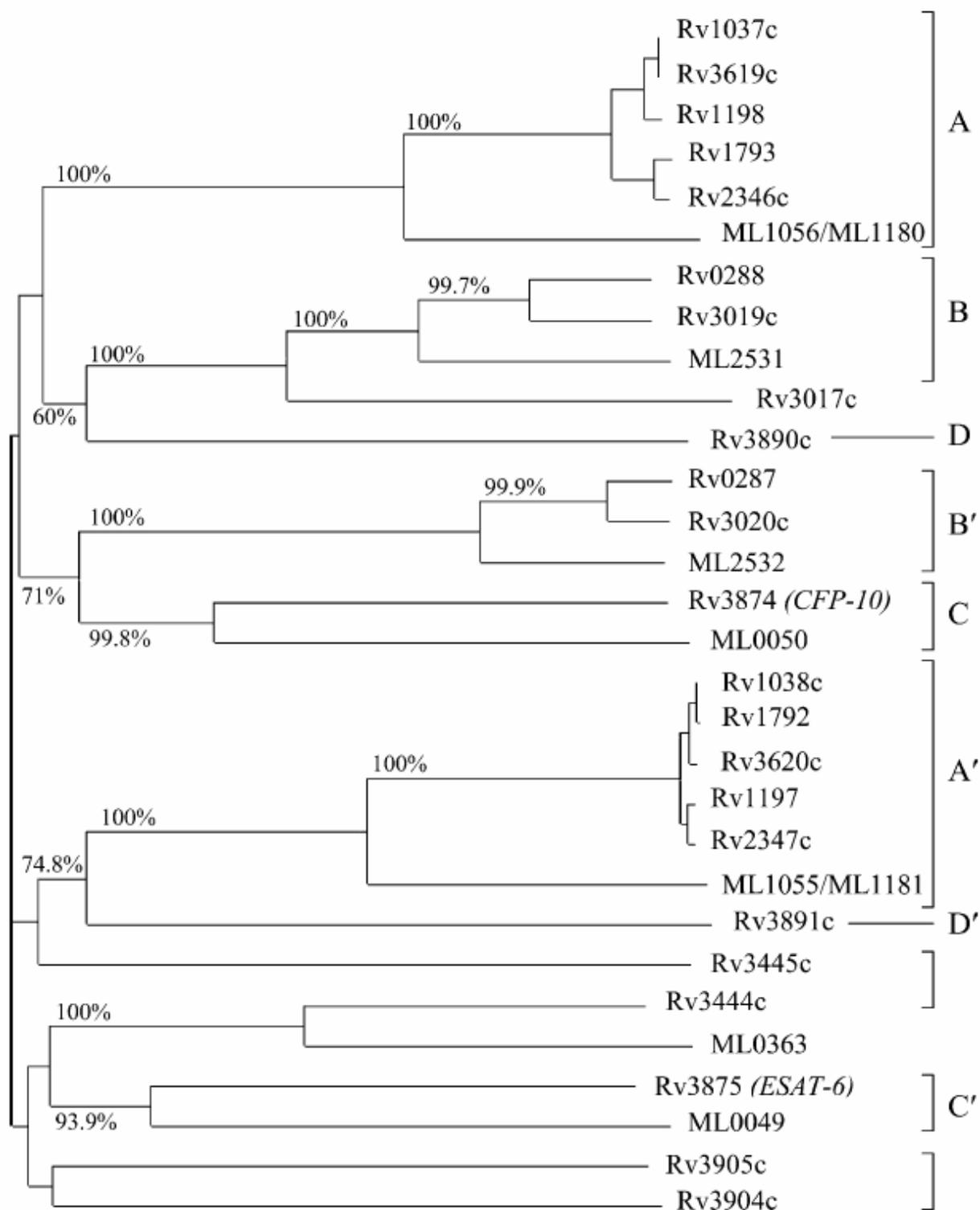
associadas a uma função específica. Portanto, há pouca informação sobre quais são as proteínas essenciais para a patogênese da tuberculose e, conseqüentemente, suas respectivas estruturas, funções e mecanismos de ação (COLE et al., 1998).

Estudos de genômica comparativa identificaram 14 regiões de diferenças entre *M. tuberculosis* e a linhagem atenuada de *M. bovis* BCG. Uma região, denominada RD1, está presente em todos os isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis* e simultaneamente ausente em todas as linhagens BCG (BEHR et al., 1999).

A região RD1 contém genes para nove proteínas, todas claramente implicadas na patogênese da doença, denominados de Rv3871 a Rv3879c. Dois destes genes apresentam seqüências relacionadas, codificantes de proteínas de baixo peso molecular, expressas durante a fase inicial da infecção, conhecidas como CFP-10, codificada pelo gene Rv3874 ou *esxB*; e ESAT-6, codificada pelo gene Rv3875 ou *esxA* (PYM et al., 2002).

A expressão de ambas as proteínas apresenta regulação coordenada e sua secreção ocorre por um complexo de membrana formado por produtos de diversos genes adjacentes (GUINN et al., 2004). CFP-10 e ESAT-6 não apresentam qualquer similaridade de seqüência com proteínas de função ou estrutura terciária conhecidas. Todavia, estas proteínas fazem parte de uma grande família de proteínas micobacterianas, incluindo 23 proteínas encontradas em *M. tuberculosis* (Figura 7), que também apresentam a característica de serem codificadas por genes em pares no genoma da micobactéria (RENSHAW et al., 2002).

A importância da CFP-10 e da ESAT-6 na patogênese e virulência da doença foi confirmada pelo atenuamento de linhagens virulentas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* por inativação experimental dos genes *esxA* e *esxB*. Por outro lado, a reintrodução da RD1 em linhagens BCG ocasiona o efeito contrário de aumento da virulência da linhagem recombinante (STANLEY et al., 2003).

FIGURA 7- ARVORE FILOGENÉTICA PARA A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS CFP-10/ESAT-6 DE *M. tuberculosis*

FONTE: LIGHTBODY et al., 2004

NOTA: Principais pares de grupos estão destacados por barras verticais e identificados por letras (A pareando com A', B com B', etc...). Os valores de bootstrap estão indicados como percentuais (%).

RENSHAW et al. (2002) propuseram que CFP-10 e ESAT-6 formariam um complexo heterodímero, na proporção de 1:1, induzindo a mudança de conformação de ambas as proteínas e que esta seria sua forma biológica ativa *in vivo*. LIGHTBODY et al. (2004) sugerem que outros pares de membros da família CFP-10/ESAT-6 apresentariam conformação similar e que seria possível, inclusive, a formação de complexos entre membros de pares distintos de proteínas, o que ampliaria significativamente sua diversidade funcional.

Muitos outros membros da família de proteínas CFP-10/ESAT-6 são conhecidos por serem proteínas de secreção e por possuírem atividade imunogênica, com capacidade de estimular linfócitos T ou a produção de anticorpos, incluindo os produtos dos genes Rv0287/Rv0288, Rv3019c e membros dos pares de grupos demonstrados pelas letras A e A' na Figura 7 (SKJØT et al., 2002).

Proteínas de filtrado de cultura de *M. tuberculosis* são importantes alvos para a resposta mediada por linfócitos T em camundongos e em humanos com tuberculose ativa. LIM et al. (2004) isolaram e caracterizaram por fracionamento de filtrado de cultura por cromatografia de troca iônica uma proteína de 11 kDa, a que denominaram MTSP11. Este antígeno, presente em pequenas quantidades em filtrado de cultura de *M. tuberculosis*, é codificado pelo gene Rv3204 e induz, significativamente, a produção de IFN- γ e interleucina (IL)-12p40 em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis reatores à tuberculina.

As proteínas acima descritas, dadas suas propriedades como indutoras de imunidade celular e/ou humoral, despertam o interesse para sua clonagem, expressão e avaliação do uso potencial como reagentes para auxílio diagnóstico de tuberculose.

MPT83 é uma lipoproteína com peso molecular de 22 kDa, codificada pelo gene Rv2873, caracterizada por HEWINSON et al. (1996). Foi demonstrado que este antígeno tem capacidade de induzir resposta humoral específica e

estimular linfócitos T em camundongos, conferindo imunidade protetora (XUE et al., 2004). YUA et al. (2007) demonstraram a imunogenicidade e eficácia protetora em camundongos infectados com *M. tuberculosis* e *Brucella abortus* com uma vacina de DNA composta por seis genes, entre os quais Rv2873.

MPT70 é um antígeno com grande similaridade com MPT83, separados entre si por uma distância de 2,4 kb no genoma da micobactéria (HEWINSON et al., 1996). Tal como o antígeno MPT83, foi verificada a capacidade de induzir a resposta humoral em camundongos conferindo imunidade protetora (YUA et al., 2007).

TB10.4 e TB10.3 são proteínas de baixo peso molecular, codificadas pelos genes Rv0288 e Rv3019c, respectivamente. Também presentes em filtrado de cultura de *M. tuberculosis*, constituem um subgrupo da família das proteínas ESAT-6/CFP-10. Os membros deste subgrupo estão presentes apenas em linhagens do complexo *M. tuberculosis*, incluindo BCG e *M. kansasii*, estando ausente em outras micobactérias atípicas como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* e *M. szulgai*. Ambas as proteínas são estimulantes de resposta mediada por linfócitos T e têm sido apontadas como relevantes no desenvolvimento de vacinas contra a tuberculose (SKJØT et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CEPAS DE *M. tuberculosis*

4.1.1 Origem do Material Estudado

As culturas de *M. tuberculosis* utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia do Laboratório Central do Estado, LACEN/PR. Foram coletados escarros, lavados brônquicos, biópsias e urinas de 62 pacientes com diagnóstico clínico de tuberculose, atendidos pelas Regionais de Saúde que integram o Sistema Único de Saúde no Estado do Paraná, durante o período de novembro de 2004 a março de 2005. Algumas das culturas fornecidas eram de linhagens multiresistentes às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose, não sendo informada a origem geográfica de cada amostra ou sua procedência clínica. Os isolados de *M. tuberculosis* foram obtidos pela semeadura e isolamento do bacilo em meio nutriente seletivo para micobactérias Löwenstein-Jensen (LJ).

4.1.2 Identificação

Ao todo, foram avaliadas 62 amostras provenientes de mesmo número de pacientes, sendo uma amostra por paciente. A identificação e os testes de sensibilidade foram realizados no referido Laboratório de Bacteriologia, e uma breve descrição dos processos é apresentada a seguir.

- Identificação de espécie (KONEMAN et al, 2001; BERGEY'S, 1986).

A identificação de *M. tuberculosis* foi realizada verificando-se crescimento em cultura na presença de ácido p-nitrobenzóico (PNB) e de hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH). Estes agentes inibem de forma seletiva o crescimento de *M. tuberculosis* permitindo a diferenciação desta

espécie das demais micobactérias. Também foram realizadas as provas da Niacina e redução de Nitrato (provas positivas para *M. tuberculosis*, mas negativas para as espécies *bovis* e *avium*) e a prova da Isoniazida (INH) para a identificação das cepas.

- Sensibilidade (CANETTI; RIST; GROSSET, 1963).

O teste de sensibilidade de *M. tuberculosis* aos antimicrobianos foi avaliado utilizando-se a metodologia clássica das proporções frente às drogas Isoniazida (INH), Rifampicina (RMP), Estreptomicina (SM), Etambutol (EMB), Pirazinamida (PZA) e Etionamida (ETH). Este método consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente à concentração da droga que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não o das células resistentes (concentração crítica). Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou superior àquela da qual a amostra é considerada resistente (proporção crítica).

4.1.3 Repique das Cepas e Crescimento em Meio Sólido

4.1.3.1 Repique das cepas em meio nutriente agar LJ

Todas as cepas foram repicadas no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, em condições de biossegurança nível três, em fluxo laminar, próximo à chama, para quatro novos tubos contendo meio nutriente sólido LJ. Os tubos de cultivo foram identificados com um código constituído pelo prefixo "LAC" seguido do número de ordem do isolado e colocados em incubação aeróbia em câmara de infecção (estufa) a 37°C durante um tempo superior a 20 dias.

4.1.3.2 Repique das cepas em meio nutriente Middlebrook

Após crescimento em tubos LJ, as cepas foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo meio sólido Middlebrook. O preparo do meio e os procedimentos de cultivo foram realizados no Departamento de Antígenos do Instituto Tecnológico do Paraná (DAN/TECPAR). Todos os procedimentos foram executados em Cabine de Segurança tipo II, com o uso adequado de equipamentos de proteção individuais (EPIs), incluindo máscaras N 95 com filtro conhecido como HEPA, com alto poder de filtração, conforme Nível de Biossegurança 3.

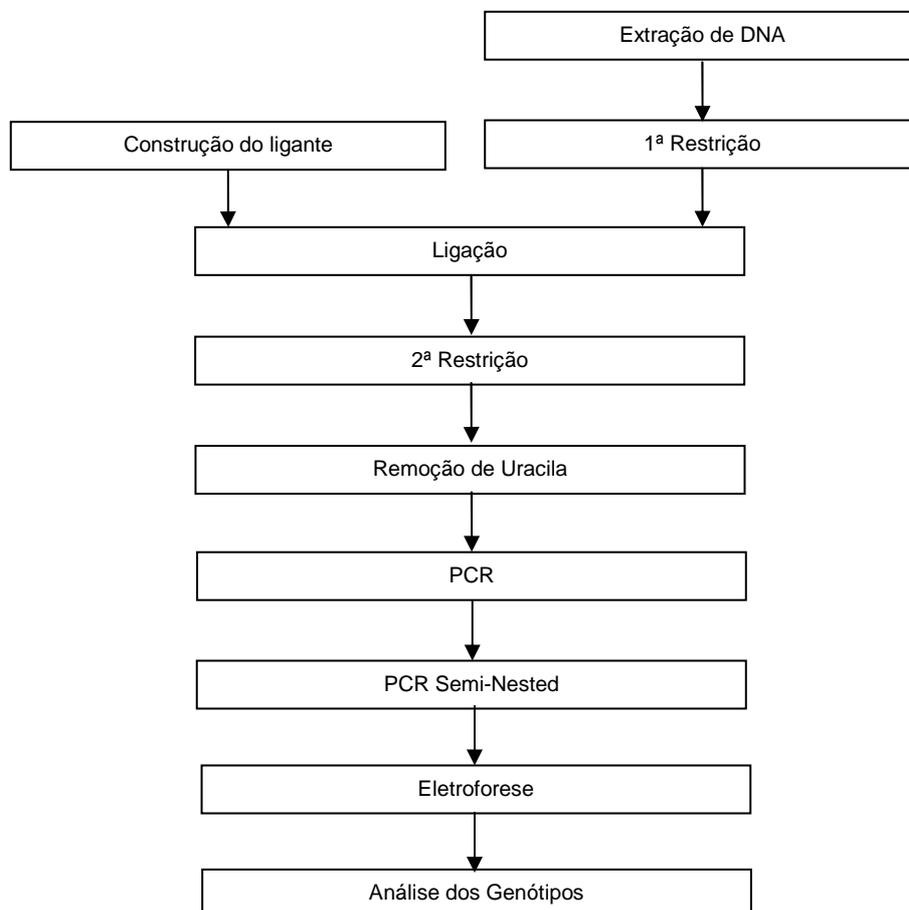
4.1.4 Manutenção das Cepas em Laboratório e Revitalização

Os tubos originais foram armazenados em *freezer* a -80°C . Periodicamente, um tubo de cada cepa era retirado do *freezer* e deixado inicialmente à temperatura ambiente durante 48 horas e em seguida incubado a 37°C por 24 horas. Este procedimento na prática se mostrou indispensável para readaptação das mesmas e retomada das funções metabólicas das células bacterianas. Uma vez readaptadas, foram subcultivadas em novos tubos com meio nutriente seletivo sólido LJ e deixadas para crescimento a 37°C .

4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE *M. tuberculosis*

O método padrão recomendado para caracterização molecular de linhagens de *M. tuberculosis* é baseado no polimorfismo do comprimento de fragmentos obtidos por restrição enzimática do DNA micobacteriano (RFLP), devido à variabilidade da localização e do número de cópias da seqüência de

inserção IS6110 no genoma da micobactéria (VAN EMBDEN et al., 1993). Como este método não utiliza nenhuma forma de amplificação do DNA, é necessária grande quantidade de DNA microbiano (igual ou superior a 2 µg) para obter-se uma caracterização satisfatória. Tal condição restringe a utilização da técnica para estudos populacionais e análises retrospectivas. Os métodos de caracterização molecular que se baseiam na amplificação de fragmentos de DNA pela técnica da reação em cadeia polimerase (PCR) permitem obter uma tipagem genética equivalente ao método tradicional a partir de quantidades muito menores de DNA, reduzindo o tempo necessário de cultivo das micobactérias e possibilitando a análise molecular mesmo em meios de cultura danificados, ressecados e até inviáveis. Por propiciar o mesmo grau de diferenciação filogenética também em amostras contendo pequenas quantidades de DNA de *M. tuberculosis*, o método conhecido como “*mixed-linker PCR DNA fingerprinting*” está sendo cada vez mais empregado para a análise epidemiológica molecular da tuberculose (HAAS et al., 1993; BURGER et al., 1998; KREMER et al., 1999; DALL’STELLA et al., 2007). Estes dados são analisados e comparados por programas computacionais específicos de modo a permitir a identificação e diferenciação de linhagens de *M. tuberculosis*. Nesta análise, será considerada a já estabelecida utilidade do método para caracterização molecular de *M. tuberculosis* visando a seleção de linhagens para as etapas de clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes envolvidas na resposta imune à tuberculose. As etapas do processo de caracterização molecular de *M. tuberculosis* podem ser observadas no fluxograma da Figura 8.

FIGURA 8- FLUXOGRAMA DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *M. tuberculosis*

4.2.1 Extração de DNA

O processo de extração de DNA de todos os isolados clínicos deste trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística do Paraná (LGMF/IC). De três a 10 colônias crescidas em meio sólido foram retiradas e ressuspendidas em 500 μ L de água ou solução fisiológica estéreis em microtubos e inativadas por incubação dos tubos a 80°C durante 30 minutos. Após inativação, as amostras foram lisadas pela técnica de congelamento-aquecimento (*freeze-thawing*) que consiste em três ciclos de 30

minutos, inicialmente submetendo-se a amostra a 80°C seguido de incubação em gelo seco.

4.2.2 Leitura das Concentrações de DNA

A verificação analítica da concentração de DNA foi realizada na Seção de Imunogenética e Biologia Molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), utilizando-se um espectrofotômetro Ultravioleta Biophotometer 8,5 mm Light center height, Lichstrahlhöhe (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). As amostras foram diluídas 1:500, em volume total de 500 µL e as leituras foram feitas em comprimento de onda 260/280 nm utilizando-se cubetas de quartzo, consistindo o controle negativo (branco) de água ultrapura.

4.2.3 Procedimentos para Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Todos os procedimentos de reação de PCR para caracterização molecular de isolados clínicos de *M. tuberculosis* foram realizados no Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística do Paraná (LGMF/IC). A extração do DNA, a preparação da mistura de reação, a amplificação e a detecção dos produtos amplificados foram realizadas em salas separadas para evitar contaminação. Os procedimentos de preparo da mistura de reação foram executados em Cabine de Segurança tipo II. Para validação dos resultados da PCR, foram utilizados a cepa *M. tuberculosis* H37Rv e água ultrapura como controles positivo e negativo, respectivamente. O Quadro 2 mostra os oligonucleotídeos iniciadores de reação utilizados na construção do *linker* e nas etapas de reação de mixed-linker PCR DNA fingerprinting realizadas. Todos os iniciadores de reação foram sintetizados pela Gibco BRL® Life Technologies, Rockville, MD, USA.

QUADRO 2- SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DO *LINKER* E NA AMPLIFICAÇÃO POR MIXED-LINKER PCR DNA FINGERPRINTING

| OLIGONUCLEOTÍDEO | SEQÜÊNCIA | TAMANHO |
|------------------|-------------------------------|---------|
| IS04-92 | UGC GAG UCG AGG UCA GUU CT | 20 pb |
| IS08-92 | AGA ACT GAC CTC GAC TGG CAC G | 22 pb |
| IS09-92 | AGA ACT GAC CTC GAC TCG CA | 20 pb |
| IS54-92 | TCG ACT GGT TCA ACC ATC GCC G | 22 pb |
| IS62-92 | ACC AGT ACT GCG GCG ACG TC | 20 pb |

Mixed-linker PCR DNA fingerprinting: Descrição do método

O DNA genômico é submetido à digestão com enzima de restrição *HhaI* e um ligante, previamente construído, é unido às extremidades coesivas dos fragmentos de restrição gerados. O ligante é denominado *mixed-linker* por ser constituído por um oligonucleotídeo dupla-cadeia, uma das quais contendo timina e a outra composta por uracila no lugar de timina. Os resíduos de uracila são, em seguida, removidos por tratamento com N-uracil glicosilase (UNG). Esta etapa é seguida por uma PCR utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores da reação, sendo um específico à seqüência de inserção *IS6110* e outro ao ligante. A seqüência do iniciador ligante-específica é idêntica à cadeia deste, composta por timina, exceto pela ausência de dois nucleotídeos complementares à extremidade coesiva 3' criada pela digestão com enzima *HhaI*. No primeiro ciclo da PCR, apenas fragmentos de restrição contendo a seqüência *IS6110* servirão como molde para o iniciador *IS6110*-específico e é a extensão desta cadeia que regenera o alvo de anelamento para o iniciador ligante-específico. Após 30 ciclos, os produtos de PCR são reamplificados em uma *semi-nested* PCR, desta vez com um segundo iniciador específico para *IS6110*. Finalmente, um padrão de polimorfismo de comprimento de fragmentos gerados por restrição com *HhaI* poderá ser analisado, diretamente, por uma eletroforese em gel dos produtos de PCR.

Procedimentos

Em uma primeira etapa, um ligante, denominado *mixed-linker*, foi construído por meio do anelamento do oligonucleotídeo IS04-92, contendo uracila, com seu oligonucleotídeo complementar, IS08-92, contendo timina. Os dois oligonucleotídeos foram misturados em uma taxa molar de 1:1 em tampão de PCR (10 mM Tris-HCl [pH 8,3], 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂). Para um volume final de 100 µL, foram misturados 10 µL de tampão de PCR 10x, 6 µL de cloreto de magnésio 25 mM e 100 pmol de cada oligonucleotídeo. Em termociclador (Perkin-Elmer 3700 Cetus, Norwalk, EUA) a mistura foi aquecida a 95°C durante 15 minutos, seguido de três ciclos de 60°C durante 5 minutos e 45°C por 10 minutos. O produto gerado foi um *mixed-linker* não fosforilado, composto por uma cadeia contendo uracila no lugar de timina, apresentando uma extremidade coesiva 3' compatível com fragmentos de restrição produzidos por digestão com a enzima *HhaI*.

A seguir, 2 µL do sobrenadante das amostras após extração de DNA (correspondente a quantidades de 100 a 400 µg de DNA genômico) foram digeridos com 10 unidades de *Hha I* em banho-maria a 37°C durante 1 hora; um décimo do volume dos produtos de restrição foi transferido para novos tubos contendo excesso molar (1.000 vezes) de *mixed-linker* previamente construído e 1 U de T4 DNA Ligase. Os tubos foram mantidos a 16°C por 16 horas para ligação das extremidades com o ligante. As amostras foram submetidas à nova digestão com 10 U de *Hha I* a 37°C durante 30 minutos. Metade do volume da segunda digestão foi transferida para novos tubos contendo 1 U de UNG e tampão de PCR 10x, num volume total de 25 µL. Em termociclador, os tubos foram incubados a 50°C durante 20 minutos, seguidos de 94°C por 15 minutos e resfriados a 4°C indefinidamente. A primeira amplificação foi realizada adicionando-se aos tubos de reação de PCR 0,5 U de *Taq* DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeos trifosfatos e 1 µM de cada oligonucleotídeo (IS54-92 e IS09-

92). A amplificação ocorreu com desnaturação a 94°C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de 94°C por 2 minutos, anelamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 2 minutos e extensão da cadeia a 72°C durante 2 minutos e 30 segundos; a amplificação *nested* foi realizada com 10 µL do produto da primeira PCR diluído 1:100, utilizando-se 15 ciclos com os oligonucleotídeos IS62-92 e IS09-92, permanecendo as temperaturas e as condições de reação idênticas às da primeira amplificação.

4.2.4 Eletroforese e Detecção de DNA em Gel

A visualização das bandas geradas por mixed-linker PCR DNA fingerprinting foi feita por meio de corrida eletroforética de gel de poliacrilamida (Acrilamida 7,875 g, bisacrilamida 0,375 g, Glicerol 7 mL, tampão TRIS 33 mM qsp 105 mL; pH 4,5). O alinhamento das bandas foi realizado com Stacking Gel (Acrilamida 3 g, bisacrilamida 0,144 g, glicerol 2 mL, tampão TRIS 33 mM qsp 105 mL; pH 4,5). O tampão de corrida foi TBE 0,5X (solução estoque 10X: TRIS 60,55 g, ácido bórico 30,91 g, EDTA 0,5M 20 mL, água bidestilada qsp 500 mL; pH 8,5). O gel foi carregado com 8 µL de DNA e 2 µL de corante *Ficoll Loading Buffer* (Azul de bromofenol 0,25 g, xileno cianol 0,24 g, ficoll tipo 400 15 g, água ultrapura qsp 100 mL). Nos experimentos foi utilizada cuba eletroforética Gibco V 16-2 e espaçadores 1,5 mm. O tempo de corrida foi de aproximadamente 18 horas (35 Volts). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio em concentração final de 0,5 µg/mL, em tampão TBE (Tris-Borato EDTA).

4.2.5 Análise dos Genótipos

Para analisar a variabilidade genética das 62 cepas de *M. tuberculosis*, foram estimadas as distâncias genéticas entre cada isolado estudado, com base no polimorfismo de padrão de bandas obtidas. Uma matriz de similaridade

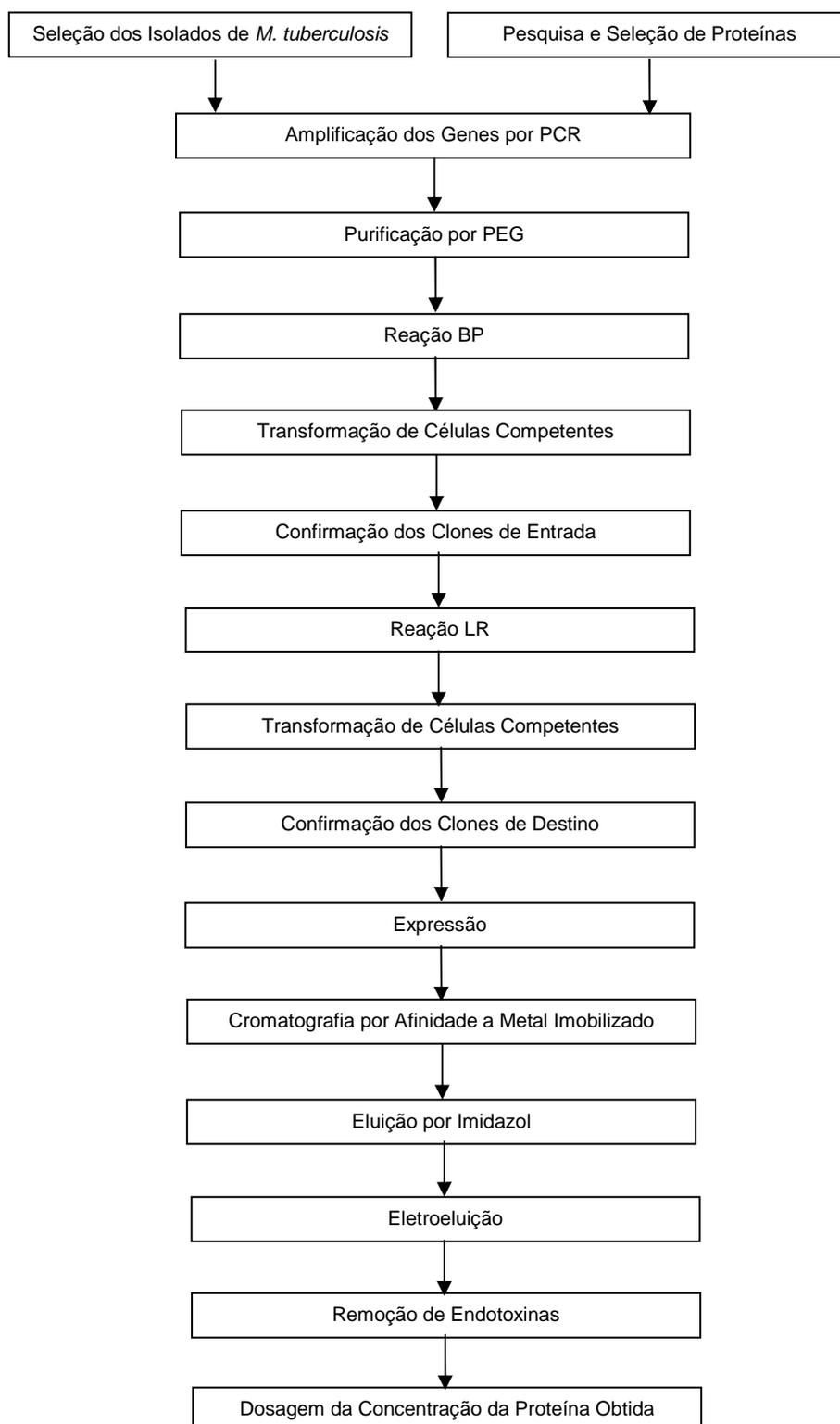
genética, baseada na presença de bandas, foi gerada usando o coeficiente de Dice (DICE, 1945).

Os padrões de bandas gerados foram analisados pelo *software* BiImaging Systems UVP (UVP Inc.), o qual realizou a contagem de bandas com intensidade de fluorescência maior que o fundo, identificando o tamanho em nucleotídeos de cada banda. A partir dessa quantificação numérica do tamanho das bandas, foi realizada a análise fenética calculando a distância de Dice (DI) entre duas cepas.

4.3 SELEÇÃO DE PROTEÍNAS DE SECREÇÃO DE *M. tuberculosis*, AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

Todos os procedimentos de amplificação de proteínas de secreção de *M. tuberculosis*, clonagem, expressão e purificação foram realizados no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) e estão representados no fluxograma da Figura 9.

FIGURA 9- FLUXOGRAMA DOS PROCESSOS DE SELEÇÃO DE PROTEÍNAS DE SECREÇÃO, AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO



4.3.1 Pesquisa e Seleção de Proteínas Candidatas para Produção de Antígenos Recombinantes

Com base na descrição da sequência dos 4.411.529 pares de base do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (COLE et al., 1998) e nos estimados 3.924 genes codificantes de proteínas, foram selecionadas na literatura (*NCBI – National Library of Medicine, PubMed, Protein, Related Sequences*) 25 proteínas pertencentes a uma família de antígenos ativamente secretados em caldo de cultura (Tabela 1). A relação dos genes e das respectivas seqüências nucleotídicas codificantes de proteínas podem ser observadas no Anexo 1.

TABELA 1- RELAÇÃO DAS 25 PROTEÍNAS DE SECREÇÃO EM CULTURA DE *M. tuberculosis* SELECIONADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE SEUS REPECTIVOS GENES

| PROTEÍNA | GENE | PB |
|-------------|---------|------|
| DPPD | Rv0061 | 426 |
| MTV027.14c | Rv3879c | 2190 |
| MTV033.1 | Rv0203 | 411 |
| MTCY50.11 | Rv1271c | 342 |
| CFP10 | Rv3874 | 303 |
| TB10.4 | Rv0288 | 291 |
| TB10.3 | Rv3019c | 291 |
| CFP6 | Rv3004 | 339 |
| TB18.5 | Rv0164 | 486 |
| MTSP11 | Rv3204 | 306 |
| MTV027.15c | Rv3880c | 242 |
| MTCY1A11.06 | Rv1837c | 2226 |
| HSP16.3 | Rv2031c | 435 |
| MTV025.111 | Rv3763 | 480 |
| PSTS1 | Rv0934 | 1125 |
| ESAT-6 | Rv3875 | 288 |
| MTC28 | Rv0040c | 933 |
| MPT32 | Rv1860 | 978 |
| MPT51 | Rv3803c | 900 |
| MPT63 | Rv1926c | 480 |
| MPT64 | Rv1980c | 687 |
| MPT70 | Rv2875 | 582 |
| MPT83 | Rv2873 | 663 |
| PPE68 | Rv3873 | 1107 |
| PPE41 | Rv2430c | 585 |

NOTA: PB, tamanho em pares de base do gene

4.3.2 Amplificação dos Genes

Foram desenhados e sintetizados oligonucleotídeos iniciadores de reação baseados na seqüência dos alvos referente à informação codificante de proteínas. Foram adicionadas duas seqüências distintas aos iniciadores de reação gene-específicos, contendo os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* para a posterior clonagem. Aos iniciadores senso da região codificante de proteína foi adicionada a seqüência abaixo, onde pode ser notado, em negrito, o segmento contendo o sítio de recombinação *attB1*.

5' – **GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC** (seqüência de 18 a 25 nucleotídeos gene-específica) – 3'

Aos iniciadores anti-senso da região codificante de proteína foi adicionada a seqüência abaixo, onde pode ser observado, em negrito, o segmento contendo o sítio de recombinação *attB2*. O códon de parada para a expressão das proteínas de interesse está sublinhado.

5' – **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA** (seqüência de 18 a 25 nucleotídeos gene específica) – 3'

Foram realizados ensaios com diferentes temperaturas de ciclagem e de concentrações de reagentes visando a otimizar a performance da PCR. Todas as amplificações foram realizadas com a enzima *High-Fidelity Triple Master Enzyme* (Eppendorf), uma mistura de DNA polimerases termoestáveis, indicada para processos de clonagem pela alta fidelidade e processividade alcançados. A partir da padronização das condições de PCR, foi realizada a amplificação dos genes. Os genes foram divididos em duas categorias baseadas no tamanho, a saber, genes com até 1500 pares de bases de tamanho e genes com mais de 1500 pares de bases de tamanho.

As condições de amplificação foram as seguintes: 94°C por 2 minutos; 10 ciclos de 94°C (30 segundos), 57°C (30 segundos) e 72°C por 1,5 minuto; 25 ciclos de 94°C (30 segundos), 62°C (30 segundos) e 72°C por 1,5 minuto.

Os genes com tamanho superior a 1500 pares de base tiveram o tempo de extensão a 72°C aumentado para 3 minutos. As concentrações dos reagentes utilizados, por amplificação, foram as seguintes: - Iniciadores senso e antisenso (0,5 μ M cada); - DNA genômico (100 η g); - Tampão (HighFidelity Buffer) 1X; $MgCl_2$ (2,5 mM);- dNTP (200 μ M cada); - Enzima Triple Master (1 U).

Os genes com tamanho superior a 1500 pares de base tiveram a concentração da enzima aumentada para 3 U/reação. Após a amplificação dos produtos foram realizadas eletroforeses em gel de agarose para verificação do padrão e qualidade de amplificação.

4.3.3 Purificação dos Produtos de PCR Contendo o Sítio de Recombinação *attB*

A purificação dos produtos de PCR gerados, contendo o sítio de recombinação *attB*, foi realizada pela precipitação com polietilenoglicol (PEG) de fragmentos de pequeno tamanho, de modo a remover dímeros e excesso de iniciadores de reação. Ao produto de PCR acrescentou-se glicogênio (1 μ L), sendo adicionado tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8) em volume quatro vezes superior ao volume total da reação de PCR. A seguir, acrescentou-se PEG (30% PEG 8000, 30 mM $MgCl_2$, Invitrogen), 50% v/v. As soluções foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e descartado, sendo o *pellet* ressuspenso em 10 μ l de tampão TE. Finalmente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificar a eficiência da precipitação e submetidas à dosagem utilizando espectrofotômetro.

4.3.4 Clonagem em Sistema Gateway®

Após a amplificação dos genes selecionados e purificação dos produtos de PCR contendo o sítio de recombinação *attB*, foi realizada a etapa de clonagem

baseada em uma plataforma comercial denominada Gateway® (INVITROGEN, 2003). A tecnologia Gateway® é um método de clonagem universal baseado nas propriedades de recombinação sítio-específicas do bacteriófago lambda no cromossomo da *E. coli* (LANDY, 1989).

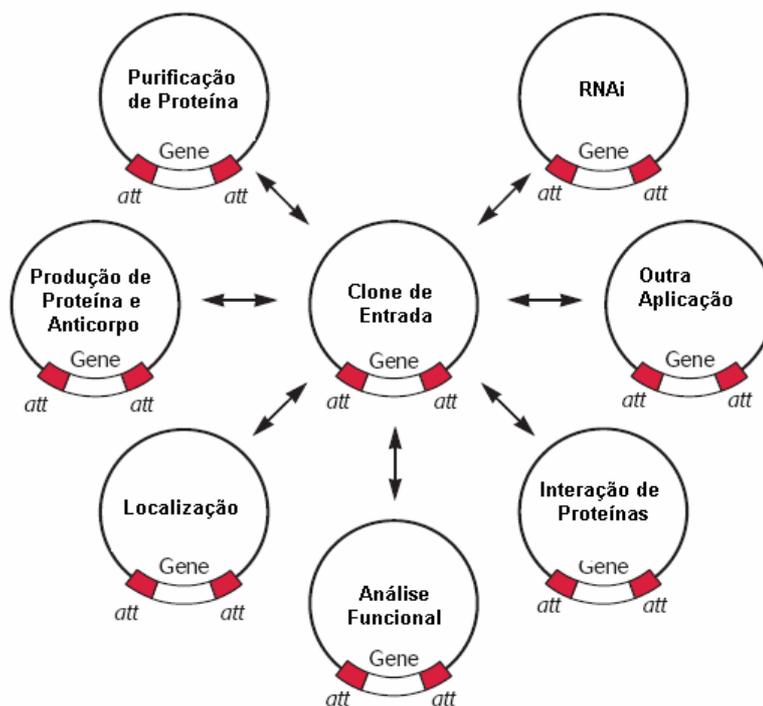
A integração do genoma do fago no cromossomo da bactéria ocorre via recombinação intermolecular mediada por uma mistura de proteínas expressas por ambos os organismos. A reação de recombinação ocorre entre sítios específicos de interação (*att*) presentes nas moléculas de DNA dos dois organismos – *attB* no cromossomo da *E. coli* e *attP* no cromossomo do bacteriófago – de modo conservativo, portanto, sem perda ou ganho de nucleotídeos. Esta reação é catalisada por uma mistura de enzimas que se ligam a seqüências específicas (sítios *att*), aproximando-as, clivando-as e unindo-as de forma covalente. As proteínas envolvidas na reação dependem da via metabólica do bacteriófago lambda utilizada, se o ciclo lisogênico ou o lítico. O ciclo lisogênico é catalisado pelas proteínas Integrase (Int) e Fator de Integração do Hospedeiro (IHF), expressas pelo bacteriófago lambda e pela bactéria *E. coli*, respectivamente. Já a via lítica é catalisada pelo IHF da *E. coli* e pelas enzimas Int e Excisionase (Xis) do fago lambda (PTASHNE, 1992).

No ciclo lisogênico, a recombinação do bacteriófago lambda com o cromossomo da *E. coli* ocorre entre as regiões *attB* e *attP*, resultando na formação de novos sítios de interação, chamados *attL* e *attR*. No ciclo lítico, a recombinação do bacteriófago lambda com o cromossomo da *E. coli* ocorre entre as regiões *attL* e *attR*, resultando no restabelecimento dos sítios de interação *attB* e *attP*. Essas reações são específicas e direcionais, de modo que *attB*₁ recombina exclusivamente com *attP*₁; *attB*₂ com *attP*₂; *attL*₁ com *attR*₁; e *attL*₂ com *attR*₂ (HARTLEY et al., 2000).

A plataforma Gateway® permite realizar clonagem por recombinação sítio-específica, proporcionando um meio rápido e eficiente de mover seqüências de DNA entre múltiplos sistemas vetoriais para caracterização, análise funcional e

expressão protéica (Figura 10), eliminando diversas etapas laboriosas de clonagem e subclonagem tradicionais.

FIGURA 10- POSSIBILIDADES DE UTILIZAÇÃO DO SISTEMA GATEWAY® A PARTIR DA OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA CONTENDO O GENE DE INTERESSE



FONTE: INVITROGEN, 2003

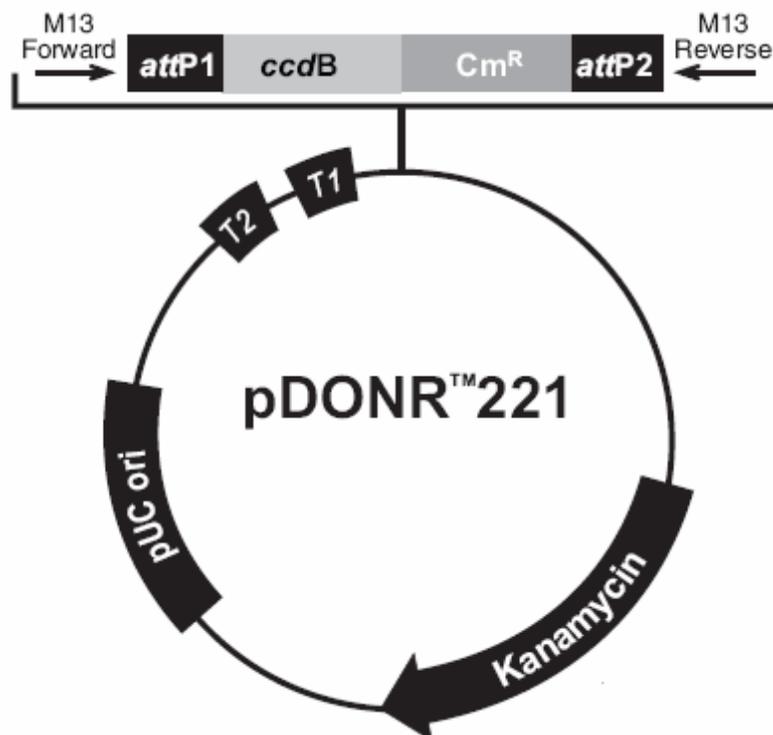
Para que um produto amplificado a partir de um determinado gene de interesse ingresse nesta plataforma é necessário um vetor doador que possibilite a clonagem direcional de produtos de PCR e a formação de um clone de entrada, empregando uma estratégia de amplificação direta, a partir de iniciadores contendo os sítios de recombinação attB. Tal recombinação, chamada de reação BP, simula, *in vitro*, as interações ocorridas no ciclo lisogênico do bacteriófago lambda (Figuras 11 e 13). Foi escolhido o vetor doador pDONR™221 (Invitrogen), representado na Figura 12.

FIGURA 11- ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO BP DE FORMAÇÃO DO CLONE DE ENTRADA COM A SEQUÊNCIA DE INTERESSE



FONTE: INVITROGEN, 2003

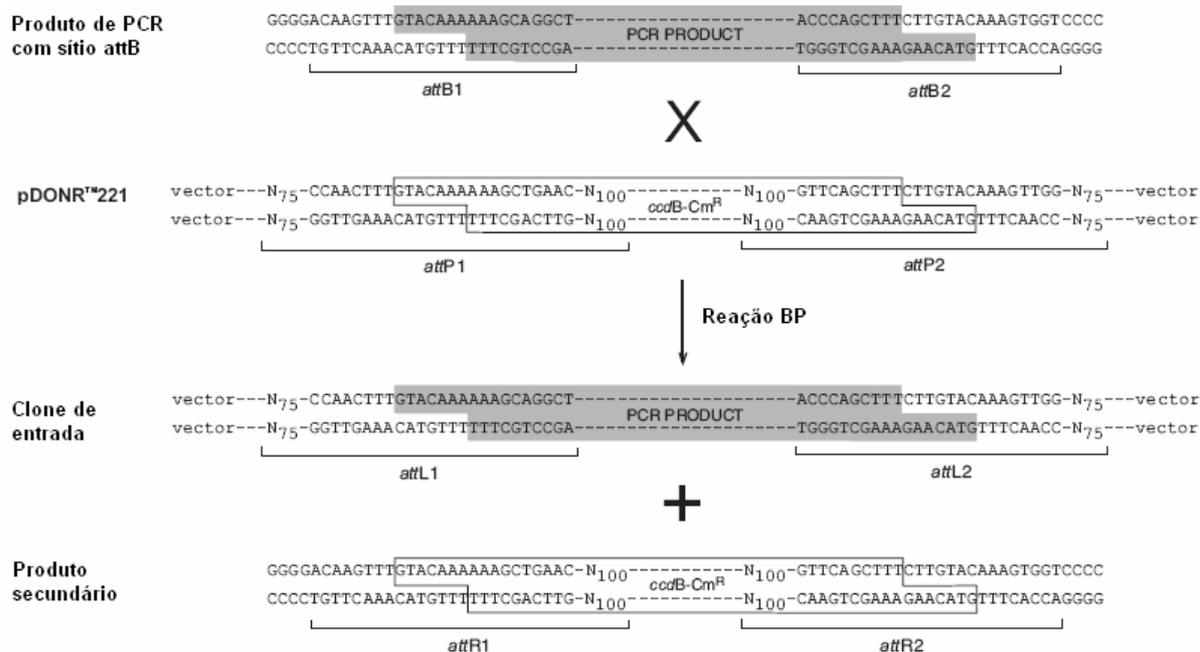
FIGURA 12- DESENHO ESQUEMÁTICO DO VETOR DOADOR pDONR™221



FONTE: INVITROGEN, 2003

NOTA: M13 Forward = sítio para iniciador M13 seqüência senso ; attP1 = sítio de recombinação específica attP1; ccdB = gene para proteína CcdB; Cm^R = gene de resistência a cloranfenicol; attP2 = sítio de recombinação específica attP2; M13 Reverse = sítio para iniciador M13 seqüência anti-senso ; Kanamycin = gene para resistência a canamicina; pUC ori = sítio de origem de replicação pUC; T1 = seqüência de terminação de transcrição rrmB T1; T2 = seqüência de terminação de transcrição rrmB T2

FIGURA 13- ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO BP DE FORMAÇÃO DO CLONE DE ENTRADA COM A SEQUÊNCIA DE INTERESSE



FONTE: INVITROGEN, 2003

NOTA: As regiões sombreadas correspondem às seqüências transferidas do produto de PCR-*attB* ao vetor doador pDONR™221 formando o clone de entrada. As regiões delimitadas em caixas correspondem às seqüências transferidas do vetor doador pDONR™221 ao produto secundário.

Uma vez obtido o clone de entrada é possível inseri-lo em diversas plataformas por meio de nova recombinação sítio-específica, chamada reação LR (Figuras 14 e 16). Para expressão heteróloga de proteínas em *E. coli*, optamos pela recombinação com o vetor de destino pDEST™17 (Invitrogen) para obtenção do clone de expressão (Figura 15).

Ambos os vetores escolhidos, pDONR™221 e pDEST™17, possuem dois sítios de recombinação específicos (*attP* e *attR*, respectivamente) flanqueando um cassete gênico contendo um gene de resistência a cloranfenicol (Cm^R) e um gene para seleção negativa (*ccdB*) do clone transformado, conforme pode ser observado nas Figuras 12 e 15. Após a reação de recombinação BP ou

LR, seus cassetes são substituídos pelo gene de interesse, gerando os clones de entrada e de expressão, respectivamente.

A presença do gene *ccdB* permite a seleção negativa dos vetores (doador e de destino) em *E. coli* após a recombinação e transformação. O gene *ccdB* codifica uma proteína (CcdB) que interfere na enzima DNA girase da *E. coli* inibindo seu crescimento (BERNARD; COUTURIER, 1992). Quando uma reação de recombinação ocorre – seja entre o vetor doador e um produto de PCR-*attB*, ou entre o vetor de destino e um clone de entrada – o gene *ccdB* é substituído pela seqüência de interesse. Eventuais células que apresentem vetores não reativos carregando o gene *ccdB* não crescerão em meio de cultura, permitindo assim uma eficiência elevada na recuperação dos clones desejados.

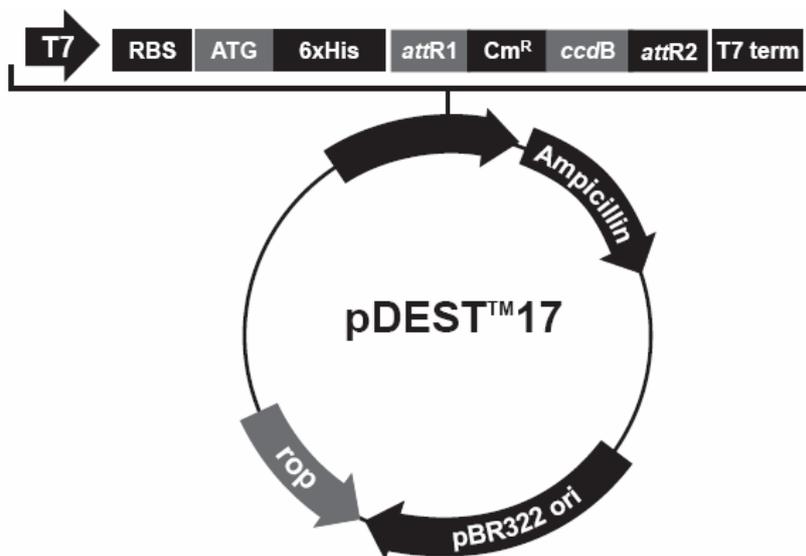
A perda do gene Cm^R devido à reação de recombinação torna os clones sensíveis a cloranfenicol, porém cada vetor seguirá carregando um gene de resistência a antibiótico (canamicina e ampicilina em pDONR™221 e pDEST™17, respectivamente), permitindo a seleção positiva dos clones transformados em meios de cultura contendo o antibiótico adequado.

FIGURA 14- ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO LR DE FORMAÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO COM A SEQUÊNCIA DE INTERESSE



FONTE: INVITROGEN, 2003

FIGURA 15- DESENHO ESQUEMÁTICO DO VETOR DE DESTINO PLASMÍDEO pDONR™17



FONTE: INVITROGEN, 2003

NOTA: T7 = sítio do promotor T7; RBS = sítio de ligação de ribossomos; ATG = códon de iniciação ATG; 6xHis = seqüência codificante de seis resíduos consecutivos de histidina; *attR1* = sítio de recombinação específica *attR1*; Cm^R = gene de resistência a cloranfenicol ; *ccdB* = gene para proteína CcdB; *attR2* = sítio de recombinação específica *attR2*; T7 term = região de terminação de transcrição T7; Ampicillin = gene para resistência a ampicilina; pBR322 ori = sítio de origem de replicação pBR322; rop = quadro de leitura aberto rop

etapa, foi adicionado 2 μg de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37°C, interrompendo assim a reação de recombinação.

A transformação foi realizada com células cálcio competentes de *E. coli* linhagem DH5 α . Trata-se de um processo simples que consistiu em acrescentar 1 μL da reação BP a 50 μL de células cálcio-competentes. Estas células permaneceram em gelo por 30 minutos, em seguida, foram incubadas a 42°C por 2 minutos e então colocadas novamente em gelo.

Após a transformação, as células foram cultivadas em 1 mL de meio Luria Bertani (LB; Triptona 0,1%, Extrato de Levedura 0,05% e Cloreto de Sódio 0,1%) por uma hora a 37°C, para em seguida serem centrifugadas a 4.000 g por 5 minutos e incubadas para crescimento em placa com meio LB contendo canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37°C durante 15 horas.

4.3.4.2 Confirmação dos clones de entrada

Para verificar a presença de clones com os insertos desejados contendo os genes de interesse foram realizadas *masterplates* e PCRs de colônia. A *masterplate* consiste em um repique em meio de cultura onde as colônias isoladas são referenciadas por um número. A PCR de colônia foi realizada pelo preparo de uma mistura de reação contendo dNTPs (0,2 mM cada), MgCl_2 (1,5 mM), iniciadores de reação dos genes de interesse (2 μM cada), enzima Taq polimerase (1,5 U) e seu tampão de reação próprio (1x). Todos os reagentes utilizados foram fabricados pela Invitrogen. Em seguida, uma colônia isolada e identificada por um número em *masterplate* foi transferida ao tubo de reação previamente contendo a mistura de PCR. As condições da amplificação foram as seguintes: aquecimento inicial a 94°C por dois minutos; 35 ciclos de 94°C (30 segundos), 62°C (30 segundos) e 72°C por 1,5 minuto ; aquecimento final de 72°C por 5 minutos.

Após a finalização da PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose para verificação e escolhas das colônias contendo os clones desejados. As colônias selecionadas foram submetidas a repique em placa de cultura contendo meio LB e canamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 15 horas. A seguir, foi retirada uma colônia de cada placa contendo os genes de interesse, e realizado um subcultivo em 10 mL de meio LB contendo canamicina (50 µg/mL), para obtenção dos plasmídeos, o qual foi incubado por 15 horas a 37°C sob agitação (220 rpm).

A seguir, deu-se início ao processo de purificação dos plasmídeos, utilizando o Kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). As células bacterianas positivas foram ressuspensas em 250 µL de tampão P1 e transferidas para tubo de microcentrífuga. Foram adicionados em cada amostra 250 µL de tampão P2, sendo homogeneizadas por inversão de 4 a 6 vezes. A seguir, 350 µL de tampão N3 foram adicionados e os tubos homogeneizados por inversão de 4 a 6 vezes. Todos os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 17.900 g, sendo, a seguir, separado o sobrenadante para uma coluna *QIAprep spin*. Cada amostra foi centrifugada por 30 a 60 segundos e o líquido eluído descartado. As colunas *QIAprep spin* foram lavadas por adição de 750 µL de tampão PE e centrifugação de 30 a 60 segundos. Novamente, a fase líquida eluída foi removida, assim como resíduos de tampão PE. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga, sendo adicionado ao centro da coluna 50 µL de tampão EB (10 mM Tris-HCL, pH 8,5), mantida em repouso por 1 minuto e centrifugada também por 1 minuto. O volume eluído final, contendo o plasmídeo purificado, foi submetido à mensuração da concentração por espectrofotômetro.

Os plasmídeos purificados foram submetidos a seqüenciamento de ácido nucléico pela metodologia de terminação em cadeia, empregando-se sistema comercial Big Dye™ (Applied Biosystems). Uma mistura de reação contendo tampão (Tris HCl pH 9,0; MgCl₂ 50 mg/mL e água ultrapura), Big Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (AmpliTaQ DNA Polimerase,

cloreto de magnésio, dNTP e ddNTP terminator) e os oligonucleotídeos iniciadores de reação, foi alíquotada em microtubos de reação e posteriormente adicionado o plasmídeo purificado.

O programa de seqüenciamento consistiu em 25 ciclos de 96°C por 10 segundos; 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a remoção da placa de reação do termociclador, foi adicionado 80 mL de isopropanol 75%, sendo homogeneizado 15 vezes por inversão. Após repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos e o sobrenadante desprezado. A seguir, foram adicionados 200 mL de etanol 70% e os tubos centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Os tubos foram invertidos em papel absorvente e secados em Speed Vac por 10 min. O DNA foi ressuspensão em 10 mL de Hi-Di formamida. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e, a seguir, colocadas em seqüenciador automatizado de DNA por eletroforese capilar e sistema de detecção de fluorescência laser induzida ABI 3.100 (Applied Biosystems).

Os arquivos produzidos pela corrida eletroforética capilar, contendo as informações de emissão de fluorescência, denominados eletroferogramas, foram analisados com auxílio do software Phred/Phrap/Consed. Após a obtenção das seqüências, procedeu-se ao alinhamento das mesmas por meio do software Clustal.

4.3.4.3 Reação de recombinação LR e transformação de células competentes

A reação de recombinação entre os sítios *attL*, flanqueando o gene de interesse no clone de entrada, e os sítios *attR*, presentes no vetor de destino pDEST™17, é denominada de reação LR. A reação foi realizada conforme orientações do fabricante (Gateway LR Clonase 2 Enzyme mix, Invitrogen). O processo consistiu em acrescentar a um microtubo 50 fmol de plasmídeo purificado contendo o gene de interesse, 150 ng do plasmídeo pDEST™17 e qsp

8 μL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8). Após, foram adicionados 2 μL de mistura de enzima (LR Clonase™ enzyme mix) para cada amostra, seguida de breve agitação. As reações foram incubadas a 25°C por duas horas. Após esta etapa, foi adicionado 2 μg de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37°C, interrompendo assim a reação de recombinação.

A transformação foi realizada novamente em células cálcio competentes de *E. coli* linhagem DH5 α . O processo consistiu em acrescentar 1 μL da reação LR a 50 μL de células cálcio-competentes. Estas células permaneceram em gelo por 30 minutos, em seguida, foram incubadas a 37°C por 2 minutos e então colocadas novamente em gelo. Após a transformação, as células foram cultivadas em 1 mL de meio LB por uma hora a 37°C, para em seguida serem centrifugadas a 4.000 g por 5 minutos e incubadas para crescimento em placa com meio LB contendo ampicilina (100 mg/mL) a 37°C durante 15 horas.

4.3.4.4 Obtenção e confirmação dos clones de destino

A confirmação da presença de clones com os insertos desejados foi realizada por meio de *masterplates* e PCRs de colônia, conforme procedimento descrito no item 4.3.4.2 deste trabalho.

4.3.5 Expressão das Proteínas

A expressão das proteínas foi dividida em duas etapas: Fase Teste, em menor escala, com o objetivo de verificar se a expressão foi alcançada; e Fase Produção, em maior escala, visando a produção de proteínas para posterior purificação, em quantidade suficiente para os ensaios biológicos subsequentes.

As células utilizadas para expressão foram *E. coli* da linhagem BL21pLysS. Os protocolos de execução de ambas as etapas foram idênticos, alterando-se apenas as quantidades utilizadas, maiores na Fase Produção. A

expressão das proteínas teve início com a transformação por choque térmico das células quimiocompetentes. Em 50 μ L de células, foram adicionados 600 η g de plasmídeo de expressão contendo o gene de interesse. As células foram então mantidas por 30 minutos no gelo e, em seguida, incubadas a 42°C por dois minutos, retornando-se ao gelo por mais três minutos. A seguir, foi acrescentado 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C por uma hora, sob agitação de 220 rpm. A seguir, as células foram inoculadas em 9 mL de meio LB contendo cloranfenicol (25 mg/L) e ampicilina (100 mg/L) e mantidas sob agitação de 220 rpm a 37°C, durante 15 horas. Após este período, um novo inóculo foi realizado em uma diluição de 1/10 em meio LB contendo cloranfenicol (25 mg/L) e ampicilina (100 mg/L). Na etapa de produção, os volumes finais de meio de cultivo variaram de 250 a 1.000 mL, de acordo com a necessidade de maior quantidade de proteína expressa por sua baixa concentração obtida na etapa de teste.

Após uma hora e meia a densidade óptica a 600 η m passou a ser monitorada, até que se obtivesse um valor de absorvância entre $0,8 \pm 0,1$. Uma alíquota de 2 mL foi retirada, denominada de amostra não induzida. A seguir, foi adicionado IPTG (0,1 mM) ao restante do cultivo, visando a indução da expressão da proteína. Esta amostra, juntamente com a amostra não induzida, foi colocada a 37°C por duas horas sob agitação de 220 rpm.

A cultura foi centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em tampão de sonicação (Tris-HCl 50mM pH 8). Em seguida, as células foram sonicadas por 20 segundos (potência 8), repetindo-se esse processo por mais quatro vezes. Após o procedimento, foi retirada uma alíquota de 50 μ L, denominada de amostra total. O restante foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a 4°C para obtenção das frações solúveis e insolúveis. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C, sendo esta porção denominada de fração solúvel. O *pellet* resultante foi ressuspenso em tampão de solubilização (uréia 8 M, imidazol 10 mM, NaCl 300 mM) e repetido o processo de sonicação sem alterações. A

amostra foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C, denominado de fração insolúvel.

A verificação do padrão de expressão para cada uma das proteínas foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com diferentes concentrações de acrilamida, de acordo com o peso molecular das proteínas, utilizando-se 30 mA de corrente elétrica por gel. Os géis foram corados com azul de comassie por 30 minutos, sendo retirado o excesso com solução de descoloração (metanol 30%, ácido acético 10%). Para a amostra controle, foi realizado crescimento da bactéria *E. coli* pLysS sem transformação em meio LB. As células foram centrifugadas a 4.000 g durante 15 minutos a 4°C e em seguida o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 e sonicado 5 vezes por 20 segundos. Foi separado 100 µL e adicionado 100 µL de Tris-HCl 50mM pH 8 e 0,5 µL de DNase NQI. Esse lisado foi incubado no gelo por uma hora e em seguida adicionado 50 µL de tampão de desnaturação de proteína para então serem colocados em banho-maria a 90°C durante dez minutos.

4.3.6 Purificação das Proteínas

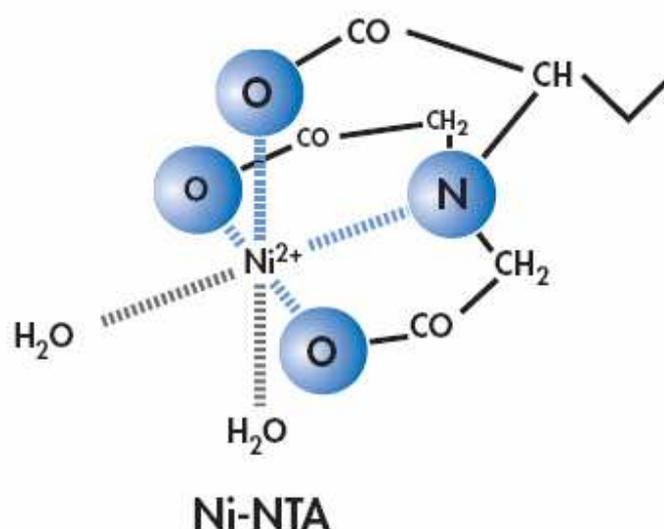
Proteínas recombinantes expressas em *E. coli* podem ser produzidas em forma solúvel, porém, em diversos casos, especialmente em alto níveis de expressão, sofrem agregação formando corpos de inclusão insolúveis. A formação de corpos de inclusão é influenciada pela natureza da proteína, pela célula hospedeira e pelo nível de expressão, resultados da escolha do vetor e das condições de indução e de crescimento. A purificação de proteínas de fusão marcadas com histidina, utilizando a cromatografia por afinidade a íons metálicos, pode ser realizada sob condições nativas e desnaturantes. A maior parte das proteínas em corpos de inclusão são solubilizadas, antes do processo de purificação ser iniciado, com detergentes ou substâncias desnaturantes, tais como uréia 8 M. A afinidade dos resíduos de histidina ao níquel permite a separação por

cromatografia das proteínas recombinantes. O posterior uso de imidazol, em concentrações de 100-250 mM e em condições de baixo pH (4,5-5,3), rompe a ligação histidina-íon níquel, liberando a proteína recombinante. Eletroforese em gel preparativo de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguido de eletroeluição e tratamento com detergente catiônico (Triton X-114) auxiliam na eliminação de proteínas contaminantes de variado peso molecular e de endotoxinas, respectivamente.

4.3.6.1 Cromatografia por afinidade a metal imobilizado

O ácido nitriloacético (NTA) é um adsorvente tetradentado de propriedade quelante que quando complexado com o metal níquel ocupa quatro dos seis sítios de ligação deste, deixando dois sítios livres para interação com os resíduos de histidina ligados à proteína recombinante (Figuras 17 e 18). NTA tem capacidade de ligar-se a metais ionizados de forma estável, retendo a ligação mesmo sob intensas lavagens estridentes.

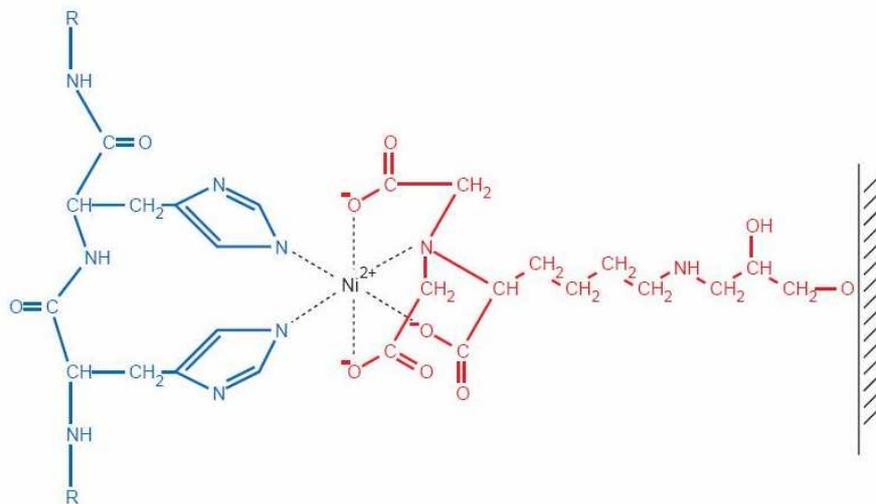
FIGURA 17- ESTRUTURA QUÍMICA DO Ni-NTA



FONTE: QIAGEN, 2003

NOTA: C = carbono; O = oxigênio; H = hidrogênio; CO = carbonila; H₂O = água; N = nitrogênio, Ni⁺² = níquel.

FIGURA 18- LIGAÇÃO QUÍMICA DO Ni-NTA COM RESÍDUOS DE HISTIDINA



FONTE: QIAGEN, 2003

NOTA: C = carbono; O = oxigênio; H = hidrogênio; CO = carbonila; H₂O = água; N = nitrogênio.

As proteínas recombinantes obtidas foram submetidas, após verificação de solubilidade, ao processo de purificação através de cromatografia por afinidade (QIAGEN, 2003). As proteínas recombinantes marcadas com seis resíduos consecutivos de histidina (6xHis), foram incubadas com resina contendo ácido nitriloacético em complexo de níquel (Ni-NTA). A afinidade da molécula de histidina pelo níquel permite a fixação da proteína recombinante à resina. Proteínas contaminantes, por não estarem marcadas com resíduos de histidina, são descartadas no processo.

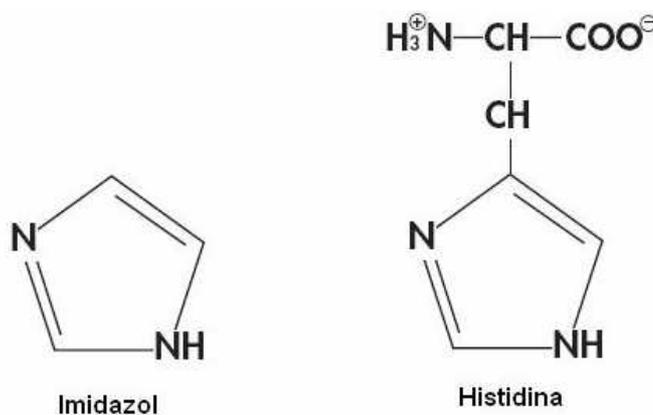
Primeiramente, as colunas são lavadas e equilibradas com a solução de lise (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 10 mM imidazol). Depois, os extratos protéicos são adicionados na coluna permitindo a fixação das proteínas marcadas com histidina à resina, sendo o fluido restante coletado e armazenado em tubo próprio, denominado de *flow-through*. Para retirar proteínas contaminantes da resina, foram realizadas 5 lavagens, cada qual com 10 mL de solução de lavagem (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 20 mM imidazol), sendo os fluidos resultantes

das lavagens também armazenados para posterior verificação da qualidade do processo de purificação.

4.3.6.2 Eluição com imidazol e eletroforese

O processo de eluição empregado foi baseado no aumento de molaridade de imidazol, substância que possui grande similaridade química com a histidina (Figura 19), mas que apresenta maior afinidade de ligação ao complexo Ni-NTA. Foram realizadas cinco eluições utilizando 0,5 mL de solução de eluição (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 250 mM imidazol), sendo que em cada processo de eluição foi coletado o eluído em tubos separados e armazenados a -20°C.

FIGURA 19- ESTRUTURA QUÍMICA DO IMIDAZOL E DA HISTIDINA



FONTE: QIAGEN, 2003

NOTA: C = carbono; O = oxigênio; H = hidrogênio; CO = carbonila; H₂O = água; N = nitrogênio.

Após cada processo de purificação, as amostras *flow-through*, os lavados e os eluídos foram analisados em eletroforese SDS-PAGE para verificar a qualidade da purificação. A concentração de acrilamida utilizada variou de 13 a 17%, dependendo do tamanho esperado das proteínas, utilizando 30 mA de corrente elétrica por gel. Os géis foram corados com azul de comassie por 30

minutos, sendo retirado o excesso com solução de descoloração (Metanol 30%, Ácido acético 10%).

4.3.6.3 Eletroforese SDS-PAGE em gel preparativo

Para garantir uma melhor qualidade na purificação das proteínas recombinantes, os extratos foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE em gel preparativo, visando a separação por peso molecular de possíveis contaminantes. A concentração de acrilamida utilizada oscilou de 13 a 17%, dependendo do tamanho esperado das proteínas, sendo utilizado 15 mA de corrente elétrica por gel. Após o término, o gel foi submetido à coloração por KCl 1 M, sendo a banda correspondente ao polipeptídeo desejado seccionada do gel com auxílio de um bisturi, para ser submetida ao processo de eletroeluição.

4.3.6.4 Eletroeluição

O processo de eletroeluição consiste em remover a proteína desejada do gel de poliacrilamida utilizando corrente elétrica. A banda com a proteína de interesse foi colocada em uma membrana de diálise (Sigma-Aldrich) sendo adicionado 1 mL de tampão de SDS-PAGE (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%) e então, as extremidades da membrana foram lacradas. Estas foram a seguir colocadas em uma cuba eletroforética contendo tampão SDS-PAGE e submetidas a uma corrente elétrica de 50 mA por 2 horas. Após este período a fração solúvel de dentro da membrana foi coletada e todo o processo repetido para a obtenção de uma maior quantidade da proteína recombinante. As proteínas eletroeluídas foram submetidas à nova eletroforese SDS-PAGE e armazenadas a -20°C.

4.3.6.5 Tratamento com Triton X-114

A remoção de endotoxinas, essencialmente lipopolisacarídeos (LPS) derivados de paredes celulares de bactérias gram-negativas, foi realizada com auxílio de detergente catiônico, Triton X-114 (LIU et al.,1997). Triton X-114 foi adicionado à preparação protéica em uma concentração final de 1% v/v. A mistura foi incubada a 4°C por 30 minutos em constante agitação. A amostra foi transferida para um banho-maria a 37°C, incubada por 10 minutos e centrifugada por 20.000 g. A fase aquosa, com a proteína recombinante, foi cuidadosamente removida e o processo de remoção de endotoxinas foi repetido por mais duas vezes.

4.3.6.6 Dosagem da concentração de proteína

A dosagem foi feita utilizando o programa Lab Works 3.0.2 (UVP Inc) que utiliza a imagem da eletroforese obtida para fornecer a concentração relativa. Para confirmação, foi realizada dosagem por fluorimetria pelo sistema comercial Quant-IT™ (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Uma solução de trabalho foi preparada pela diluição 1:200 do reagente de proteína Quant-IT™ em tampão de proteína Quant-IT™. A seguir, em microtubo grau óptico, foi adicionado 190 µL da solução de trabalho e 10 µL da amostra ou do padrão. Três padrões de concentrações conhecidas foram utilizados (0, 200 e 400 ng/µL). Após homogeneização, as amostras e padrões foram mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foram realizadas as leituras em fluorímetro Qubit™ (Invitrogen), sendo os valores multiplicados pelo fator de diluição apropriado.

4.4 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.4.1 Avaliação da Imunidade Humoral por Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Para fazer uma triagem de atividade sorológica das proteínas recombinantes produzidas, foram realizados testes ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para pesquisa de anticorpos em soros de coelhos hiperimunizados com *M. tuberculosis*.

Previamente, foram imunizados coelhos albinos da raça Nova Zelândia. Após um período de adaptação de 10 dias os coelhos foram imunizados utilizando-se inóculo sensibilizante de *M. tuberculosis*. Cada animal recebeu um total de 3,0 mg de proteína de antígeno, divididos em 3 doses iguais. Os animais foram inoculados na região dorsal, por via subcutânea, em quatro pontos distintos. A primeira dose foi uma emulsão de 4 mL constituída de volumes iguais de solução antigênica e adjuvante de *Freund* completo. Após 30 dias foi inoculada a segunda dose, sendo volumes iguais de solução antigênica e adjuvante de *Freund* incompleto. Aos 45 dias do início da imunização os animais receberam a 3ª dose idêntica à segunda. Sangrias de prova foram realizadas nos dias 0, 15, 30, 45 e 53. Sangrias de produção foram realizadas nos dias 60, 62 e 64 pós-infecção. Os soros obtidos foram armazenados a -20°C até seu uso.

Um soro dos mesmos coelhos coletado imediatamente antes da sensibilização com *M. tuberculosis* foi utilizado como controle negativo. Como controle positivo foi usado antígeno solúvel de *M. tuberculosis* obtido com a cepa referência H37Rv. O controle de reações inespecíficas foi realizado com controles de antígeno (sem anticorpo) e de conjugado (sem antígeno).

Para determinação do nível de corte ("cut off") foi adotado o seguinte critério: as amostras foram consideradas positivas quando os valores de absorvância fossem iguais ou superiores à média do controle negativo acrescido de dois desvios-padrão da média.

Para realização dos testes ELISA, placas de poliestireno de fundo chato com 96 poços foram sensibilizadas com os antígenos (proteínas recombinantes) diluídos em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,159%, NaHCO_3 0,293%, pH 9,6) em concentrações de 250 e 1.000 ηg por poço e armazenadas a 4°C por 16 horas. A seguir, foram lavadas com solução de lavagem (NaCl 0,9%, Tween 20 0,05%). O bloqueio das placas foi realizado com 100 μL de solução de bloqueio (Caseína 2% em PBS), por poço, seguido de incubação a 37°C por 60 minutos. Após novas lavagens, foram adicionados, em cada poço, 100 μL de soro de coelhos hiperimunizados, testados nas diluições de 1:100 e 1:200, seguido de nova incubação a 37°C por 60 minutos. Após rigorosa lavagem, foram adicionados, por poço, 100 μL de conjugado anti-IgG de coelho diluído à 1:2.500 e submetido à nova incubação a 37°C por 60 minutos. Após nova lavagem, 100 μL de solução cromógena de ortofenilenodiamino (OPD 0,2%, H_2O_2 , Tampão Citrato pH 5,0) foram adicionados e as placas incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação de formação de cor foi interrompida com a adição de 20 μL de solução de parada (H_2SO_4 5%). Finalmente, a leitura das placas foi realizada em fotômetro Titertek, modelo MCC/340P v.2, em comprimento de onda de 492 ηm .

4.4.2 Avaliação da Imunidade Celular por Ensaio Biológicos

Todos os ensaios biológicos foram realizados na Divisão de Antígenos e no Laboratório de Controle Biológico do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). *Cavia porcellus* foram sensibilizados com inóculos preparados com massas bacterianas inativadas de *M. tuberculosis*. Após 30 dias da sensibilização, a tuberculina PPD padrão e as proteínas recombinantes produzidas no presente trabalho foram avaliadas, isoladamente e em combinações, mediante a realização de provas de potência relativa.

4.4.2.1 Preparação dos inóculos de *M. tuberculosis* para sensibilização de *C. porcellus*

Em cabine de fluxo laminar, próximo à chama e com auxílio de uma balança, 100 mg de massa úmida de micobactérias crescidas em meio de cultivo sólido de Middlebrook foram transferidas para um gral; igual quantidade de pedra pomes em pó estéril foi adicionada à massa bacteriana; a mistura foi homogeneizada com pistilo; 5 gotas de óleo mineral foram acrescentadas e a mistura foi novamente homogeneizada; mais óleo foi adicionado até qsp 25 mL e nova homogeneização foi realizada. O material foi filtrado através de funil com gaze de oito dobras para um balão, a seguir coberto com rolha. O inóculo foi inativado em autoclave com vapor fluente durante 1 hora. A suspensão foi homogeneizada vigorosamente e volumes de 4 mL foram distribuídos em frascos estéreis com rolha de borracha e guarnição de alumínio, identificados com a cepa de micobactéria utilizada. A concentração final do inóculo preparado foi de 4 mg de micobactérias por mL e os frascos foram mantidos sob refrigeração a 4°C. As Figuras 20 a 23 ilustram o processo.

FIGURA 20- PESAGEM DE MASSA ÚMIDA DE *M. tuberculosis* CULTIVADAS EM MEIO SÓLIDO DE MIDDLEBROOK PARA PREPARO DO INÓCULO PARA SENSIBILIZAÇÃO DE *C. porcellus*



FIGURA 21- ROMPIMENTO DA MASSA ÚMIDA DE MICROBACTÉRIAS PARA PREPARO DO INÓCULO DE *M. tuberculosis* PARA SENSIBILIZAÇÃO DE *C. porcellus*



FIGURA 22- HOMOGENEIZAÇÃO DA DA MASSA ÚMIDA DE MICROBACTÉRIAS COM ÓLEO MINERAL E PEDRA POME PARA PREPARO DO INÓCULO DE *M. tuberculosis* PARA SENSIBILIZAÇÃO DE *C. porcellus*

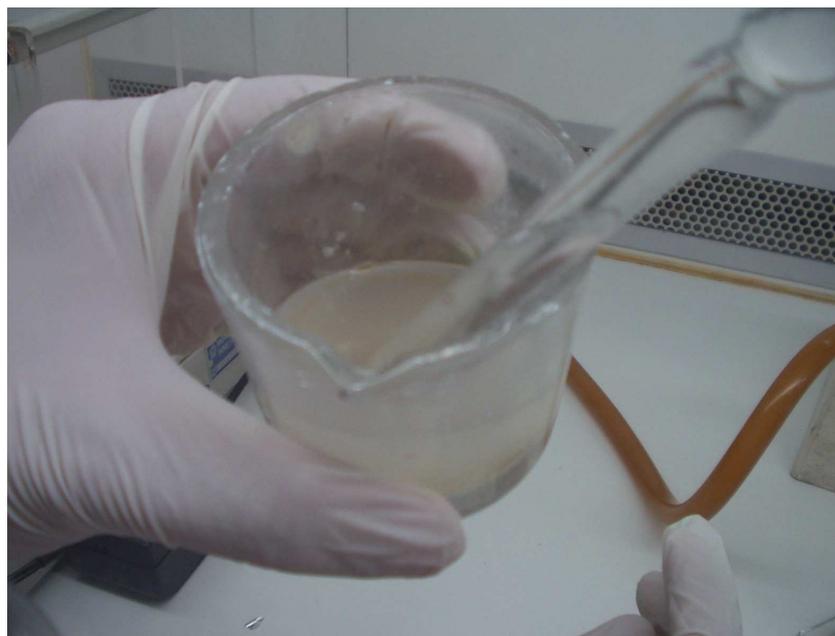


FIGURA 23- INÓCULO DE *M. tuberculosis* INATIVADO E ENVASADO PRONTO PARA SENSIBILIZAÇÃO DE *C. porcellus*



4.4.2.2 Sensibilização dos cobaios com inóculo de *M. tuberculosis*

Doze cobaios machos da espécie *C. porcellus* pesando entre 250 e 350 g, foram sensibilizados inoculando-se 0,5 mL (2 mg/mL) de antígeno *M. tuberculosis* inativado, com seringas descartáveis e agulhas com dimensões de 25,0 x 7,0 mm, estéreis, por via intramuscular. Os animais foram mantidos em biotério durante 30 dias, em caixas identificadas com a cepa utilizada e data de sensibilização (Figura 24). Seis cobaios procedentes do mesmo criadouro e mantidos sob idênticas condições ambientais e nutricionais, porém sem prévia sensibilização com *M. tuberculosis*, foram utilizados como grupo controle.

FIGURA 24- *C. porcellus* SENSIBILIZADOS COM CEPAS VIRULENTAS INATIVADAS DE *M. tuberculosis*

4.4.2.3 Preparo das diluições das proteínas recombinantes

Foram realizadas preparações das proteínas recombinantes nas seguintes concentrações: Puro (sem diluição) – 0,04 mg/mL – 0,004 mg/mL – 0,0004 mg/mL, esta última, igual à concentração da tuberculina PPD humana padrão utilizada nos testes de Mantoux. As exceções foram as proteínas TB10.3 e MPT83, que por apresentarem menor rendimento no processo de clonagem e expressão possuíam concentrações originais inferiores (0,048 mg/mL e 0,046 mg/mL, respectivamente) as demais proteínas e, conseqüentemente, não puderam ser testadas na concentração sem diluição. Foi preparado também um coquetel pela combinação e homogeneização de todas as proteínas recombinantes expressas, em igual proporção, nas concentrações de 0,04 mg/mL – 0,004 mg/mL – 0,0004 mg/mL e sem diluição.

4.4.2.4 Provas de potência relativa

Os cobaios sensibilizados foram inoculados com as proteínas recombinantes, isoladamente e em coquetéis, sob várias diluições, juntamente com uma tuberculina PPD padrão de concentração conhecida.

Todos os animais foram identificados com corantes previamente à inoculação dos produtos testados. Após o período de 30 dias, os cobaios sensibilizados foram depilados na região intercostal com auxílio de tosquiadeira e creme depilatório. Com auxílio de seringa, 0,2 mL de cada amostra foi injetada por via intradérmica (Figura 25), obedecendo ao seguinte padrão de inoculação: oito sítios de inoculação foram utilizados e distribuídos em sentido oral-caudal, sendo quatro aplicações no flanco direito e quatro no flanco esquerdo, conforme pode ser observado na Figura 26.

Injeções de diluente puro também foram aplicadas com a finalidade de se avaliar a inocuidade do produto aos cobaios. Para avaliar a interferência de eventuais proteínas da bactéria utilizada para a expressão dos antígenos recombinantes foi aplicada uma suspensão de extrato de *E. coli*. Ademais, também foi aplicado tampão de proteínas, meio no qual estão solubilizadas as proteínas recombinantes.

O local da inoculação foi demarcado com caneta de retroprojeter. Após 24 horas, foi realizada a leitura das reações às inoculações baseadas no diâmetro transversal da área de endurecimento palpável, empregando-se uma régua de material plástico transparente com circunferências graduadas em milímetros e de diâmetros variáveis.

Os procedimentos de sensibilização prévia, inoculações dos produtos nos animais e as leituras das reações cutâneas foram realizadas sempre por um mesmo técnico habilitado, graduado em Biologia, com experiência prévia em leitura de reações em provas intradérmicas de tuberculina, e que desconhecia a correlação entre os pontos de aplicação e os produtos injetados. Após a leitura,

todos os animais utilizados nos ensaios de potência relativa foram mantidos em observação, com alimentação normal, entre 24 horas e 96 horas. Passado esse período, os cobaios foram sacrificados por inalação de éter etílico.

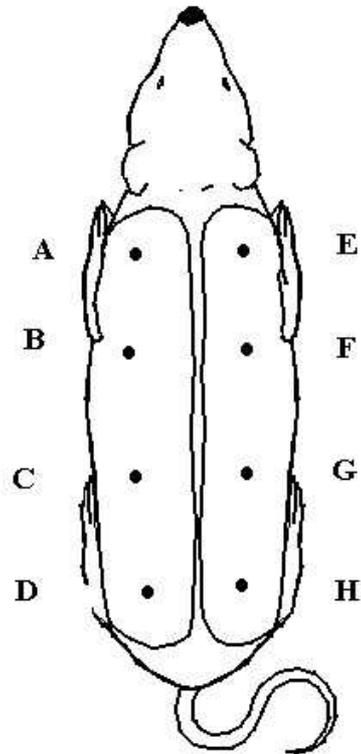
FIGURA 25- ANIMAL DEPOIS DE DEPILADO E EM FASE DE INOCULAÇÃO



A tuberculina PPD RT23 padrão utilizada nos testes foi produzida pelo *Statens Serum Institut* da Dinamarca e apresentava as seguintes características especificadas no documento que acompanhava a embalagem comercial: líquido injetável, incolor, tendendo para amarelo muito claro; contém proteína tuberculina PPD RT23 de *M. tuberculosis* com concentração igual a 2 Unidades de tuberculina para cada 0,1 mL da solução, correspondendo a 0,0004 mg/mL

Cada frasco de tuberculina PPD RT23 continha 5 mL do produto e consistia em embalagens de vidro incolor com tampa de borracha e guarnição de alumínio, com rótulos de papel. As leituras de endureção foram feitas 24 horas após as inoculações.

FIGURA 26- REPRESENTAÇÃO DOS LOCAIS DE APLICAÇÕES EM *C. porcellus*. OITO REGIÕES DE APLICAÇÕES, IDENTIFICADAS PELAS LETRAS A a H



5 RESULTADOS

5.1 SUBCULTIVOS E BACILOSCOPIA DE COLÔNIAS DE *M. tuberculosis*

Todos os 62 isolados clínicos fornecidos pelo Laboratório Central do Paraná (LACEN) se mostraram viáveis após repique em meio LJ, apresentando um perfil de crescimento padrão, com formação de colônias altas, friáveis, com formato de miolo de pão, secas e amareladas cobrindo a superfície semeada (Figura 27).

O tempo para crescimento foi entre quatro e seis semanas em estufa a 37°C. Para os procedimentos de cultivo, amostras retiradas de culturas de LJ estocadas a -80°C, sob refrigeração a 4°C ou em temperatura ambiente (ao abrigo da luz solar, durante meses, sofrendo variações climáticas de temperatura e umidade) se mostraram comprovadamente viáveis por meio de recultivos realizados no decorrer dos trabalhos. Verde malaquita adicionado ao meio mostrou-se seletivo para *M. tuberculosis* e preveniu a contaminação com outras bactérias e fungos.

A confirmação da presença de bacilos álcool-ácido resistentes nas amostras foi rotineiramente feita com preparações microscópicas das colônias utilizando-se coloração a quente de Ziehl-Neelsen. Para a detecção de eventuais contaminações com outros tipos de bactérias nos cultivos, alguns esfregaços corados por Gram foram realizados com o produto de raspagem da superfície dos tubos a partir do décimo dia, com resultados negativos indicando não haver contaminação.

FIGURA 27- CRESCIMENTO DE COLÔNIAS DE *M. tuberculosis* EM MEIO NUTRIENTE LÖWENSTEIN-JENSEN, APÓS 30 DIAS



5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*

Em uma primeira fase, eram necessários isolados de *M. tuberculosis* bem caracterizados, dentro de uma amostragem que fosse representativa com circulação em diferentes pacientes e sem resistência a antibióticos. Após obter com sucesso 62 isolados clínicos, foi realizada a extração de DNA, caracterização por *mixed-linker PCR DNA fingerprinting*, análise fenética e seleção de cepas para clonagem dos genes de interesse.

5.2.1 Concentrações de DNA das Amostras

A concentração de DNA por espectrofotometria de ultravioleta para as 62 amostras variou entre 48 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ a 242 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, com média de 114 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$. A relação de absorbância em leituras de 260 e 280 ηm revelou valores oscilando de 1,22 a 1,95, com média de 1,64. Todos os valores obtidos de concentração e relação de absorbâncias podem ser observados na Tabela 2.

TABELA 2- RELAÇÕES DOS ISOLADOS E DE SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES E RAZÕES DE ABOSORBÂNCIAS A 260 E 280 nm

| ISOLADO | Concentração (ng/mL) | Relação absorbâncias 260/280 nm | ISOLADO | Concentração (ng/mL) | Relação absorbâncias 260/280 nm |
|---------|----------------------|---------------------------------|---------|----------------------|---------------------------------|
| LAC_001 | 48 | 1,60 | LAC_035 | 48 | 1,67 |
| LAC_002 | 72 | 1,54 | LAC_036 | 131 | 1,30 |
| LAC_003 | 68 | 1,95 | LAC_037 | 149 | 1,67 |
| LAC_004 | 48 | 1,45 | LAC_038 | 155 | 1,87 |
| LAC_005 | 115 | 1,78 | LAC_039 | 55 | 1,25 |
| LAC_006 | 117 | 1,80 | LAC_040 | 130 | 1,80 |
| LAC_007 | 130 | 1,74 | LAC_042 | 86 | 1,80 |
| LAC_008 | 168 | 1,63 | LAC_043 | 156 | 1,38 |
| LAC_009 | 190 | 1,58 | LAC_046 | 110 | 1,95 |
| LAC_010 | 58 | 1,22 | LAC_047 | 49 | 1,60 |
| LAC_011 | 198 | 1,57 | LAC_048 | 190 | 1,80 |
| LAC_012 | 75 | 1,81 | LAC_049 | 110 | 1,29 |
| LAC_013 | 189 | 1,67 | LAC_050 | 115 | 1,23 |
| LAC_014 | 115 | 1,76 | LAC_051 | 81 | 1,95 |
| LAC_015 | 123 | 1,61 | LAC_052 | 115 | 1,90 |
| LAC_016 | 156 | 1,60 | LAC_053 | 81 | 1,50 |
| LAC_017 | 185 | 1,64 | LAC_054 | 100 | 1,80 |
| LAC_018 | 114 | 1,60 | LAC_055 | 108 | 1,64 |
| LAC_019 | 156 | 1,59 | LAC_056 | 110 | 1,64 |
| LAC_020 | 198 | 1,22 | LAC_057 | 88 | 1,67 |
| LAC_021 | 242 | 1,70 | LAC_058 | 99 | 1,55 |
| LAC_022 | 190 | 1,75 | LAC_060 | 58 | 1,75 |
| LAC_025 | 190 | 1,59 | LAC_061 | 119 | 1,95 |
| LAC_026 | 80 | 1,58 | LAC_062 | 128 | 1,64 |
| LAC_027 | 99 | 1,50 | LAC_063 | 84 | 1,75 |
| LAC_028 | 50 | 1,95 | LAC_065 | 53 | 1,80 |
| LAC_029 | 58 | 1,85 | LAC_066 | 138 | 1,40 |
| LAC_030 | 70 | 1,90 | LAC_067 | 129 | 1,70 |
| LAC_031 | 80 | 1,68 | LAC_068 | 98 | 1,68 |
| LAC_033 | 110 | 1,75 | LAC_069 | 75 | 1,31 |
| LAC_034 | 110 | 1,54 | LAC_071 | 151 | 1,58 |

5.2.2 Mixed-Linker PCR DNA Fingerprinting

O número de cópias da seqüência IS6110 por isolado variou de quatro a 13, conforme pode ser observado na Tabela 3. O tamanho dos fragmentos observados oscilou entre 130 e 680 pares de base, aproximadamente. O número médio de

seqüências observadas por isolado foi de 8,5 e a mediana foi 9. A Figura 28 agrupa os isolados de acordo com o número de cópias observadas do elemento IS6110. Na Figura 29 pode ser observado um padrão ilustrativo dos perfis eletroforéticos obtidos. No Anexo 2 estão representados nas Figuras 51 a 59 todos os padrões eletroforéticos obtidos pela análise dos isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

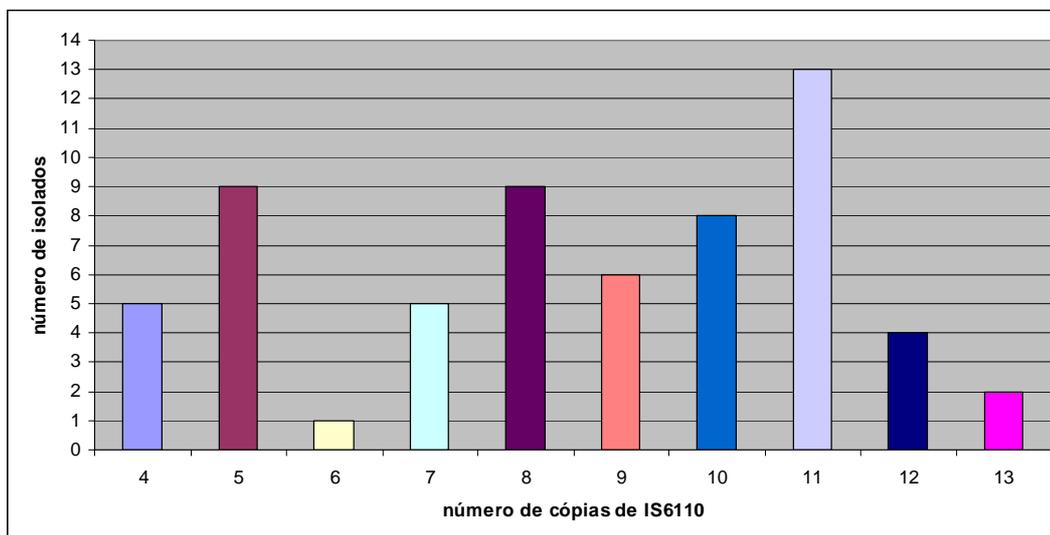
TABELA 3- RELAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE IS6110 POR ISOLADO CLÍNICO DE *M. tuberculosis*

| ISOLADO | NÚMERO DE CÓPIAS | ISOLADO | NÚMERO DE CÓPIAS |
|---------|------------------|---------|------------------|
| LAC_001 | 10 | LAC_035 | 4 |
| LAC_002 | 10 | LAC_036 | 13 |
| LAC_003 | 5 | LAC_037 | 4 |
| LAC_004 | 12 | LAC_038 | 5 |
| LAC_005 | 4 | LAC_039 | 5 |
| LAC_006 | 11 | LAC_040 | 7 |
| LAC_007 | 9 | LAC_042 | 8 |
| LAC_008 | 11 | LAC_043 | 5 |
| LAC_009 | 6 | LAC_046 | 11 |
| LAC_010 | 7 | LAC_047 | 4 |
| LAC_011 | 11 | LAC_048 | 9 |
| LAC_012 | 7 | LAC_049 | 11 |
| LAC_013 | 10 | LAC_050 | 11 |
| LAC_014 | 12 | LAC_051 | 8 |
| LAC_015 | 11 | LAC_052 | 11 |
| LAC_016 | 8 | LAC_053 | 8 |
| LAC_017 | 8 | LAC_054 | 10 |
| LAC_018 | 4 | LAC_055 | 10 |
| LAC_019 | 10 | LAC_056 | 11 |
| LAC_020 | 10 | LAC_057 | 8 |
| LAC_021 | 11 | LAC_058 | 9 |
| LAC_022 | 10 | LAC_060 | 5 |
| LAC_025 | 9 | LAC_061 | 11 |
| LAC_026 | 8 | LAC_062 | 12 |
| LAC_027 | 9 | LAC_063 | 8 |
| LAC_028 | 5 | LAC_065 | 5 |
| LAC_029 | 5 | LAC_066 | 13 |
| LAC_030 | 7 | LAC_067 | 12 |
| LAC_031 | 8 | LAC_068 | 9 |
| LAC_033 | 11 | LAC_069 | 7 |
| LAC_034 | 11 | LAC_071 | 5 |

Os resultados da análise de IS6110 por mixed-linker PCR DNA fingerprinting podem ser classificados em dois grupos quanto ao número de cópias da seqüência IS6110, um possuindo menos que cinco cópias e outro com cinco ou mais de IS6110. Dos 62 isolados de *M. tuberculosis*, 4 (6,5%) pertencem ao primeiro grupo e 58 (93,5%)

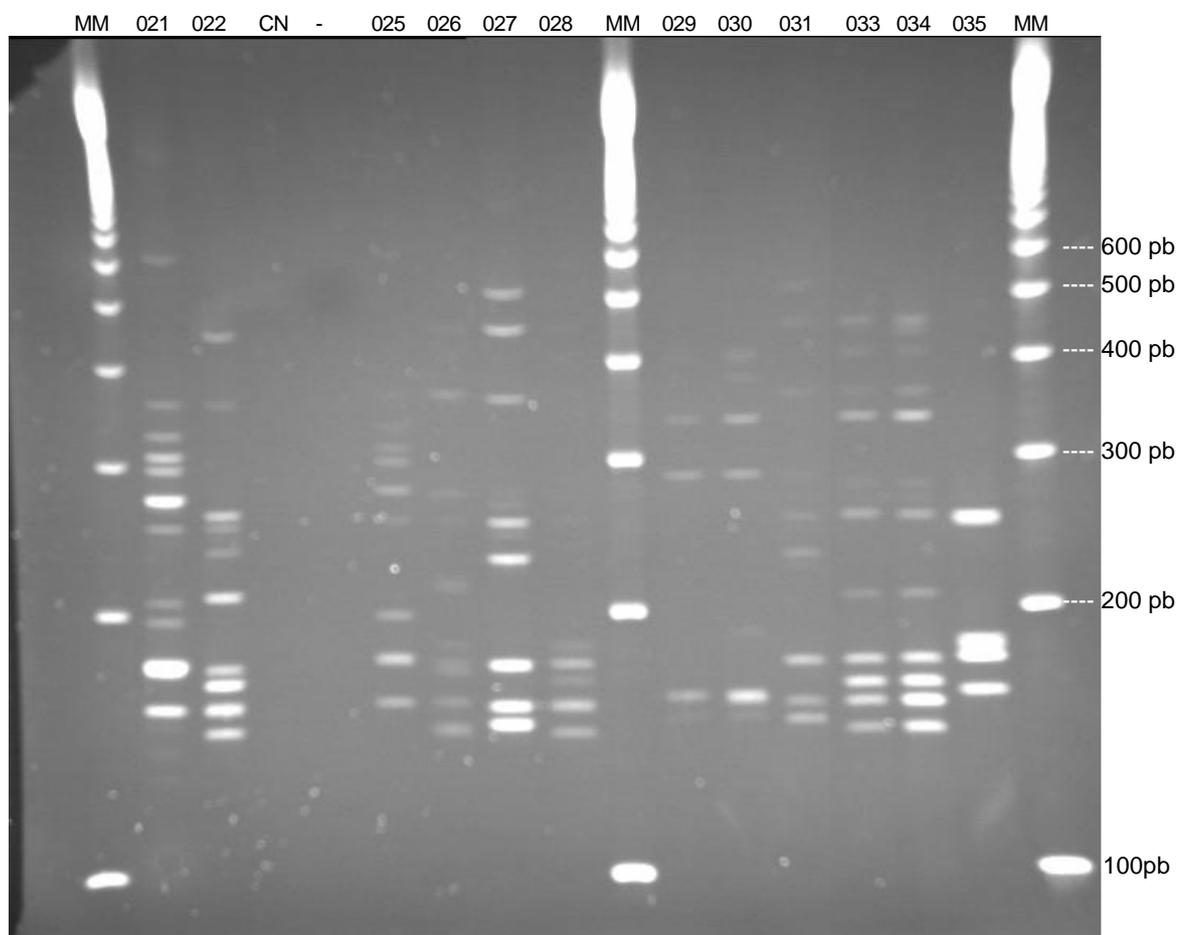
ao segundo. Não foram observados isolados com ausência de cópias do elemento IS6110.

FIGURA 28- CLASSIFICAÇÃO DOS ISOLADOS ANALISADOS QUANTO AO NÚMERO DE CÓPIAS DE IS6110 DE *M. tuberculosis*



NOTA: Cinco isolados clínicos apresentaram quatro cópias de IS6110; nove isolados cinco cópias; um isolado apresentou seis cópias; cinco isolados sete cópias; nove isolados oito cópias; seis isolados nove cópias; oito isolados 10 cópias; 13 isolados 11 cópias; quatro isolados 12 cópias e dois isolados 13 cópias.

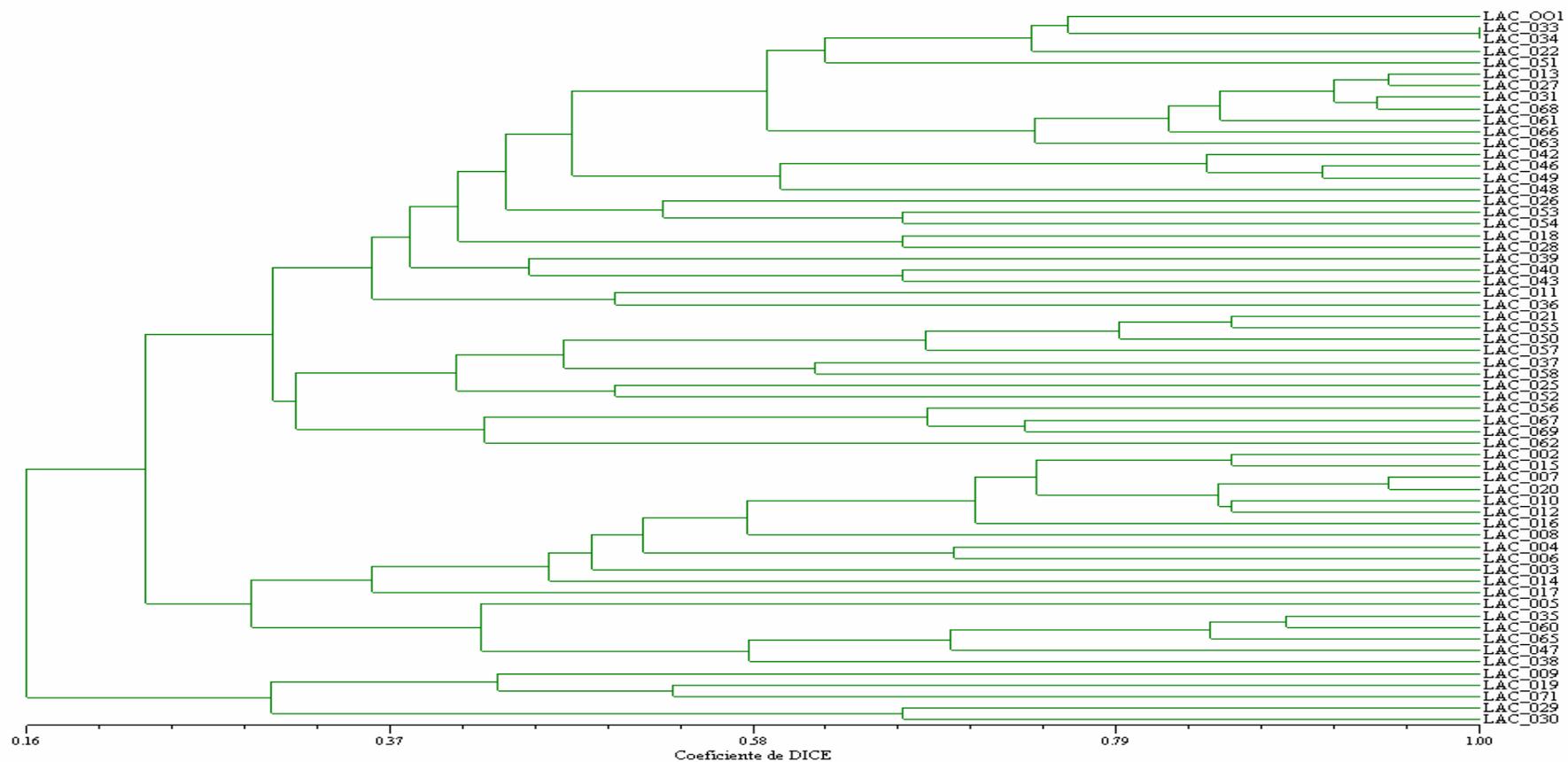
FIGURA 29-GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



NOTA: Gel de acrilamida/bisacrilamida (21:1) 7,8% após corrida eletroforética por 18 horas (35 Volts), corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado em luz ultravioleta; Números 021, 022, 025 a 028, 029 a 035 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 bp; CN = controle negativo; - = linha não utilizada; Cepas 033 e 034 apresentam o mesmo perfil eletroforético constituindo-se um *cluster*

No dendrograma gerado (Figura 30) três genogrupos podem ser observados. O primeiro com cinco linhagens, o segundo com 19 linhagens e o terceiro grupo com 38 linhagens, cada qual com aproximadamente 28% de similaridade mínima entre seus membros mais distantes. 48 dos 62 isolados (77,4%) ostentaram padrões eletroforéticos relacionados, constituindo-se em 47 diferentes perfis com índices de similaridade de ao menos 55%. Apenas dois isolados (3,2%) apresentaram o mesmo padrão de polimorfismo, constituindo, portanto, um *cluster*.

FIGURA 30- DENDROGRAMA MOSTRANDO AS CORRELAÇÕES ENTRE OS 62 ISOLADOS DE *M. tuberculosis* OBTIDOS A PARTIR DE PACIENTES ATENDIDOS NO ESTADO DO PARANÁ



5.3 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SECREÇÃO DE *M. tuberculosis*

5.3.1 Seleção de Isolados Clínicos

A seleção dos isolados clínicos para os processos de clonagem gênica, expressão e purificação de proteínas imunogênicas de *M. tuberculosis* foi realizada a partir dos resultados obtidos nos ensaios de caracterização molecular por detecção do elemento de inserção IS6110. A escolha se deu de modo a ser representativa da diversidade genética de linhagens circulantes de *M. tuberculosis* e foi baseada no seguinte critério:

- a) uma cepa representativa de cada genogrupo;
- b) cepas com similaridade filogenética inferior a 70%.

Os isolados clínicos selecionados foram LAC_030, LAC_033 e LAC_038

5.3.2 Amplificação e Purificação dos Genes

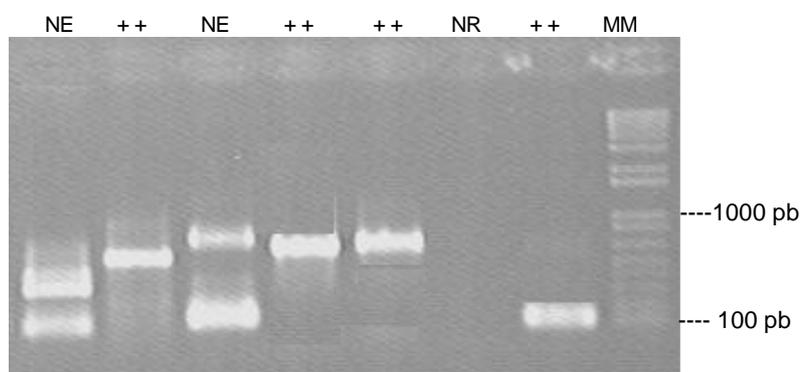
Para as etapas posteriores foram escolhidos apenas os genes que apresentaram bom nível de amplificação em todos os isolados clínicos utilizados, entendendo-se como tal um forte sinal de amplificação, de fragmento com tamanho esperado, com especificidade e sem produção de artefatos de amplificação. O rigoroso critério adotado para seqüência dos trabalhos se deve ao fato da qualidade da PCR ser fundamental para o sucesso da inserção do segmento de interesse nos clones de entrada, etapa indispensável para a continuidade do processo de clonagem. Dos 25 genes submetidos a amplificação, 14 (56%) alcançaram este critério. Vale frisar que a estratégia adotada consistiu na seleção de um número expressivo (25) de proteínas candidatas para produção de antígenos recombinantes, de modo que eventuais insucessos em etapas isoladas do processo não se constituíssem em fator limitante

para a obtenção de um número mínimo de proteínas expressas para avaliação de atividade imunológica. Por esta razão, a abordagem utilizada não implicou em extensivos ensaios de otimização de PCR, purificação do DNA molde, ou mesmo de novo desenho de iniciadores de reação, ações que poderiam elevar o percentual de sucesso da etapa de PCR.

A Figura 31 exibe um perfil eletroforético com um padrão de resultados. A Tabela 4 relaciona todos os genes estudados, o sinal de amplificação obtido e os genes eleitos para seqüência das atividades de purificação por precipitação com PEG.

Foi selecionado também um único isolado clínico para prosseguimento das atividades, sendo escolhida a linhagem que apresentou maior número de genes amplificados com sucesso (LAC_030).

FIGURA 31- PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO DE AMOSTRAS AMPLIFICADAS POR PCR EXEMPLIFICANDO PADRÕES DE RESULTADOS



NOTA: NR = não reagente / ausência de amplificação; NE = amplificação não específica; ++ = bom nível de amplificação; MM = marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen)

TABELA 4- RESULTADOS DE PCR PARA OS TRÊS ISOLADOS CLÍNICOS E 25 GENES SELECIONADOS

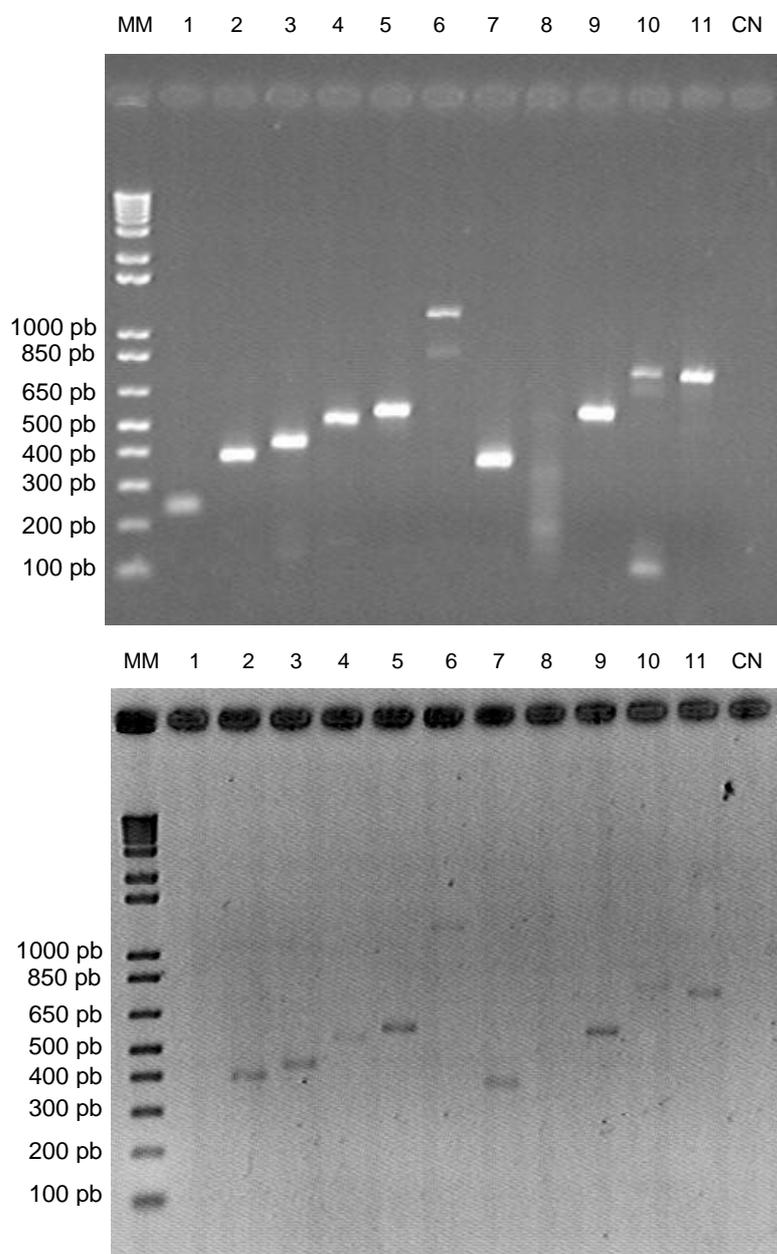
| | NOME DO GENE (PROTEÍNA) | ISOLADO CLÍNICO | | | CONTAGEM ¹ |
|----|-----------------------------|-----------------|---------|---------|-----------------------|
| | | LAC_030 | LAC_033 | LAC_038 | |
| 1 | Rv0061 (DPPD) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 2 | Rv3879c (MTV027.14c) | + | + | + | 0 |
| 3 | Rv0203 (MTV033.1) | NR | NR | NR | 0 |
| 4 | Rv1271c (MTCY50.11) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 5 | Rv3874 (CFP10) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 6 | Rv0288 (TB10.4) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 7 | Rv3019c (TB10.3) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 8 | Rv3004 (CFP6) | NR | NR | NR | 0 |
| 9 | Rv0164 (TB18.5) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 10 | Rv3204 (MTSP11) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 11 | Rv3880c (MTV027.15c) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 12 | Rv1837c (MTCY1A11.06) | ++ | NR | NR | 1 |
| 13 | Rv2031c (HSP16.3) | ++ | + | NR | 1 |
| 14 | Rv3763 (MTV025.111) | ++ | + | NR | 1 |
| 15 | Rv0934 (PSTS1) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 16 | Rv3875 (ESAT-6) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 17 | Rv0040c (MTC28) | ++ | NR | NR | 1 |
| 18 | Rv1860 (MPT32) | NR | NR | NR | 0 |
| 19 | Rv3803c (MPT51) | NR | NR | NR | 0 |
| 20 | Rv1926c (MPT63) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 21 | Rv1980c (MPT64) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 22 | Rv2875 (MPT70) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 23 | Rv2873 (MPT83) | ++ | ++ | ++ | 3 |
| 24 | Rv3873 (PPE68) | ++ | NR | NR | 1 |
| 25 | Rv2430c (PPE41) | ++ | NR | + | 1 |
| | CONTAGEM ² | 20 | 14 | 14 | |

NOTA: NR = não reagente / ausência de amplificação; + = sinal de amplificação fraco, com baixo rendimento ou especificidade; ++ = sinal de amplificação forte, com bom rendimento e especificidade; Contagem¹ = número de isolados com nível de amplificação ++ por gene; Contagem² = número de genes amplificados com nível de amplificação ++ por isolado; os genes escolhidos para as atividades de clonagem estão indicados em negrito

5.3.3 Purificação dos Produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR para remoção de pequenos fragmentos de amplificação e do excesso de iniciadores da PCR foi realizada com PEG. Dos 14 produtos de PCR submetidos a este processo somente um, correspondente ao gene Rv3880c, não foi recuperado, perfazendo, portanto, um rendimento de 92,8%. A Figura 32 ilustra os resultados de um padrão eletroforético de produtos de PCR antes e após a purificação com PEG.

FIGURA 32- PADRÃO ELETRORFORÉTICO OBTIDO A PARTIR DOS PRODUTOS DE PCR ANTES (EM CIMA) E APÓS (EM BAIXO) PURIFICAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO COM PEG

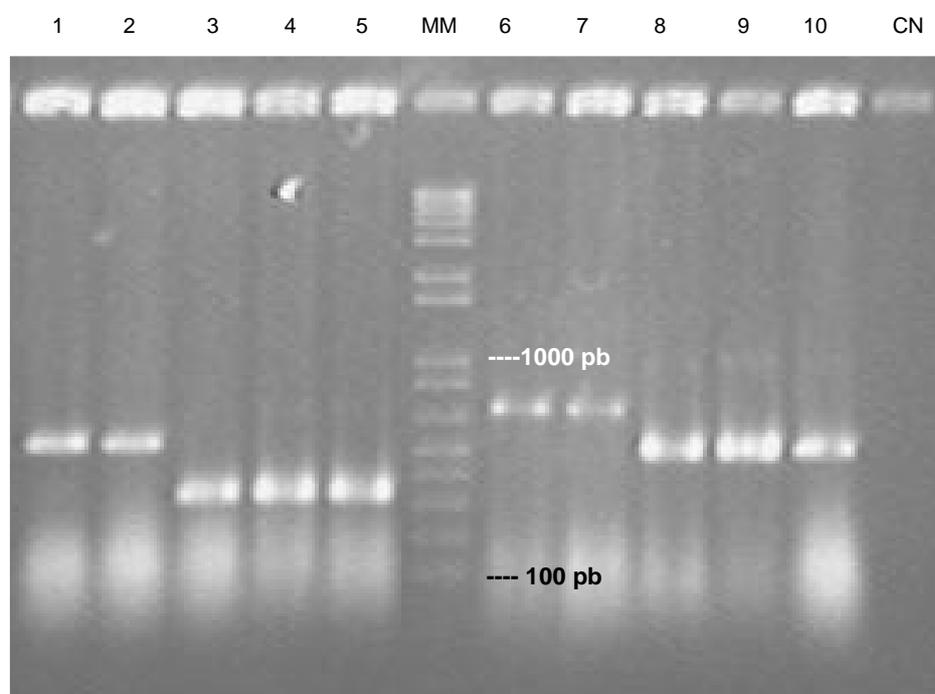


NOTA: Números de 1 a 11 = amostras de produtos de PCR; MM = marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen); CN = controle negativo

5.3.4 Obtenção e Confirmação dos Clones de Entrada

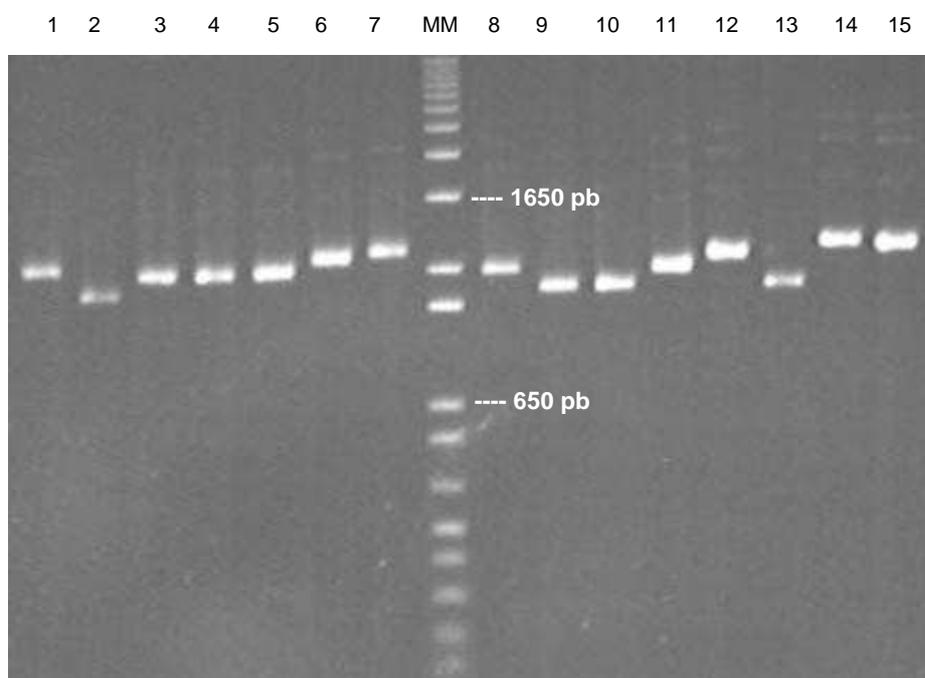
A reação de recombinação BP foi realizada a partir dos 13 produtos de PCR purificados por PEG. Os clones de entrada obtidos foram submetidos aos métodos de *masterplates*, PCRs de colônia e seqüenciamento de ácido nucléico, este último confirmando a presença da seqüência desejada em 10 (76,9%) dos 13 plasmídeos purificados obtidos. Os clones correspondentes aos genes Rv1271c, Rv0934 e Rv1980c não foram submetidos às etapas subseqüentes devido ao seqüenciamento ter apresentado baixa qualidade, com reduzido sinal de fluorescência, não permitindo, assim, a obtenção de resultados conclusivos. A Figura 33 ilustra o perfil eletroforético obtido na PCR de colônia para seleção dos clones positivos. A Figura 34 demonstra o perfil eletroforético dos plasmídeos contendo os insertos desejados após purificação.

FIGURA 33- PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA CONFIRMANDO A PRESENÇA DA SEQÜÊNCIA DESEJADA



NOTA: Números de 1 a 10 = amostras de PCRs de colônia; MM = marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen); CN = controle negativo

FIGURA 34- PERFIL ELETROFORÉTICO DOS CLONES DE ENTRADA (pDONR) PURIFICADOS CONFIRMANDO AS SEQÜÊNCIAS DESEJADAS

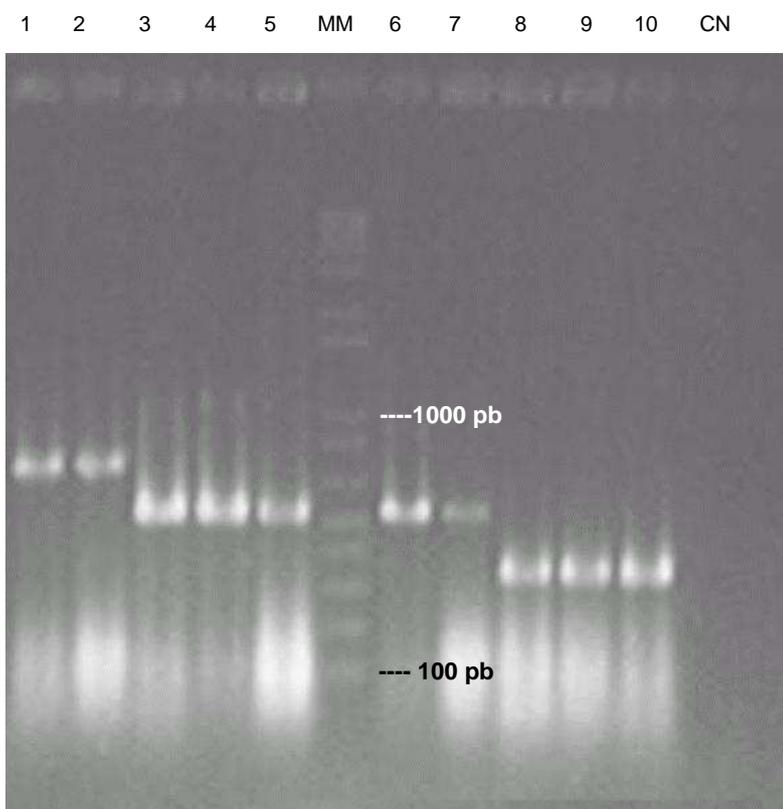


NOTA: Números de 1 a 15 = amostras de plasmídeos purificados; MM = marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen)

5.3.5 Obtenção e Confirmação dos Clones de Destino

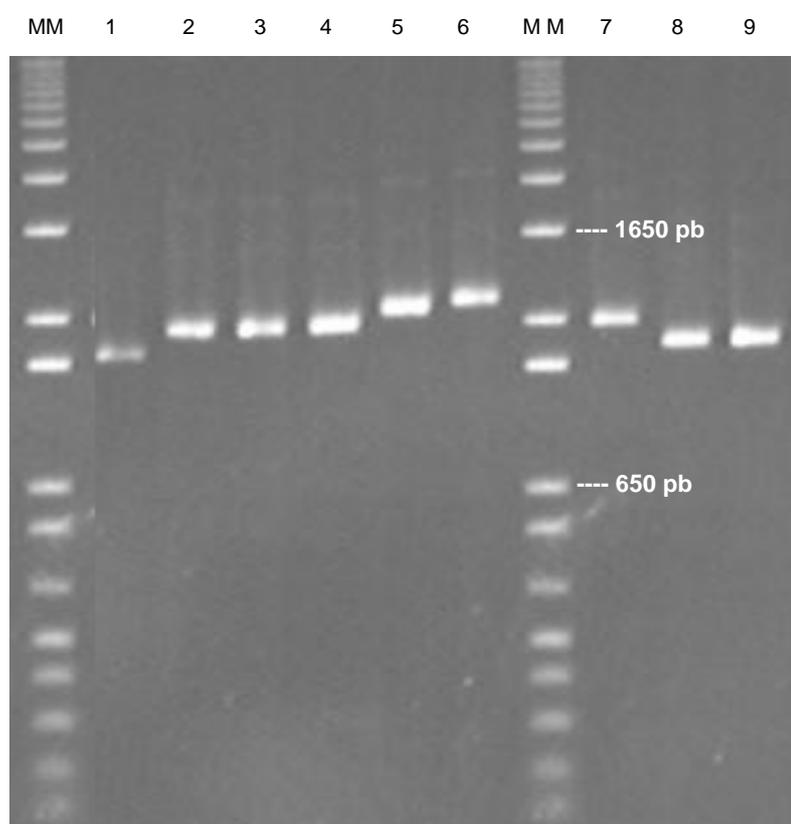
Todas as 10 reações de clonagem para obtenção dos clones de expressão foram realizadas com sucesso. A Figura 35 ilustra perfil eletroforético obtido de PCR de colônia para seleção dos clones transformados. A Figura 36 demonstra o perfil eletroforético dos plasmídeos de destino (pDEST) contendo os insertos desejados após purificação. Salienta-se o grande grau de sucesso (100%) na passagem dos insertos entre os diferentes plasmídeos.

FIGURA 35- PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA CONFIRMANDO A PRESENÇA DA SEQÜÊNCIA DESEJADA



NOTA: Números de 1 a 10 = amostras de PCRs de colônia; MM = marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen); CN = controle negativo

FIGURA 36- PERFIL ELETROFORÉTICO DOS CLONES DE DESTINO (pDEST)
PURIFICADOS CONTENDO AS SEQÜÊNCIAS DESEJADAS



NOTA: Números de 1 a 9 = amostras de plasmídeos purificados; MM = marcador molecular 1 kb plus (Invitrogen)

5.3.6 Expressão e Purificação das Proteínas

Na etapa de teste, das 10 proteínas submetidas a esta fase, foi obtido êxito na expressão de cinco proteínas em uma quantidade minimamente aceitável, avaliação esta subjetiva baseada na intensidade da coloração da banda da proteína recombinante em gel de poliacrilamida. As cinco proteínas restantes foram classificadas da seguinte forma: três com expressão duvidosa, uma não expressa e uma com tamanho diferente do esperado.

Na fase de produção, as cinco proteínas que haviam sido consideradas como expressas na fase de teste repetiram a performance. Ademais, das três proteínas classificadas como tendo expressão duvidosa na fase de teste, duas foram expressas com sucesso na fase de produção.

Portanto, foi obtido a expressão, na fase de produção, de sete das 10 (70%) proteínas objeto do experimento. Todas as proteínas expressas foram obtidas em fração insolúvel, com exceção da proteína recombinante CFP10, obtida em ambas as frações (solúvel e insolúvel). Na Tabela 5 pode ser observada uma compilação dos resultados obtidos na etapa de expressão das proteínas.

Cinco clones (correspondentes às proteínas DPPD, CFP10, MPT63, MPT70 e TB10.4) foram submetidos à expressão com redução da temperatura de indução para 20°C. No entanto, não foram observadas diferenças de nível de expressão ou solubilidade em relação à condição padrão de temperatura de 37°C.

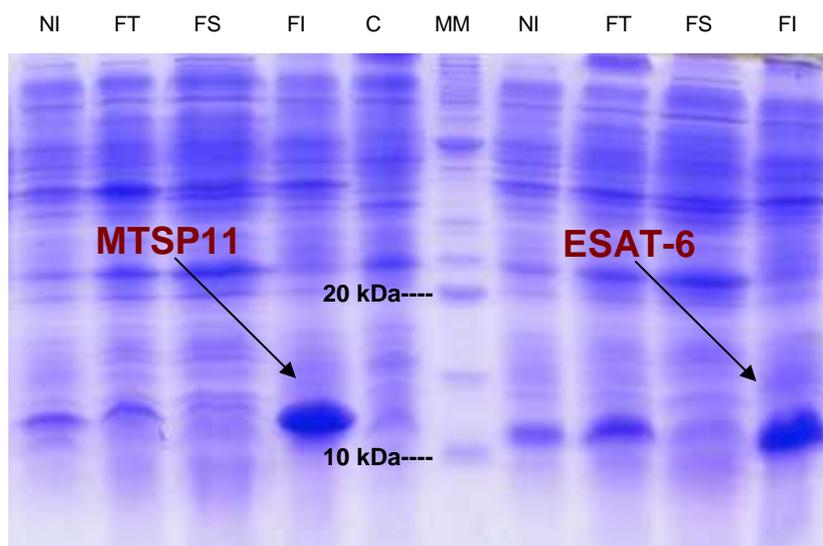
TABELA 5- RESULTADOS DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NA FASE DE TESTE E DE PRODUÇÃO

| Nome do(a) | Tamanho do gene | Peso Molecular | Fase | Fase |
|------------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|
| Gene (Proteína) | (PB) | (kDa) | Teste | Produção |
| Rv0061 (DPPD) | 426 | 15,7 | ? | N |
| Rv3874 (CFP10) | 303 | 11,2 | E (FI e FS) | E (FI e FS) |
| Rv0288 (TB10.4) | 291 | 10,7 | E (FI) | E (FI) |
| Rv3019c (TB10.3) | 291 | 10,7 | E (FI) | E (FI) |
| Rv0164 (TB18.5) | 486 | 17,9 | ? | N |
| Rv3204 (MTSP11) | 306 | 11,3 | E (FI) | E (FI) |
| Rv3875 (ESAT-6) | 288 | 10,6 | E (FI) | E (FI) |
| Rv1926c (MPT63) | 480 | 17,7 | T | T |
| Rv2875 (MPT70) | 582 | 21,4 | N | E (FI) |
| Rv2873 (MPT83) | 663 | 24,4 | ? | E (FI) |

NOTA: PB (pares de base); kDa (kilodalton); E (proteína expressa); N (proteína sem expressão); T (tamanho não esperado); ? (não conclusivo); FS (fração solúvel); FI (fração insolúvel).

Os géis de eletroforese SDS-PAGE serviram como ferramenta para parte das conclusões expostas. A Figura 37 ilustra um padrão de expressão protéica considerado como adequado.

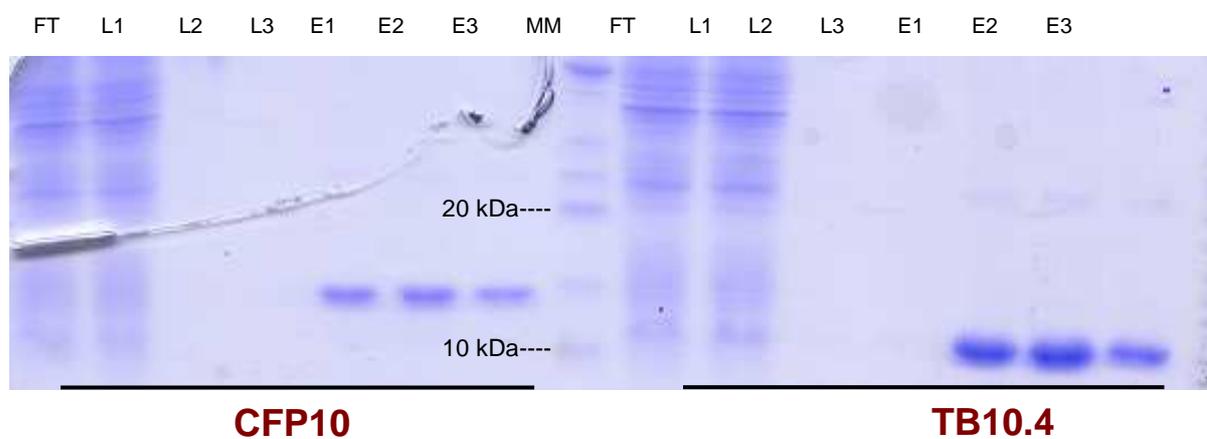
FIGURA 37- PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) COM PROTEÍNAS EXPRESSAS



NOTA: NI = Fração não induzida; FT = Fração total; FS = Fração solúvel; FI = Fração insolúvel; C = Controle; MM = Marcador molecular BenchMark (Invitrogen)

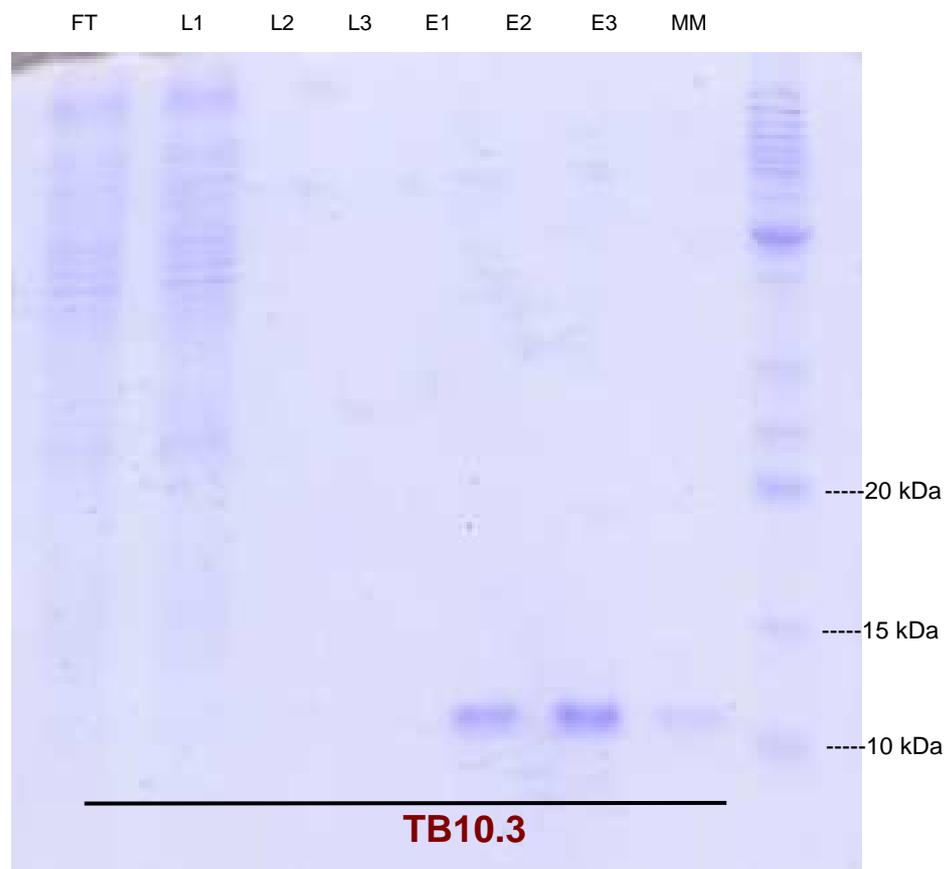
Os sete extratos obtidos contendo as proteínas recombinantes expressas foram purificadas por cromatografia por afinidade em coluna de Ni-NTA seguido de eluição com imidazol (Figuras 38 a 40), eletroforese SDS-PAGE em gel preparativo com eletroeluição (Figura 41) e tratamento com Triton X-114, obtendo-se resultados satisfatórios.

FIGURA 38- PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES APÓS PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE EM COLUNA DE NI-NTA E ELUIÇÃO POR IMIDAZOL



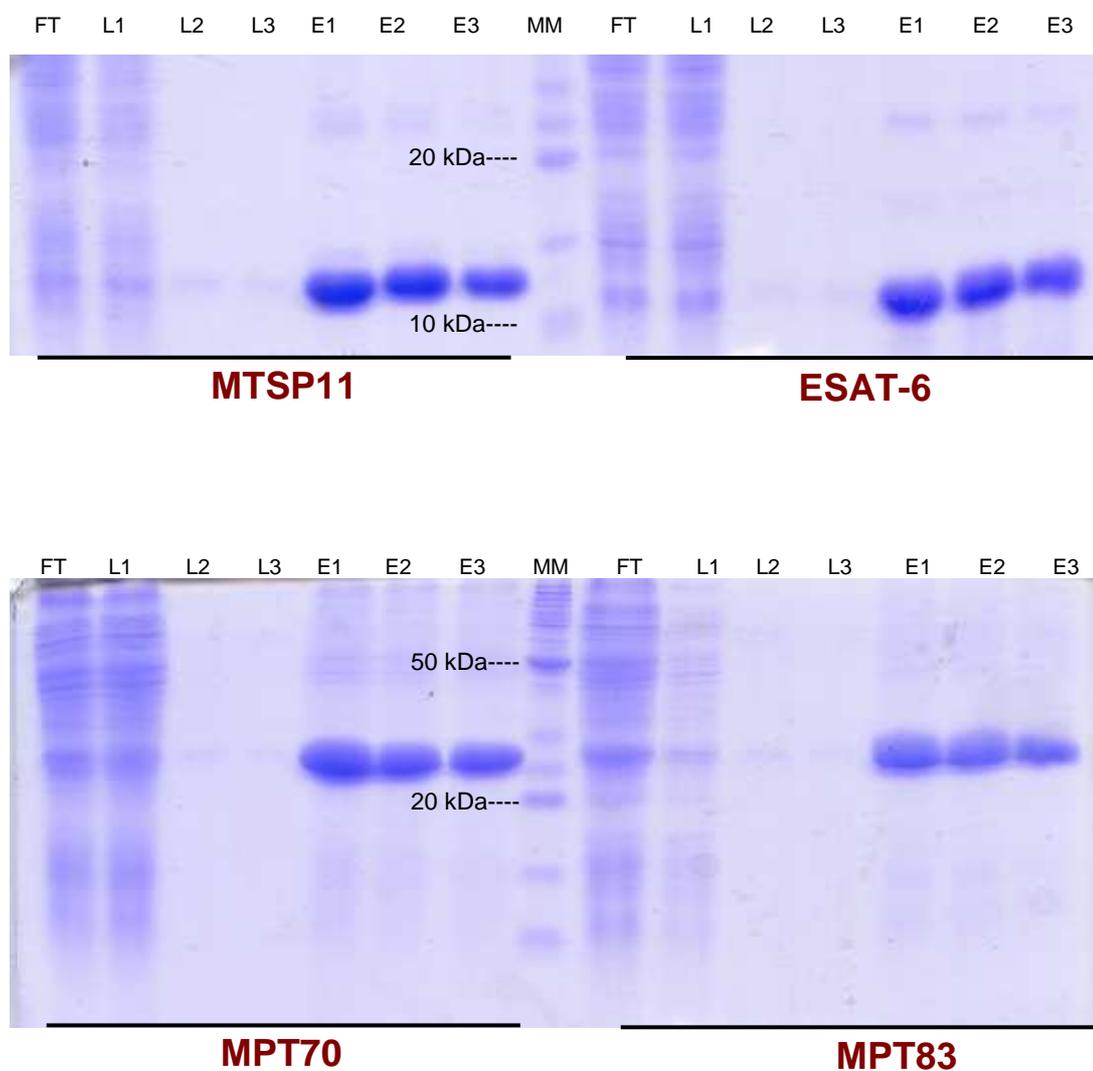
NOTA: FT = Fração total; L1 = Lavado 1 ; L2 = Lavado 2; L3 = Lavado 3; E1 = Eluído 1; E2 = Eluído 2; E3 = Eluído 3; MM = Marcador molecular BenchMark (Invitrogen)

FIGURA 39- PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES APÓS PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE EM COLUNA DE NI-NTA E ELUIÇÃO POR IMIDAZOL



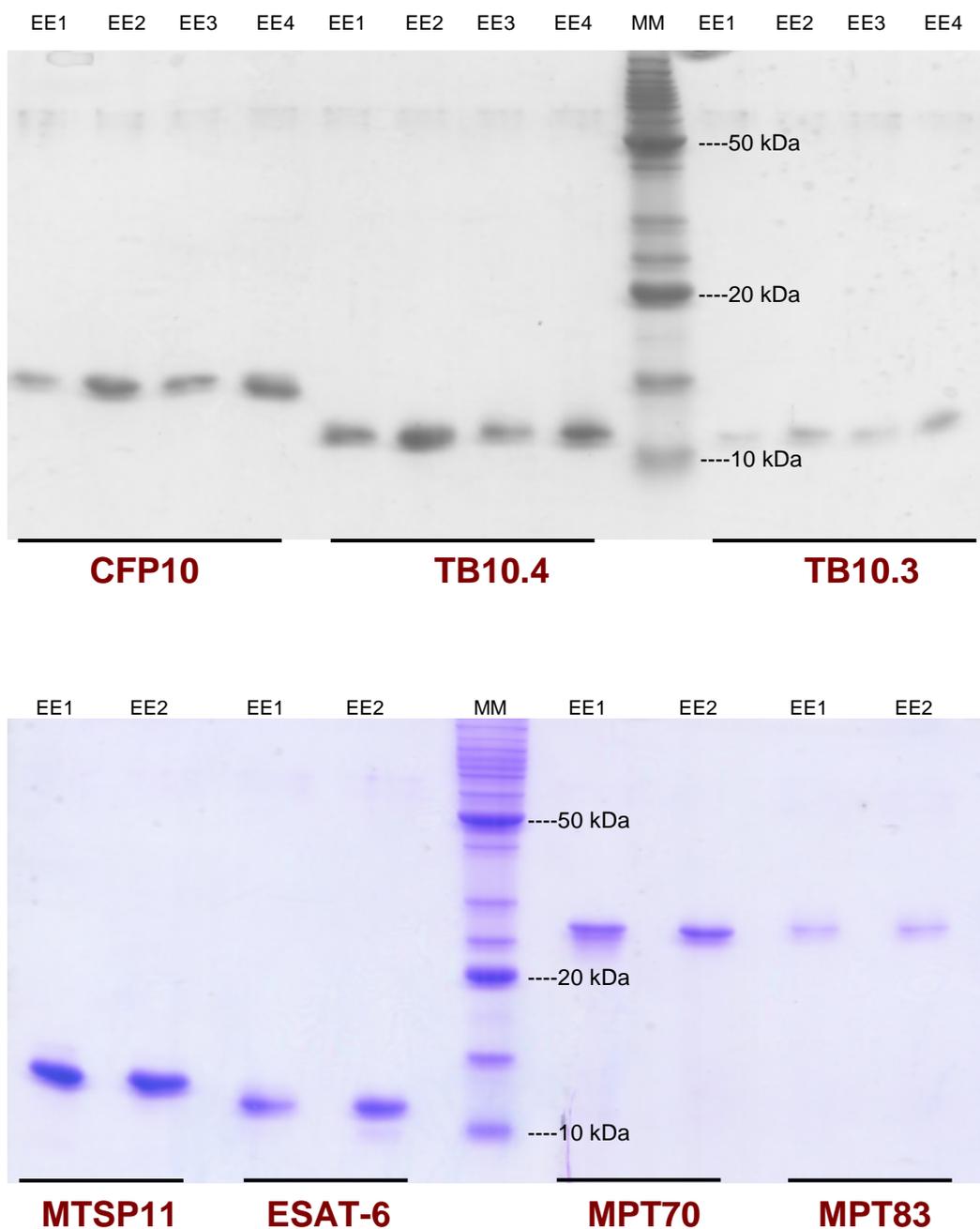
NOTA: FT = Fração total; L1 = Lavado 1 ; L2 = Lavado 2; L3 = Lavado 3; E1 = Eluído 1; E2 = Eluído 2; E3 = Eluído 3; MM = Marcador molecular BenchMark (Invitrogen)

FIGURA 40- PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES APÓS PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE EM COLUNA DE NI-NTA E ELUIÇÃO POR IMIDAZOL



NOTA: FT = Fração total; L1 = Lavado 1 ; L2 = Lavado 2; L3 = Lavado 3; E1 = Eluído 1; E2 = Eluído 2; E3 = Eluído 3; MM = Marcador molecular BenchMark (Invitrogen)

FIGURA 41- PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES APÓS PURIFICAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL PREPARATIVO E ELETROELUIÇÃO



NOTA: EE1 = Eletroeluído 1; EE2 = Eletroeluído 2; MM = Marcador molecular BenchMark (Invitrogen)

O rendimento do processo de clonagem, em concentração e quantidade final de proteínas expressas, após as etapas de purificação por cromatografia por afinidade a Ni-NTA seguido de eluição com imidazol e após eletroforese SDS-PAGE em gel preparativo com eletroeluição, pode ser observado no Quadro 3.

QUADRO 3- RENDIMENTO DO PROCESSO DE CLONAGEM E EXPRESSÃO, EM CONCENTRAÇÃO, QUANTIDADE FINAL E PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES, APÓS DIFERENTES ETAPAS DE PURIFICAÇÃO

| Nome do(a) Gene (Proteína) | Concentração¹ (mg/mL) | Quantidade¹ (mg) | Concentração² (mg/mL) | Quantidade² (mg) | Percentual de Recuperação |
|---------------------------------------|---|--|---|--|--------------------------------------|
| Rv3874 (CFP10) | 0,624 | 1,248 | 0,172 | 0,602 | 48,2% |
| Rv0288 (TB10.4) | 0,840 | 1,680 | 0,296 | 1,036 | 61,7% |
| Rv3019c (TB10.3) | 0,312 | 0,624 | 0,048 | 0,168 | 26,9% |
| Rv3204 (MTSP11) | 1,010 | 2,020 | 0,249 | 0,872 | 43,1% |
| Rv3875 (ESAT-6) | 1,240 | 2,480 | 0,374 | 1,309 | 52,8% |
| Rv2875 (MPT70) | 1,390 | 2,780 | 0,354 | 1,239 | 44,6% |
| Rv2873 (MPT83) | 1,210 | 2,420 | 0,046 | 0,161 | 6,6% |

NOTA: 1- Concentração e quantidade de proteína recombinante expressa após purificação por cromatografia por afinidade a Ni-NTA e eluição com imidazol; 2- Concentração e quantidade de proteína recombinante expressa após eletroforese SDS-PAGE em gel preparativo seguido de eletroeluição

O Quadro 4 resume o número de genes/proteínas submetidos à cada etapa do processo de amplificação, clonagem, expressão e purificação e seu respectivo percentual de sucesso.

QUADRO 4- RENDIMENTO INDIVIDUAL E ACUMULADO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DOS PROCESSOS DE AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNOGÊNICAS DE *M. tuberculosis*

| Etapa | Número inicial de genes ou proteínas submetidos à etapa | Número final de genes ou proteínas submetidos à etapa com sucesso | Percentual de sucesso por etapa | Percentual de sucesso acumulado |
|---|--|--|--|--|
| Amplificação | 25 | 14 | 56% | 56% |
| Precipitação dos produtos de PCR com PEG | 14 | 13 | 92,8% | 52% |
| Obtenção dos clones de entrada | 13 | 10 | 76,9% | 40% |
| Obtenção dos clones de destino | 10 | 10 | 100% | 40% |
| Expressão de proteínas | 10 | 7 | 70% | 28% |
| Purificação de proteínas | 7 | 7 | 100% | 28% |

5.4 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL: ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS RECOMBINANTES EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

5.4.1 Ensaio Imunoenzimático

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados para avaliar a atividade da resposta imune humoral frente às proteínas recombinantes. Como fonte de anticorpo policlonal foi usado uma combinação de soro de três coelhos

previamente imunizados com *M. tuberculosis*. Soro dos mesmos coelhos coletado imediatamente antes da sensibilização com *M. tuberculosis* foi utilizado como controle negativo. Como controle positivo foi usado antígeno solúvel de *M. tuberculosis* obtido a partir da cepa referência H37Rv. O controle de reações inespecíficas foi realizado com controles de antígeno (sem anticorpo) e de conjugado (sem antígeno).

Para minimizar o consumo das proteínas recombinantes no ensaio as placas foram montadas com dois níveis de concentração protéica distintos, um com baixa concentração (250 η g/poço) e outro com concentração elevada (1.000 η g/poço). A diluição do conjugado foi fixada em 1:2.500 por ser o padrão de concentração empregada no laboratório. O soro de coelho hiperimunizado foi diluído em 1:100 e 1:200. Nos controles negativo e de reação inespecífica a absorbância variou entre 0,038 e 0,044 (diluição de soro 1:100), e entre 0,026 e 0,031 (diluição de soro 1:200). O controle positivo apresentou absorbância média na diluição de soro 1:100 de 0,102, e de 0,097 na diluição do soro 1:200, em ambas as concentrações de antígenos testadas. Todas as proteínas recombinantes avaliadas apresentaram reatividade superior ao nível de corte. Dentre as sete proteínas recombinantes avaliadas, quatro (TB10.4, MTSP11, ESAT-6 e MPT70) apresentaram valores de absorbância superiores à média do controle positivo (Tabela 6).

As Figuras 42 e 43 representam as absorbâncias obtidas por proteína, nas concentrações de antígeno de 250 e 1.000 η g/poço, respectivamente.

TABELA 6 - ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *M. tuberculosis* EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO

| diluição soro | concentração de antígeno = 250 η g/poço | | | | | | | controle positivo |
|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------|
| | proteína CFP10 | proteína TB10.4 | proteína TB10.3 | proteína MTSP11 | proteína ESAT-6 | proteína MPT70 | proteína MPT83 | |
| 1:100 | 0,092 | <u>0,142</u> | 0,047 | <u>0,301</u> | <u>0,165</u> | <u>0,338</u> | 0,044 | 0,115 |
| 1:100 | 0,070 | <u>0,128</u> | 0,044 | <u>0,256</u> | <u>0,135</u> | <u>0,318</u> | 0,038 | 0,089 |
| 1:100 | 0,072 | <u>0,143</u> | 0,041 | <u>0,262</u> | <u>0,117</u> | <u>0,273</u> | 0,041 | 0,102 |
| 1:100 | 0,037 | 0,038 | 0,035 | 0,037 | 0,038 | 0,035 | 0,044 | NR |
| 1:200 | 0,068 | 0,116 | 0,051 | <u>0,176</u> | 0,091 | <u>0,170</u> | 0,058 | 0,093 |
| 1:200 | 0,067 | 0,091 | 0,034 | <u>0,154</u> | 0,068 | <u>0,148</u> | 0,039 | 0,102 |
| 1:200 | 0,069 | 0,116 | 0,053 | <u>0,140</u> | 0,077 | <u>0,164</u> | 0,037 | 0,097 |
| 1:200 | 0,031 | 0,030 | 0,029 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | NR |

| diluição soro | concentração de antígeno = 1.000 η g/poço | | | | | | | controle positivo |
|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------|
| | proteína CFP10 | proteína TB10.4 | proteína TB10.3 | proteína MTSP11 | proteína ESAT-6 | proteína MPT70 | proteína MPT83 | |
| 1:100 | 0,063 | <u>0,183</u> | 0,033 | <u>0,337</u> | 0,092 | <u>0,170</u> | 0,048 | 0,115 |
| 1:100 | 0,062 | <u>0,142</u> | 0,035 | <u>0,350</u> | 0,094 | <u>0,146</u> | 0,049 | 0,089 |
| 1:200 | 0,070 | <u>0,119</u> | 0,033 | <u>0,186</u> | 0,074 | 0,109 | 0,045 | 0,093 |
| 1:200 | 0,055 | <u>0,120</u> | 0,034 | <u>0,176</u> | 0,073 | 0,070 | 0,044 | 0,102 |

NOTA: Resultados sublinhados representam os valores de absorvância superiores à média do controle positivo; resultados sombreados representam os valores dos controle negativo e de reação inespecífica; NR = não realizado

FIGURA 42 - ABSORBÂNCIA OBTIDA NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *M. tuberculosis* EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO, POR TESTE ELISA, COM OS SEGUINTE PARÂMETROS: CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO = 250 η G/POÇO; DILUIÇÃO DE SORO = 1:100; CTB = CONTROLE POSITIVO; NEG = CONTROLE NEGATIVO E DE REAÇÃO INESPECÍFICA

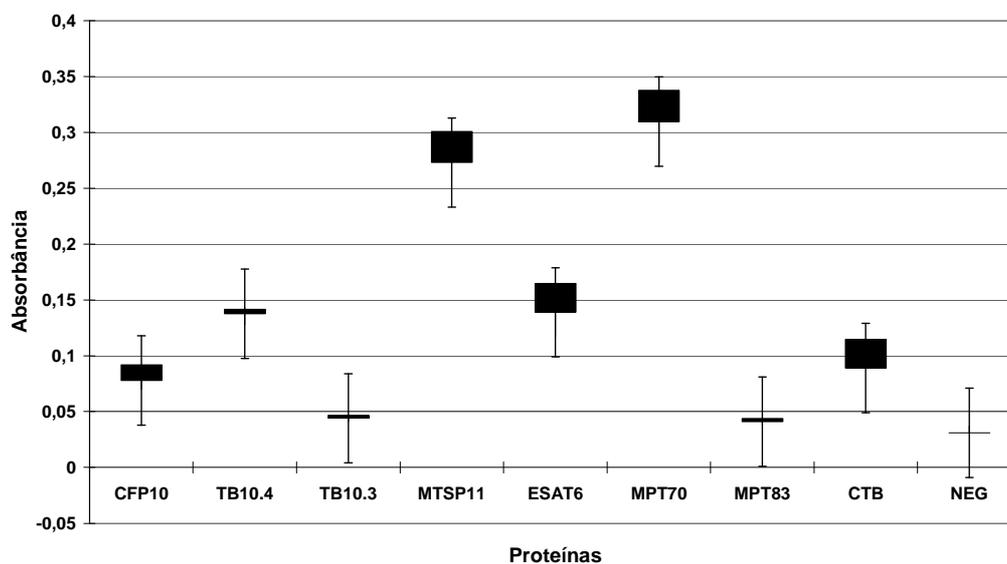
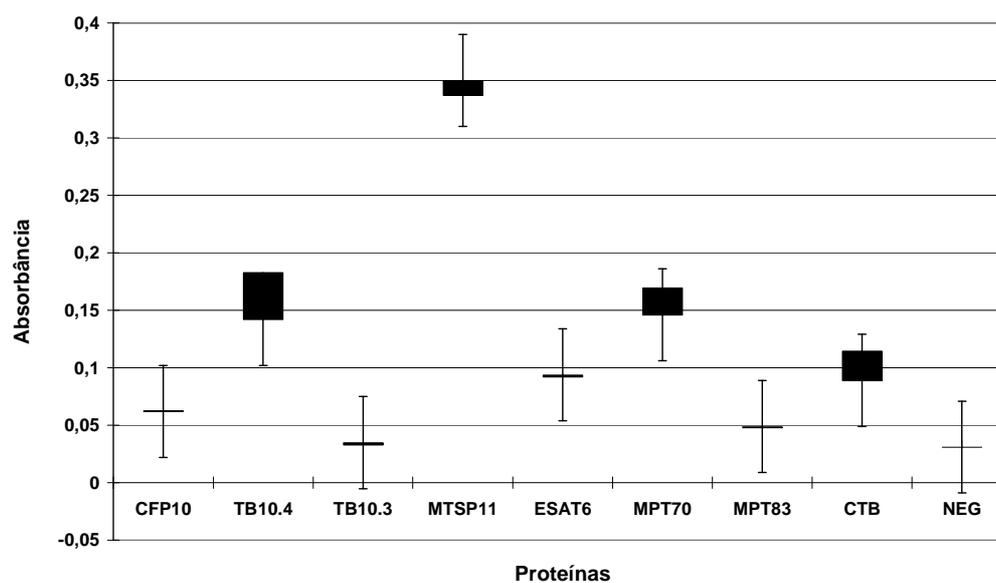


FIGURA 43 - ABSORBÂNCIA OBTIDA NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *M. tuberculosis* EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO, POR TESTE ELISA, COM OS SEGUINTE PARÂMETROS: CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO = 1.000 η G/POÇO; DILUIÇÃO DE SORO = 1:100; CTB = CONTROLE POSITIVO; NEG = CONTROLE NEGATIVO E DE REAÇÃO INESPECÍFICA.



5.4.2 Análise Estatística dos Resultados

A análise pelo teste de Tukey indicou que das sete proteínas recombinantes testadas, quatro (TB10.4, MTSP11, ESAT-6 e MPT70) diferiram significativamente (95% de confiança) das demais em intensidade de absorvância produzida. Destas, duas proteínas, MPT70 e MTSP11, apresentaram valores médios de absorvância mais de três vezes superiores à média do controle positivo, na concentração de antígeno de 250 η g/poço. A Tabela 7 demonstra os resultados médios de absorvância e desvio padrão para cada proteína, nas diferentes concentrações de antígeno e de soro avaliadas.

TABELA 7 - MÉDIA DE ABSORBÂNCIAS E DESVIO PADRÃO POR PROTEÍNA NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENO E DE SORO TESTADAS

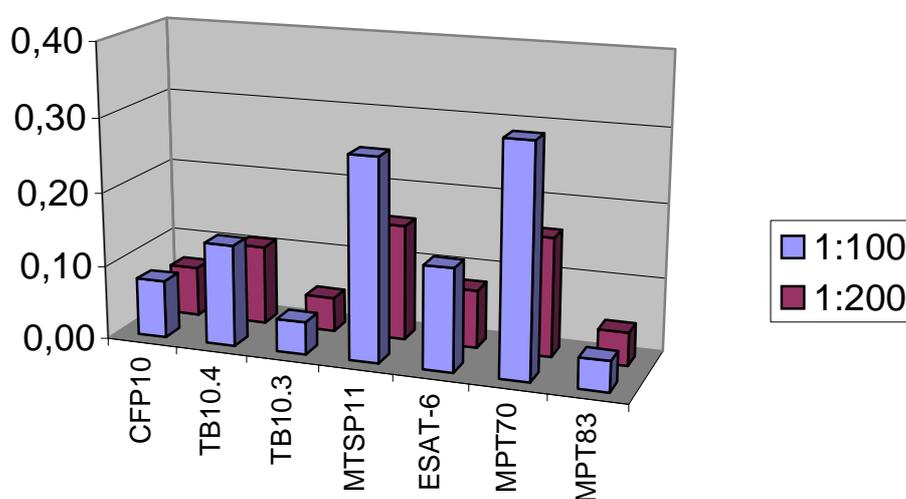
| Proteínas | PRESENÇA DE ANTICORPOS EM SORO | | | | | | | |
|-----------|--------------------------------|----------|--------------------|----------|-------------------|----------|--------------------|----------|
| | 1:100 | | | | 1:200 | | | |
| | 250 η g/poço | | 1000 η g/poço | | 250 η g/poço | | 1000 η g/poço | |
| | média | \pm sd | média | \pm sd | média | \pm sd | média | \pm sd |
| CFP10 | 0,078 | 0,012 | 0,063 | 0,001 | 0,068 | 0,001 | 0,063 | 0,011 |
| TB10.4 | 0,138 | 0,008 | 0,163 | 0,029 | 0,108 | 0,014 | 0,120 | 0,001 |
| TB10.3 | 0,044 | 0,003 | 0,034 | 0,001 | 0,046 | 0,010 | 0,034 | 0,001 |
| MTSP11 | 0,273 | 0,024 | 0,344 | 0,009 | 0,157 | 0,018 | 0,181 | 0,007 |
| ESAT-6 | 0,139 | 0,024 | 0,093 | 0,001 | 0,079 | 0,012 | 0,074 | 0,001 |
| MPT70 | 0,310 | 0,033 | 0,158 | 0,017 | 0,161 | 0,011 | 0,090 | 0,028 |
| MPT83 | 0,041 | 0,003 | 0,049 | 0,001 | 0,045 | 0,012 | 0,045 | 0,001 |
| CV | 73,47% | | 83,34% | | 51,42% | | 58,61% | |

NOTA: CV = coeficiente de variação; sd = desvio padrão

A presença de anticorpos difere de forma altamente significativa ($p < 0,001$) com a utilização das proteínas, em função da concentração do soro. Existe uma

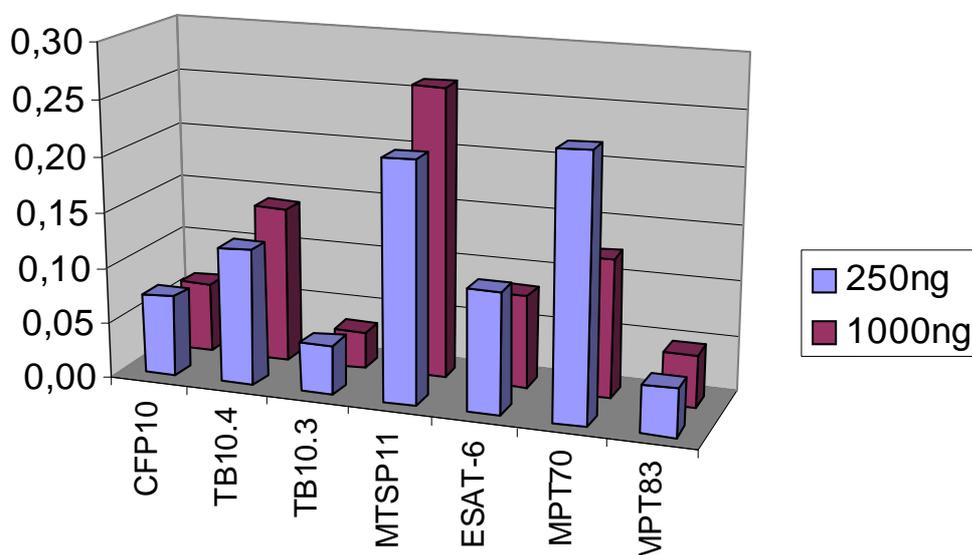
interação entre a proteína utilizada e a concentração do soro, ao nível de 10% de significância, indicando que, para determinada proteína, deva ser utilizada a menor diluição do soro (1:100). As Figuras 44 e 45 representam os resultados de absorbância produzidos em função da diluição de soro e da concentração de antígeno, respectivamente.

FIGURA 44 - MÉDIAS DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *M. tuberculosis* EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DE SORO TESTADA



NOTA: Eixo X = média das absorbâncias obtidas; eixo Y = proteínas recombinantes avaliadas; barras em azul = diluição de soro 1:100; barras em vermelho = diluição de soro 1:200

FIGURA 45 - MÉDIAS DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *M. tuberculosis* EM SORO DE COELHO HIPERIMUNIZADO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO TESTADA



NOTA: Eixo X = média das absorvâncias obtidas; eixo Y = proteínas recombinantes avaliadas; barras em azul = concentração de antígeno 250 ng/poço; barras em vermelho = concentração de antígeno 1.000 ng/poço

5.5 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR: BIOENSAIOS EM *C. porcellus* E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

5.5.1 Bioensaios – Provas de Potência Relativa

A capacidade das proteínas recombinantes de desencadear resposta imune celular foi avaliada pela leitura da intradermorreação em cobaios *C. porcellus*, considerando o tamanho das reações de endureção produzidas pela injeção das proteínas puras e diluídas, em separado e conjugadas em coquetel múltiplo. Os cobaios foram previamente sensibilizados com inóculos preparados com cepas inativadas de *M. tuberculosis* H37Rv. Vale ressaltar que experimentos anteriores (“provas em branco”) foram realizados injetando-se as proteínas recombinantes e a

tuberculina PPD padrão em cobaios *C. porcellus* procedentes do mesmo criadouro e mantidos sob idênticas condições ambientais e nutricionais, porém sem prévia sensibilização, onde não foram constatadas quaisquer reações cutâneas.

Nenhum dos animais utilizados nos testes apresentou reação cutânea ou outro sinal que pudesse ser atribuído ao produto injetado para as aplicações de diluente puro, extrato de *E. coli* e tampão de proteínas.

As reações cutâneas foram classificadas de acordo com padronização clássica adotada no Brasil constando em manuais técnicos do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), seguindo os seguintes critérios de leitura:

| | |
|--------------|--------------------------|
| Não reator | 0 a 4 mm |
| Reator fraco | 5 a 9 mm |
| Reator forte | igual ou maior que 10 mm |

As Figuras 46 e 47 ilustram a leitura dos resultados realizada 24 horas após a inoculação intradérmica nos cobaios. O Quadro 5 relaciona os resultados obtidos onde se observa que todas as proteínas avaliadas apresentaram reação de enduração com diâmetro superior a 4 mm, com intervalo de 5 a 17 mm, quando testadas individualmente. Quando testadas combinadamente, na forma de coquetel, o diâmetro de enduração variou de 8 a 19 mm. A Figura 48 demonstra em forma gráfica o diâmetro médio produzido pelo PPD padrão e pelas proteínas recombinantes, testadas nas concentrações de 0,0004, 0,004 e 0,04 mg/mL. A Figura 49 demonstra a distribuição dos resultados de diâmetro de enduração em função das diferentes concentrações de proteínas inoculadas.

FIGURA 46 - REAÇÃO DE ENDURAÇÃO, PRODUZIDA NO LOCAL DE APLICAÇÃO DE ANTÍGENO DE *M. tuberculosis*. OS ASSINALAMENTOS FEITOS COM CANETA PARA RETROPROJETOR NO CENTRO E AO REDOR DO ERITEMA DELIMITARAM AS DIMENSÕES DA REAÇÃO E FACILITARAM AS LEITURAS



FIGURA 47 - LEITURA DOS TAMANHOS DAS REAÇÕES DE ENDURAÇÃO EM *C. porcellus* PREVIAMENTE SENSIBILIZADOS COM *M. tuberculosis* 24 HORAS APÓS A INJEÇÃO



| QUADRO 5 - RESULTADOS GERAIS DAS LEITURAS (EM MILÍMETROS) DOS TAMANHOS DAS ENDURAÇÕES RESULTANTES DAS INOCULAÇÕES INTRADÉRMICAS REALIZADAS EM <i>C. porcellus</i> SENSIBILIZADOS PREVIAMENTE COM <i>M. tuberculosis</i> . NOTA: NR = NÃO REALIZADO | | | | | |
|--|--------|----------------------------|-------|------|--------------|
| MATERIAL INOCULADO | COBAIO | CONCENTRAÇÕES DO INOCULADO | | | |
| | | mg/mL | | | |
| | | 0,0004 | 0,004 | 0,04 | Sem diluição |
| Proteína CFP10 | I | 8 | 15 | 15 | NR |
| | IV | 10 | 14 | 13 | NR |
| | VIII | 13 | 12 | 14 | NR |
| | XI | 5 | NR | NR | 13 |
| | Média | 9 | 13,7 | 14 | 13 |
| Proteína TB10.4 | I | 7 | 14 | 15 | NR |
| | V | 14 | 13 | 10 | NR |
| | VIII | 13 | 9 | 12 | NR |
| | XI | 13 | NR | NR | 15 |
| | Média | 11,8 | 12 | 12,3 | 15 |
| Proteína TB10.3 | II | 12 | 9 | 14 | NR |
| | V | 9 | 12 | 14 | NR |
| | VIII | 7 | 13 | 12 | NR |
| | Média | 9,3 | 11,3 | 13,3 | NR |
| Proteína MTSP11 | II | 12 | 8 | 15 | NR |
| | V | 10 | 15 | 10 | NR |
| | IX | 13 | 12 | 11 | NR |
| | XI | 6 | NR | NR | 12 |
| | Média | 10,3 | 11,7 | 12 | 12 |
| Proteína ESAT-6 | II | 14 | 12 | 11 | NR |
| | VI | 5 | 11 | 10 | NR |
| | IX | NR | 11 | 12 | NR |
| | XII | 10 | NR | NR | 11 |
| | Média | 9,75 | 11,3 | 11 | 11 |
| Proteína MPT70 | III | 7 | 13 | 17 | NR |
| | VI | 9 | 9 | 11 | NR |
| | X | 9 | 10 | 12 | NR |
| | XII | NR | NR | NR | 11 |
| | Média | 8,3 | 10,6 | 13,3 | 11 |
| Proteína MPT83 | III | 8 | 9 | 16 | NR |
| | VII | 14 | 11 | 11 | NR |
| | X | 8 | 12 | 12 | NR |
| | XII | 9 | NR | NR | NR |
| | Média | 9,75 | 10,6 | 13 | NR |
| Coquetel | IV | 14 | 17 | 18 | NR |
| | VII | 11 | 10 | 18 | NR |
| | X | 8 | 9 | 19 | NR |
| | XII | 8 | NR | NR | 12 |
| | Média | 10,25 | 12 | 18,3 | 12 |
| PPD Padrão | I | 14 | NR | NR | NR |
| | II | 13 | NR | NR | NR |
| | III | 11 | NR | NR | NR |
| | IV | 13 | NR | NR | NR |
| | Média | 12,75 | | | |

FIGURA 48- DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE DIÂMETRO MÉDIO DE ENDURAÇÃO E DE DESVIO PADRÃO DO PPD REFERÊNCIA E DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM COBAIOS *C. porcellus* PREVIAMENTE SENSIBILIZADOS COM *M. tuberculosis*

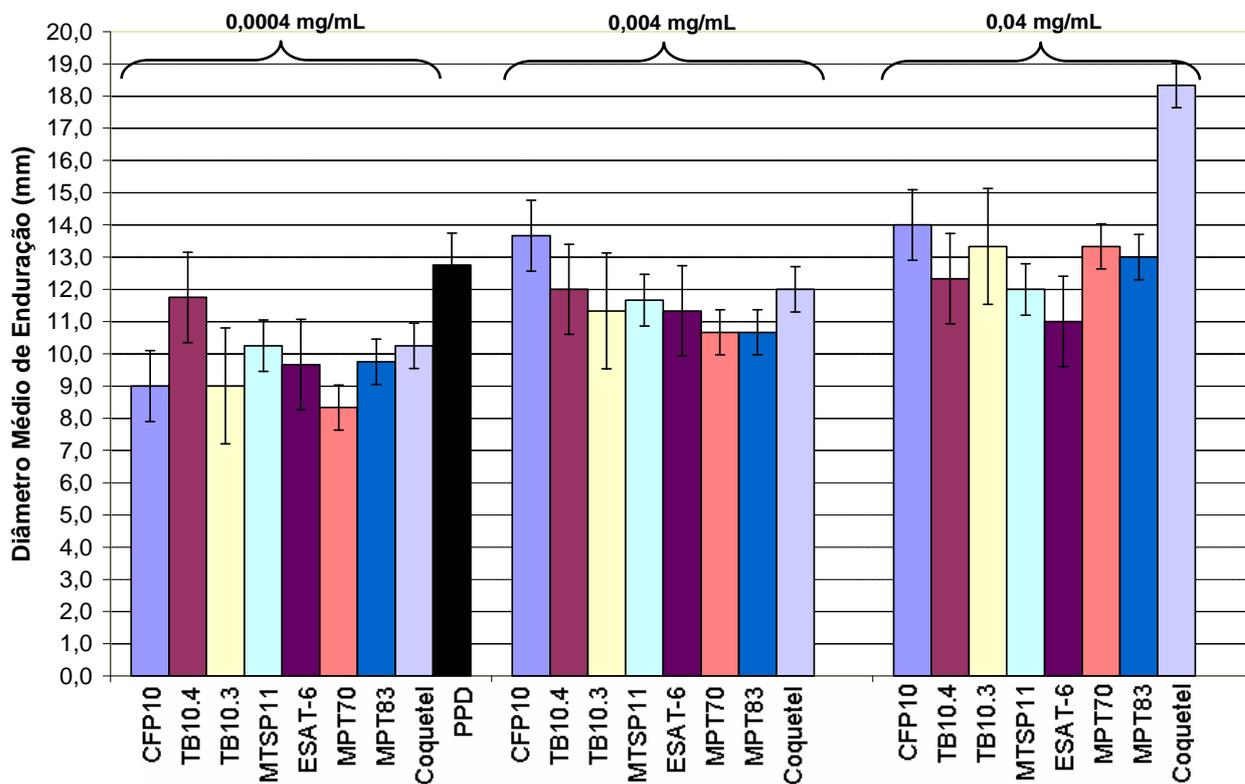
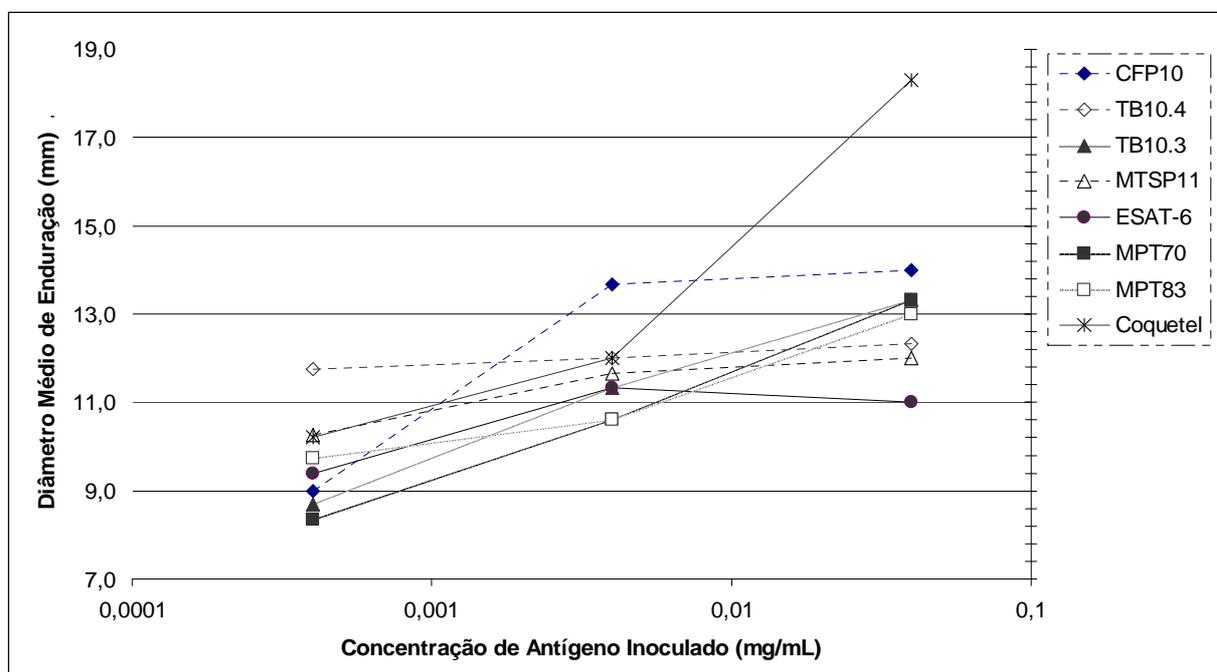


FIGURA 49- DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DE DIÂMETRO DE ENDURAÇÃO PRODUZIDOS PELAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES INOCULADAS EM COBAIOS *C. porcellus* PREVIAMENTE SENSIBILIZADOS COM *M. tuberculosis* EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES



5.5.2 Análise Estatística dos Resultados

Para testar se as diferenças de diâmetro de endureção produzidas pelas proteínas recombinantes avaliadas e pelo PPD padrão são significativamente diferentes foi efetuado um teste de concordância entre as análises. O diâmetro do halo obtido com o uso do PPD padrão foi comparado ao produzido pelas proteínas testadas isoladamente e combinadas, nas concentrações de 0,0004, 0,004 e 0,04 mg/mL. Pela ausência de ensaios em replicatas, as proteínas recombinantes sem diluição não foram objeto de análise estatística.

Foi utilizado o teste t (Student) para amostras independentes, com $\sigma_1 = \sigma_2$ com a formulação das seguintes hipóteses: $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$; $H_1: \mu_1 - \mu_2 > 0$; sendo μ_1 = diâmetro médio do PPD padrão e μ_2 = diâmetro médio da proteínas recombinantes testadas. Ou seja, a hipótese nula (H_0) pressupõe a não existência de diferenças

significativas entre os diâmetros médios produzidos pelas proteínas recombinantes e PPD padrão. A hipótese alternativa (H_1), ao contrário, pressupõe que os resultados sejam significativamente diferentes. Foi utilizado um nível de significância (α) de 0,05.

Observou-se que o “f” calculado foi maior que o “f” tabelado, dando evidências para afirmar que as variâncias diferem entre si. Para interpretação da estimativa do coeficiente, como regra geral, adotou-se que p-valores $> 0,05$ caracterizam uma boa concordância, significando, portanto, que as médias de diâmetro de endureção não diferem a um nível de significância de 0,05. p-valores abaixo do nível de significância implicam diferenças expressivas de resultados, não havendo concordância entre eles.

Na Tabela 8 são apresentados os resultados referentes à análise estatística para cada proteína e concentração avaliada, a saber, f calculado, t estimado, os limites inferior e superior do intervalo de 95% de confiança, além do p-valor do teste estatístico.

As únicas exceções foram a proteína MPT70 e o Coquetel, nas concentrações de 0,0004 e 0,04 mg/mL, respectivamente, onde foi detectada diferença significativa do diâmetro médio do halo de endureção produzido em relação ao PPD padrão. O diâmetro médio produzido pela intradermorreação com a proteína MPT70, na concentração de 0,0004 mg/mL, foi de 8,3 mm, valor significativamente inferior (p-valor=0,0173) ao produzido pelo PPD padrão (12,75 mm).

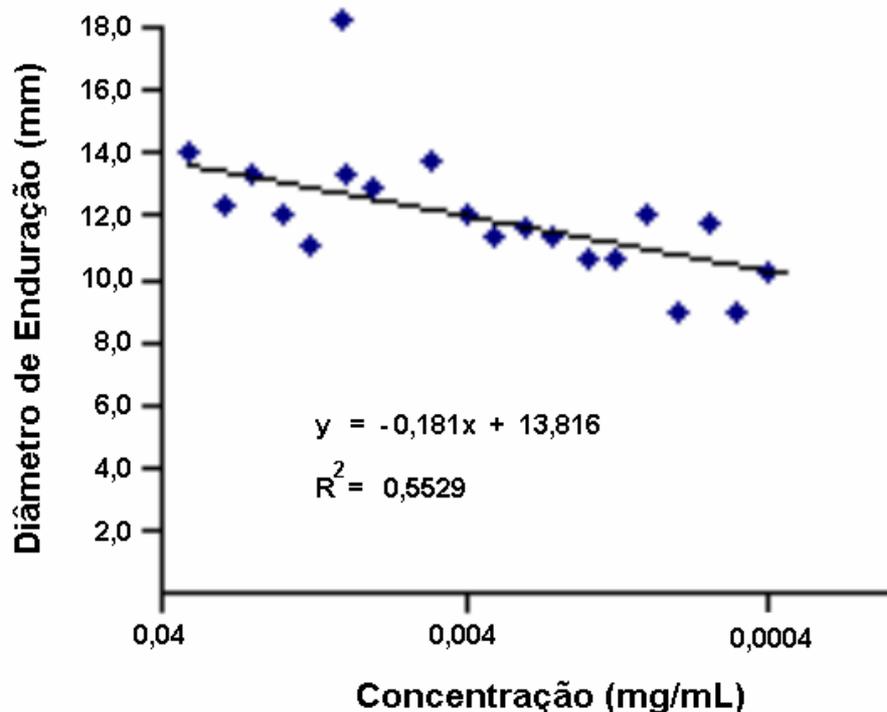
Por outro lado, o Coquetel, constituído pela combinação de todas as proteínas recombinantes produzidas, quando testado na concentração de 0,04 mg/mL, produziu os maiores diâmetro de reação intradérmica do ensaio (variando de 18 a 19 mm, com média de 18,3 mm), valores expressivamente superiores ao PPD padrão (p-valor=0,00386).

TABELA 8 - RESULTADOS DO TESTE DE CONCORDÂNCIA ENTRE PPD PADRÃO E AS DIFERENTES PROTEÍNAS RECOMBINANTES TESTADAS ISOLADAMENTE E COMBINADAS, NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES TESTADAS

| Proteína | Concentração (mg/mL) | f _{calc.} | t _{calc.} | Intervalo de 95% de confiança | p-valor |
|----------|----------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|---------|
| CFP10 | 0,0004 | 2,714 | -1,372 | (-7,052 ; 2,385) | 0,2417 |
| | 0,004 | 1,000 | 0,802 | (-2,462 ; 4,463) | 0,4676 |
| | 0,04 | 0,428 | 1,264 | (-1,593 ; 4,259) | 0,2746 |
| TB10.4 | 0,0004 | 6,142 | -0,567 | (-7,877 ; 5,211) | 0,2417 |
| | 0,004 | 3,000 | -0,378 | (-5,564 ; 4,231) | 0,4676 |
| | 0,04 | 1,000 | 0,105 | (-3,463 ; 3,463) | 0,9870 |
| TB10.3 | 0,0004 | 2,714 | -1,916 | (-8,052 ; 12,666) | 0,1214 |
| | 0,004 | 1,857 | -0,894 | (-5,472 ; 2,805) | 0,4216 |
| | 0,04 | 0,571 | 0,603 | (-0,2402 ; 3,736) | 0,5790 |
| MTSP11 | 0,0004 | 1,000 | -0,801 | (-4,463 ; 2,463) | 0,4676 |
| | 0,004 | 5,285 | -0,452 | (-7,139 ; 5,139) | 0,6745 |
| | 0,04 | 3,000 | 0,378 | (-5,564 ; 4,231) | 0,7247 |
| ESAT-6 | 0,0004 | 21,571 | -1,512 | (-17,966 ; 5,299) | 0,2052 |
| | 0,004 | 0,143 | -1,414 | (-3,951 ; 1,284) | 0,2302 |
| | 0,04 | 0,429 | -1,581 | (-4,593 ; 1,259) | 0,1890 |
| MPT70 | 0,0004 | 0,571 | -3,919 | (-7,403 ; 1,264) | 0,0173 |
| | 0,004 | 1,857 | -1,342 | (-6,139 ; 2,139) | 0,2508 |
| | 0,04 | 4,428 | 0,324 | (-5,038 ; 6,371) | 0,7619 |
| MPT83 | 0,0004 | 5,143 | -1,22 | (-8,735 ; 3,040) | 0,2895 |
| | 0,004 | 1,000 | -1,604 | (-5,463 ; 1,463) | 0,1841 |
| | 0,04 | 3,000 | 0,189 | (-4,564 ; 5,231) | 0,8593 |
| COQUETEL | 0,0004 | 3,857 | -0,857 | (-7,063 ; 3,729) | 0,4395 |
| | 0,004 | 8,142 | -0,25 | (-8,070 ; 6,737) | 0,8150 |
| | 0,04 | 0,143 | 6,0104 | (3,049 ; 8,284) | 0,0039 |

Ademais, foi observada correlação entre as concentrações de proteína inoculada e o tamanho das endurações geradas, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,5529, caracterizando que quanto mais concentrada é a proteína inoculada, maior é o diâmetro produzido pela intradermorreação (Figura 50).

FIGURA 50 - CORRELAÇÃO ENTRE DIÂMETRO DE ENDURAÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE INOCULADA



NOTA: $y=-0,181x+13,816$ = fórmula de regressão linear (eixo y em função de eixo x); R^2 = coeficiente de determinação

As diferenças verificadas entre os halos de endurecimento produzidos se correlacionam significativamente com a concentração de proteína inoculada ($p < 0,001$). Na Tabela 9 podem ser observados os valores médios de halos de endurecimento, desvio padrão e coeficiente de variação em função das proteínas e das concentrações testadas.

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS MÉDIO DE ENDURAÇÃO PRODUZIDOS EM DECORRÊNCIA DAS DIFERENTES PROTEÍNAS E CONCENTRAÇÕES TESTADAS

| Proteína | CONCENTRAÇÕES DAS PROTEÍNAS INOCULADAS (mg/mL) | | | | | |
|----------|--|------|--------------------|------|--------------------|------|
| | 0,0004 | | 0,004 | | 0,04 | |
| | média | ± sd | média | ± sd | média | ± sd |
| CFP10 | 9,00 ^a | 3,40 | 13,67 ^b | 1,50 | 14,00 ^b | 1,00 |
| TB10.4 | 11,75 ^a | 3,20 | 12,00 ^a | 2,60 | 12,33 ^b | 2,50 |
| TB10.3 | 9,00 ^a | 2,20 | 11,33 ^b | 2,10 | 13,33 ^c | 1,20 |
| MTSP11 | 10,25 ^a | 3,10 | 11,67 ^b | 3,50 | 12,00 ^b | 2,60 |
| ESAT-6 | 9,67 ^a | 4,50 | 11,33 ^b | 0,60 | 11,00 ^b | 1,00 |
| MPT70 | 8,33 ^a | 1,20 | 10,67 ^b | 2,10 | 13,33 ^c | 3,20 |
| MPT83 | 9,75 ^a | 2,90 | 10,67 ^b | 1,50 | 13,00 ^c | 2,60 |
| Coquetel | 10,25 ^a | 2,90 | 12,00 ^b | 4,40 | 18,33 ^c | 0,58 |
| CV | 9,74% | | 10,34% | | 6,53% | |

NOTA: Letras diferentes (a, b ou c) na horizontal significam que as concentrações diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey; letras iguais na horizontal significam ausência de diferença significativa pelo teste de Tukey; sd = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *M. tuberculosis*

M. tuberculosis e outras espécies do complexo *M. tuberculosis* (*M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum* e *M. canetti*) compõem um grupo geneticamente homogêneo, com grande parte do seu genoma – de 4.411.529 bases e estimados 3.924 genes codificantes de proteínas – constituído por seqüências nucleotídicas conservadas (COLE et al., 1998). No entanto, observa-se no genoma de *M. tuberculosis* ampla presença de elementos repetitivos de DNA, particularmente seqüências de inserção. Padrões de polimorfismo podem ser obtidos pela identificação e visualização do número de cópias e posição de elementos móveis do DNA (seqüências de inserção e transposons), com grande utilidade para estudos epidemiológicos, taxonômicos e filogenéticos.

Um destes elementos, o IS6110, é uma seqüência identificada inicialmente em *M. tuberculosis* por THIERRY et al. (1990), constituída de 1.355 pares de bases e distribuída repetidamente ao longo do seu genoma. Apesar de IS6110 ser um elemento de inserção ativo e capaz de transposição, o número de cópias e a distribuição desta seqüência provaram ser estáveis em situações de surtos epidêmicos, resultando na possibilidade de sinalizar cadeias de transmissão (CAVE et al., 1991; MAZUREK et al., 1991) e de revelar nexos temporais, pessoais e geográficos não acessíveis à investigação epidemiológica clássica (LAMBREGTS et al., 2003).

O método padrão para genotipagem molecular de IS6110 em *M. tuberculosis* é baseado no polimorfismo do comprimento de fragmentos obtidos por restrição enzimática (RFLP) do DNA micobacteriano (VAN EMBDEN et al., 1992). Contudo, como este método não utiliza nenhuma forma de amplificação do DNA, é necessária grande quantidade de material genético microbiano (igual ou superior a 2 µg) para propiciar uma genotipagem satisfatória, restringindo a aplicação da técnica para estudos

populacionais e análises retrospectivas (MOSTROM et al., 2002). Já os métodos de genotipagem molecular que se servem da amplificação de fragmentos de DNA pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) permitem a obtenção de tipagem genética equivalente ao método padrão, mas a partir de quantidades muito menores de DNA. Tal condição reduz o tempo necessário de cultivo das micobactérias, diminuindo o risco de contaminação e possibilitando a análise molecular, mesmo em meios de cultura danificados, ressecados e até inviáveis.

Por propiciar o mesmo grau de diferenciação filogenética das cepas em amostras contendo pequenas quantidades de DNA de *M. tuberculosis*, o método conhecido como mixed-linker PCR DNA fingerprinting está sendo cada vez mais empregado para a análise epidemiológica molecular da tuberculose (HAAS et al., 1993; BURGER et al., 1998; KREMER et al., 1999; DALL'STELLA et al., 2007). HAAS et al. (1993) demonstraram a vantagem da técnica de mixed-linker PCR sobre o RFLP tradicional, pela utilização de menor quantidade de DNA genômico. KREMER et al. (1999) em um extensivo estudo interlaboratorial comparando cinco métodos de tipagem por RFLP e sete diferentes ensaios por PCR concluíram que a diferenciação de linhagens de *M. tuberculosis* pela análise de IS6110 por RFLP e mixed-linker PCR DNA fingerprinting são ambos os métodos de escolha para investigação epidemiológica e filogenética pelo nível de reprodutibilidade e poder de discriminação alcançados.

No presente experimento, três a 10 colônias foram retiradas de meio LJ e ressuspensas em 500 μL de solução fisiológica ou água deionizada estéreis, resultando em concentrações de DNA genômico entre 48 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ e 242 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$.

Os diferentes padrões de bandas das cepas micobacterianas obtidos neste experimento serviram como base para a construção de uma tabela disjuntiva a partir da qual foi possível construir o dendrograma, o que permitiu estabelecer a identificação de agrupamentos por similaridade filogenética e estabelecer relações genéticas entre os genótipos. A técnica de agrupamento hierárquica identifica as amostras por suas similaridades onde as amostras semelhantes segundo variáveis

escolhidas são agrupadas entre si, numa escala que vai de 100% (identidade) a 0% (nenhuma similaridade). Quanto menor a distância entre dois pontos, maior é a semelhança entre os componentes.

A identificação e diferenciação de linhagens de *M. tuberculosis* pela análise do polimorfismo do elemento de inserção IS6110 têm sido empregada como ferramenta para estudos epidemiológicos em países desenvolvidos há mais de uma década (THIERRY et al., 1990; VAN SOOLINGEN et al., 1993; ALLAND et al., 1994). Todavia, existem poucos estudos dessa natureza realizados em países em desenvolvimento, como o Brasil (RAMOS et al., 1999; SUFFYS et al., 2000; FANDINHO et al., 2000; BAPTISTA et al., 2002; CALUSNI et al., 2003; BORSUK et al., 2005).

Este trabalho demonstrou diferentes padrões de polimorfismo para o elemento IS6110 em isolados de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes atendidos no Estado do Paraná, com diferenças no número de cópias e na localização genômica do elemento de inserção.

Uma das restrições do uso da seqüência IS6110 como ferramenta para estudos filogenéticos é de relatos de sua ausência notada em alguns estudos. Em 1993, VAN SOOLINGEN et al., informaram, pela primeira vez, o encontro de um isolado proveniente da Índia em que ela não foi demonstrada. RADHAKRISHAN et al. (2001) informaram que em amostragem constituída por 80 isolados, também oriunda de populações da Índia, em 19 não foi demonstrada a presença da seqüência IS6110. No entanto, esta ocorrência aparenta ser rara se considerados dados mundiais, sendo a presença do elemento IS6110 característica de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, havendo, inclusive, métodos de diferenciação e identificação de espécie baseados na sua detecção. Uma possível explicação para a não observação da seqüência IS6110 nas populações da Índia poderia ser atribuída a seu isolamento geográfico e a possível evolução dos isolados a partir de poucos ancestrais (BASSO, 2006).

Outra limitação desse método é a possibilidade de existência de poucas seqüências em um genótipo particular. Considera-se não haver polimorfismo suficiente

que permita o agrupamento em clones quando os isolados, mesmo possuindo localização idêntica das seqüências, exibem menos que cinco cópias.

No presente trabalho a maioria dos isolados (93,5%) apresentou múltiplas cópias do elemento IS6110, ou seja, a presença de cinco ou mais cópias por isolado. Um baixo número de isolados (6,5%) apresentou menos que cinco cópias e nenhum isolado com ausência de cópias foi detectado. Estes resultados estão de acordo com o observado por estudos que descreveram um predomínio de subgrupos com múltiplas cópias em isolados obtidos de outras populações brasileiras oriundas de áreas urbanas dos Estados do Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e do município de Campinas (BURGER et al., 1998; FANDINHO et al., 2000; SUFFYS et al. 2000; CALUSNI et al., 2003). Embora o número de isolados analisados não seja suficiente para permitir inferências aplicáveis ao total de casos observados no país ou mesmo no Estado do Paraná, esses resultados possibilitam afirmar que o método pode ser aplicado para estudos filogenéticos e que, em número razoável de casos, uma segunda técnica, como o RFLP, poderá ser utilizada para o eventual relacionamento genotípico entre isolados que exibam menos que cinco cópias de IS6110.

A comparação do número de cópias do elemento IS6110 e seu padrão de polimorfismo não demonstraram a tendência de formação em *cluster*, entendendo-se como tal similaridade de ao menos 95% do padrão eletroforético apresentado. Apenas um *cluster* contendo dois isolados (3,2%) foi observado no presente estudo. Outros pesquisadores descrevem maior tendência de estratificação em *cluster* em populações brasileiras de grandes centros urbanos. FANDINHO et al. (2000) relatam no Estado do Rio de Janeiro cerca de 19% de padrões em *cluster*, com forte associação com multi-droga resistência. CAFRUNE et al. (2006) apontam 34% de *clusters* em população do Rio Grande do Sul, com predomínio em indivíduos aposentados. BORSUK et al. (2005) descrevem 32% de padrões em *cluster* em pacientes atendidos no Sistema de Saúde oriundos de dois municípios do Estado do Rio Grande do Sul (Rio Grande e Pelotas) com elevada taxa de incidência da doença (cerca de 74/100.000 habitantes).

Tais divergências podem ser reflexo de diferenças de tamanho amostral entre o presente trabalho e os anteriormente citados, dada a natureza randômica do estudo. Esta dedução é corroborada pelos achados de CHAUHAN et al. (2004), que relatam a não observação de *clusters* em isolados obtidos da população da região de Agra, na Índia, cuja amostragem utilizada (n=60) foi semelhante ao presente trabalho.

Para melhor compreensão da amostragem utilizada neste trabalho, foram notificados, no período de novembro de 2004 a março de 2005, 1.148 casos de tuberculose no Estado do Paraná, 624 dos quais (54,3%) com baciloscopia positiva. Do total de doentes no período, 938 (81,8%) apresentaram tuberculose pulmonar, 170 (14,8%) formas extrapulmonares da doença e 39 (3,4%) ambas as formas. Portanto, a amostragem realizada neste trabalho, constituída por 62 pacientes atendidos em serviços de saúde do Estado do Paraná, representa 5,4% das notificações no período, um número reduzido em relação à expectativa do total de casos, limitando inferências sobre a ocorrência de tuberculose no estado.

Outros fatores têm sido apontados como de influência para a formação de *clusters*, tais como taxa de incidência da doença, heterogeneidade da população, se paciente com internação hospitalar ou não, contexto geográfico e temporal, dentre outros (STRASSLE et al., 1997). FANDINHO et al. (2000) relatam, pela comparação de resultados de diversos autores (TORREA et al., 1996; STRASSLE et al., 1997; GUTIERREZ et al., 1998; CHAUHAN et al., 2000), um aumento expressivo de estratificação em *cluster* quando a amostragem populacional é ampliada, passando a ser composta por isolados provenientes de múltiplas instituições, de diversas localidades e obtida de período amostral maior.

Há diferenças entre países com grande e baixa incidência de tuberculose quando se compara o grau de relacionamento filogenético de um grupo de cepas estudadas. Observa-se que, em países com grande número de casos de tuberculose, há também uma considerável similaridade entre os perfis obtidos, possivelmente decorrentes de uma transmissão intensa de microrganismos entre os indivíduos, o que permite inferir que esses organismos tenham parentesco próximo. Por outro lado, nas

áreas de baixa prevalência, a maioria dos casos de doença correspondem a reativações, causadas, portanto, por microrganismos não relacionados (BASSO, 2006).

Padrões de formação em *cluster* são indicativos de infecção exógena, resultante de transmissão recente e de natureza clonal, típicas em surtos epidemiológicos. Por outro lado, padrões únicos de polimorfismo, sem a formação de *clusters*, estão associados à reativação de infecção latente, indicando que a infecção primária tenha ocorrido em diferentes contextos geográficos e temporais, por linhagens de *M. tuberculosis* distintas.

Vale ressaltar que a ausência de informações clínicas e de origem geográfica no Estado das amostras objeto do presente trabalho limita sua inferência sobre possíveis causas do menor número de estratificação em *cluster* observado. No entanto, o baixo número de formação em *cluster* apontado sugere um predomínio de desenvolvimento da doença por reativação de infecção latente em relação à transmissão exógena no Estado do Paraná.

6.2 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNOGÊNICAS DE *M. tuberculosis*

Dos 25 genes codificantes de proteínas submetidos ao processo de clonagem, sete expressaram proteínas de forma satisfatória. A qualidade do DNA genômico demonstrou ser um parâmetro crítico para o sucesso dos ensaios baseados em PCR. O procedimento de extração de DNA adotado (método de congelamento-aquecimento) resulta, freqüentemente, em DNA contaminado com diversas biomoléculas como proteínas, polissacarídeos ou compostos fenólicos oxidados, reconhecidos inibidores de enzimas DNA polimerases (KATO et al., 2005). A redução da quantidade de DNA genômico nas reações, em algumas situações, diminuiu as impurezas permitindo a amplificação.

A finalidade da PCR na abordagem de clonagem escolhida foi de amplificar a seqüência alvo e nela acrescentar os sítios de recombinação para ingresso na plataforma Gateway®, sendo, portanto, passo fundamental para a produção dos clones de entrada. Isoladamente, foi a etapa mais limitante no índice final de sucesso, sendo amplificados, satisfatoriamente, 14 dos 25 (56%) genes a ela submetidos.

A otimização da PCR demonstrou ser fator determinante para obtenção de êxito na amplificação. Alterações dos parâmetros gerais de PCR, como padronização das temperaturas e das condições de estringência na etapa de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores da reação (com a conseqüente redução e eliminação de bandas inespecíficas), a ampliação do número de ciclos de PCR (para aumento do rendimento) e a determinação da concentração ideal de cloreto de magnésio na reação (de modo a favorecer rendimento e especificidade), foram fundamentais, em alguns casos, para sucesso na amplificação.

Vale ressaltar que a ênfase nos ensaios de otimização de PCR e de alterações de quantidades de DNA submetidos à amplificação se restringiram aos genes codificantes das proteínas consideradas chaves para a seqüência dos experimentos (CFP10 e ESAT-6). Portanto, testes exaustivos de alterações dos parâmetros de PCR não foram realizados, indiscriminadamente, para todos os genes que apresentaram baixo rendimento de amplificação.

A etapa seguinte consistiu na purificação dos produtos de PCR por precipitação com PEG, com o objetivo de remover seqüências de DNA indesejadas, tais como excesso e dímeros de iniciadores de reação. Neste passo, um dos 14 genes amplificados não foi recuperado (Rv3880c), notadamente o de menor tamanho (242 pb), possivelmente esta a razão de sua perda no processo visto a precipitação por PEG ser adequada para purificação de moléculas de DNA com tamanho superior a 300 pb. Produtos de PCR de dois outros genes (Rv0288 e Rv3019c) também tiveram considerável perda no processo, porém foram recuperados em quantidade minimamente suficiente para seqüência das atividades.

Os processos de confirmação dos clones de entrada gerados, especialmente o seqüenciamento de ácido nucléico, não permitiu a obtenção de resultados conclusivos para a presença dos insertos desejados nos clones correspondentes aos genes Rv1271c, Rv0934 e Rv1980c, razão pela qual foram descartados para a seqüência dos trabalhos de clonagem.

Importante frizar a eficiência da plataforma Gateway®, pois uma vez nela ingressadas as seqüências de interesse, confirmadas por seqüenciamento, em 100% dos casos foram produzidos clones de expressão. Tal índice de sucesso era esperado como pode ser verificado em outros trabalhos que empregam esta tecnologia, especialmente os relacionados com clonagem em alta escala visando, por exemplo, a construção de orfeomas (DRICOT et al., 2004; BECHTEL et al., 2007).

A expressão protéica se mostrou obstáculo para a obtenção das proteínas recombinantes. Dos 10 clones de entrada gerados neste trabalho, foram efetivamente expressas sete proteínas (70%).

Um fato que pode contribuir para reduzir o nível de expressão heteróloga em *E. coli* é o RNAm de bactérias não possuir qualquer tipo de proteção e ser rapidamente degradado durante a transcrição e tradução. Além disso, a estabilidade do RNAm é dependente do tamanho, os mais longos sendo mais estáveis, e quanto maior a estabilidade melhor é a disponibilidade para a tradução e mais eficiente é a expressão protéica (DABROWSKI; BRILLOWSKA; KUR, 1999). Assim, uma opção para contornar uma provável instabilidade do transcrito seria selecionar um vetor que possibilitasse a clonagem do gene de interesse em fusão com um parceiro que conferisse maior estabilidade à fusão e que fosse também altamente solúvel.

No entanto, a escolha da melhor proteína parceira ainda é empírica. Neste trabalho, os genes de interesse foram expressos em fusão com 6xHis, uma seqüência de seis resíduos consecutivos de histidina, comumente utilizada para purificação de proteína expressa.

Todas as proteínas expressas no presente estudo foram obtidas em fração insolúvel (corpos de inclusão), com exceção da proteína CFP10 expressa em ambas

as formas (solúvel e insolúvel). Salienta-se que as condições para a expressão foram pouco modificadas, não sendo o processo adaptado, à exaustão, para elevar o índice de expressão ou para a obtenção de formas de expressão solúveis.

A formação de corpos de inclusão (agregado protéico insolúvel) não traz, necessariamente, desvantagens ao processo, pois, o produto expresso tende a ser menos tóxico para a célula hospedeira, estando protegido da digestão proteolítica. Outro ponto positivo é o fato de serem facilmente isolados por centrifugação e, geralmente, consistirem em agregados parcialmente puros da proteína superexpressa (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

É freqüente a expressão heteróloga em *E. coli* acumular-se como corpos de inclusão, havendo diversas explicações para sua geração, tais como, superexpressão gênica, insuficiente nível de chaperoninas e presença de seqüências hidrofóbicas na proteína expressa (YASUKAWA et al., 1995).

RINAS e BAYNES (1993) sugerem que a formação de corpos de inclusão se deve à limitada quantidade de chaperoninas frente a superexpressão gênica, aliada a uma taxa de síntese protéica que exceda a capacidade da célula de enovelar a proteína recém sintetizada.

Entre os variados caminhos seguidos para a obtenção de proteínas solúveis destacam-se a redução da temperatura de incubação após a indução, a co-expressão de catalisadores de enovelamento como as DPI (*Protein Disulfide Isomerase*) e as chaperoninas, a fusão com um parceiro altamente solúvel e a mutação sítio-dirigida de resíduos específicos para alterar as propriedades de estabilidade e solubilidade da proteína recombinante (MURBY; UHLEN; STAHL, 1996). No entanto, essas abordagens nem sempre trazem resultados satisfatórios.

A mutação sítio-dirigida em proteínas tem aumentado a solubilidade em expressão heteróloga, principalmente quando afeta seqüências hidrofóbicas. No entanto, a modificação da proteína não é uma estratégia universal para evitar a formação dos corpos de inclusão, já que outras variáveis tais como condições ambientais como temperatura e acidificação do meio, característica do vetor e do

hospedeiro e a concentração do indutor, também estimulam sua formação (LINDWALL et al., 2000).

Assim, uma das estratégias mais utilizadas e, talvez, a primeira opção para testar o aumento da solubilidade seja diminuir a temperatura de indução, de modo a reduzir a taxa de tradução.

No presente trabalho, as cinco proteínas testadas (DPPD, CFP10, MPT63, MPT70 e TB10.4) com diferentes temperaturas de indução de expressão (20 e 37°C) não apresentaram alterações perceptíveis nos níveis de expressão ou solubilidade. Testes com outras temperaturas de indução de expressão não foram realizados por não se constituir como meta do presente trabalho a expressão de proteínas exclusivamente na forma solúvel.

Para DAVIS et al. (1999) a solubilidade de uma proteína é altamente dependente da sua seqüência de aminoácidos. Por outro lado, a co-expressão de chaperoninas tem sido um caminho promissor para aumentar a solubilidade e o enovelamento da proteína recombinante. No entanto, o sucesso dessa estratégia também parece ser proteína-específica (WALL; PLUCKTHUN, 1995).

Como bem lembrado por SAMBROOK e RUSSEL (2001) a ausência de um motivo único ou de um guia prático que solucione todos os problemas torna cada caso de expressão uma situação ímpar que deve ser resolvido empiricamente.

Classicamente, a purificação de proteínas, juntamente com a expressão protéica, têm se constituído nos maiores desafios na tecnologia do DNA recombinante (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). No presente trabalho, a purificação de proteínas não foi fator limitante no rendimento final do processo, pois todas as sete proteínas expressas foram purificadas com êxito. Dadas as características individuais e muitas vezes únicas de cada proteína, foram utilizados três protocolos distintos de purificação.

Primeiramente, o difundido método de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni-NTA), que apresentou índice pleno de êxito na obtenção de eluídos com alto teor protéico. A eluição foi realizada empregando-se apenas a abordagem

por concentrações crescentes de imidazol e não sendo útil, ou necessária, a técnica de eluição por decréscimo de pH. A quantidade de proteína recombinante purificada obtida oscilou entre 0,624 mg (TB10.3) a 2,780 mg (MPT70).

Visto que os resultados da purificação por coluna de afinidade apresentaram certa quantidade de proteínas contaminantes foi realizado um segundo método de purificação, baseado na separação eletroforética em SDS-PAGE, seguido de eletroeluição. Embora tenha tido sucesso na remoção de contaminantes protéicos de variado peso molecular, observou-se uma notável redução na quantidade de proteína recuperada. Em média, esta redução foi de quatro vezes, sendo a proteína MPT83 a que apresentou menor recuperação, reduzida de 2,42 mg (antes da eletroeluição) para 0,161 mg (pós-eletroeluição), 15 vezes menos, portanto. Tal impacto da eletroeluição na quantidade de proteína recuperada foi surpreendente e poderia ser atribuída a inexperiência no manejo com esta laboriosa e minuciosa técnica. Visto a execução da metodologia ter sido realizada em diferentes datas, as proteínas com maior índice de perda foram as obtidas nos primeiros experimentos, e as com maior recuperação, nos últimos.

Um terceiro método de purificação foi empregado, visando a remover lipopolissacarídeos, em sua maioria endotoxinas pirogênicas presentes na parede celular de muitas bactérias gram-negativas, incluindo a *E. coli*, organismo empregado na expressão da proteína recombinante. A remoção foi realizada mediante o emprego de detergente não iônico Triton X-114, conforme descrito por AIDA e PABST (1990). Tal metodologia não influenciou na quantidade final de proteína obtida.

6.3 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES – RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR

Aproximadamente um bilhão de dólares são gastos anualmente em testes diagnósticos para tuberculose em todo o mundo, sendo um terço deste valor (US\$ 326 milhões) em países em desenvolvimento, onde 73% dos diagnósticos são realizados. Para comparação, o volume de recursos financeiros para exames diagnósticos para tuberculose é pelo menos o dobro do atual mercado mundial para drogas antituberculosas (TDR; FIND, 2006).

A progressão da doença em indivíduos acometidos com tuberculose ativa pode ser efetivamente controlada se um diagnóstico precoce for realizado. Métodos de diagnóstico convencionais tais como baciloscopia e cultura carecem de especificidade, sensibilidade ou rapidez. Outros métodos, como os baseados em técnicas moleculares não são facilmente aplicáveis na rotina clínica pelo alto custo, necessidade de expertise profissional e equipamento especializado (KAMBASHI et al., 2001).

Entretanto, apesar da dimensão do mercado mundial de diagnósticos para tuberculose e da inadequação dos ensaios atualmente existentes, poucas empresas dispõem de métodos diagnósticos para a doença entre as companhias líderes globais do segmento de diagnóstico *in vitro*. Tal contraste pode ser reflexo de dificuldades de atração de investimentos para o desenvolvimento de testes para uma doença que é popularmente considerada como sob controle no mundo desenvolvido (TDR; FIND, 2006).

Deteção de anticorpos específicos contra *M. tuberculosis* em soros de pacientes alia as particularidades de serem meios de diagnóstico rápido, de fácil realização e com boa relação custo-benefício (MURTHY et al., 2007).

O uso de preparações brutas de antígenos para sorodiagnóstico tem a desvantagem de perder sensibilidade ou especificidade (DANIEL; DEBANNE, 1987; CHAN et al., 2000). No entanto, a utilização de antígenos purificados obtidos pela tecnologia de DNA recombinante pode sobrepor este problema. Diversos antígenos de

M. tuberculosis desencadeiam produção de anticorpos em pacientes com tuberculose, mas ainda nenhuma proteína foi categoricamente classificada como de utilidade para sorodiagnóstico (MURTHY et al., 2007).

Todas as sete proteínas recombinantes testadas por imunoenensaio apresentaram reatividade frente a soros de coelhos hiperimunizados, sendo que quatro (TB10.4, MTSP11, ESAT-6 e MPT70) apresentaram absorvâncias maiores que as produzidas pelo controle positivo. A análise pelo teste de Tukey indicou que estas quatro proteínas recombinantes diferiram significativamente (95% de confiança) das demais em intensidade de absorvância produzida.

Apesar de ESAT-6 e CFP10 serem, indiscutivelmente, as proteínas de *M. tuberculosis* mais bem estudadas e associadas à atividade imunogênica, duas proteínas (MTSP11 e MPT70) apresentaram reatividade maior em ensaios ELISA realizados neste trabalho, com valores de absorvância até três vezes superiores à média do controle positivo.

MTSP11 foi descrita por LIM et al (2004), que demonstraram a produção de IFN- γ em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis com teste tuberculínico positivo, não havendo relatos na literatura de estudos sorológicos prévios com esta proteína.

Embora bastante conhecida a atividade imunogênica de resposta celular da proteína MPT70, parece não haver registros anteriores de pesquisas de detecção de anticorpos contra esta proteína. No presente estudo, a proteína recombinante MPT70 apresentou resultados expressivos na detecção de anticorpos em soro de coelho imunizado com *M. tuberculosis*. LYASHCHENKO et al. (2001) demonstraram a reatividade de anticorpos monoclonais em murinos contra as proteínas MPB70 e MPB83, genes presentes em *M. bovis*, virtualmente idênticos aos genes das proteínas MPT70 e MPT83 de *M. tuberculosis*. Todavia, existe uma substancial diferença no nível de expressão destas proteínas. Enquanto MPB70 e MPB83 são produtos de secreção principais em *M. bovis*, MPT70 e MPT83 são produtos minoritários no crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis*.

O teste cutâneo com PPD é uma ferramenta para auxílio diagnóstico de *M. tuberculosis* amplamente usada em todo o mundo desde seu advento, ha quase um século. É, possivelmente, o ensaio diagnóstico mais antigo em uso na prática médica moderna apesar de suas limitações de especificidade e sensibilidade (RICHELDI, 2006). Especialmente útil para detecção de infecção latente, é ainda hoje, entre todos os outros meios diagnósticos para tuberculose, o ensaio mais realizado em países desenvolvidos, nos quais representa cerca de metade do mercado de testes diagnósticos para tuberculose (aproximadamente US\$ 339 milhões).

Em países em desenvolvimento, onde a maior parte dos exames (95%) é realizada para diagnóstico de infecção ativa e não para detecção de infecção latente, 8,6 milhões de testes PPD são realizados a cada ano, representando dispêndios de 13,8 milhões de dólares. Portanto, a demanda global de teste cutâneo com PPD supera a marca anual de 49 milhões de ensaios e US\$ 352 milhões de dólares gastos em reagente e mão de obra (TDR; FIND, 2006).

O presente trabalho teve sucesso em clonar, expressar e purificar sete proteínas de secreção em cultura de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP10, TB10.3, TB10.4, MPT70, MPT83 e MTSP11), candidatas para formulação de reagentes de auxílio diagnóstico de tuberculose por intradermoreação, alternativo ao PPD convencional. Todas as proteínas recombinantes avaliadas mostraram-se imunogenicamente ativas e foram reativas para produção de enduração em cobaios *C. porcellus* previamente sensibilizados com *M. tuberculosis*. Com exceção da proteína MPT70, especificamente quando inoculada na concentração de 0,0004 mg/mL, todas as proteínas recombinantes apresentaram resultados estatisticamente concordantes com o padrão PPD, nas diferentes concentrações avaliadas (0,0004, 0,004 e 0,04 mg/mL).

As proteínas recombinantes objeto deste trabalho são reconhecidas envolvidas no desencadeamento de resposta imunológica celular, pela capacidade

de estimularem linfócitos T em produzir IFN- γ . Duas destas (ESAT-6 e CFP-10), inclusive, têm sido empregadas em uma nova geração de testes rápidos para diagnóstico da tuberculose: o QuantiFERON-TB Gold, produzido por Cellestis (Carnegie, Austrália) e o T-SPOT.TB, fabricado por Oxford Immunotec (Abingdon, Reino Unido). O primeiro foi aprovado para uso diagnóstico nos Estados Unidos, em 2001; e o segundo, na Europa, em 2004. Ambos os métodos se baseiam na mensuração dos níveis de IFN- γ liberados por linfócitos T de memória antígeno-específicos quando novamente em contato com antígenos específicos de *M. tuberculosis*, no caso, proteínas ESAT-6 e CFP-10 obtidas por DNA recombinante (RICHELDI, 2006).

No entanto, o presente estudo parece ser pioneiro em pesquisar o comportamento das proteínas ESAT-6, CFP10, TB10.3, TB10.4, MPT70, MPT83 e MTSP11 em intradermoreação em cobaios e de relatar um potencial uso como substituto do PPD em testes tuberculínicos.

Ademais, quando testadas em conjunto, na forma de um coquetel, o presente trabalho demonstrou que, na concentração de 0,04 mg/mL, os resultados de intradermoreação foram expressivamente superiores aos obtidos pelo PPD padrão ($p=0,00386$).

Os resultados expostos neste estudo indicam que combinações de múltiplos antígenos produzem resultados melhores que os mesmos antígenos usados na sua composição testados isoladamente, mesmo em concentrações similares. Tais achados são corroborados por conclusões semelhantes, fundamentadas em coquetéis elaborados por composição antigênica distinta da aqui relatada (LYASHCHENKO et al., 1998; PAI; RILEY; COLFORD, 2004; AAGAARD et al., 2006).

Uma possível explicação para esta aparente vantagem de testes intradérmicos com combinações de múltiplos antígenos seja sua presumível melhor capacidade de recrutamento de linfócitos T antígeno-específicos ao sítio de injeção,

favorecendo a produção de reação cutânea de maior intensidade. Um único antígeno, embora potente, pode ser insuficiente para estimular um número adequado de células efectoras de reação de hipersensibilidade tardia para produção de uma resposta mensurável. Outra provável razão pode ser atribuída à necessidade de se utilizar múltiplos antígenos em conjunto para sobrepor problemas relacionados à restrição genética no reconhecimento antigênico, visto o fato deste ter elevada variabilidade interindividuos (SELVARAJ et al.; 2002).

Reagentes para intradermorreação constituídos por antígenos de secreção de *M. tuberculosis* purificados, obtidos por DNA recombinante, possuem diversas vantagens sobre o uso do PPD convencional. Primeiro, a utilização de antígenos recombinantes facilita o processo de produção, permitindo maior padronização de fabricação e maior controle de qualidade dos reagentes usados na sua elaboração.

A produção convencional do PPD consiste no crescimento de cepas de *M. tuberculosis* em meio de cultura LJ (40 dias), seguido de transferência para meio Middlebrook e cultivo adicional (10 dias). Posteriormente, é acrescentado meio líquido de Reid, seguido de novo cultivo por igual período. A seguir, a fase líquida é transferida para garrafas de Povitsky com o mesmo meio e incubadas a 37°C. Somente após novo crescimento, em prazo não inferior a 60 dias, as culturas são inativadas, resfriadas e filtradas. A manipulação, até esta etapa, exige condições de biossegurança em nível três, dada a patogenicidade do microrganismo. Uma vez inativado, o filtrado de cultura é ainda precipitado com sulfato de amônio saturado e ressuspensão em fenol, sendo, a seguir, concentrado e esterilizado por filtração tangencial (DALL'STELLA, 2003; DALL'STELLA et al., 2007).

Portanto, a fabricação tradicional de PPD, além de morosa, requer a manipulação de grande quantidade de massa bacteriana patogênica viável. Além disso, pelo fato de não possuir composição bioquímica definida, por ser uma preparação bruta constituída por mais de 200 proteínas e polissacarídeos diferentes, apresenta limitações de padronização de lotes de produção. Diferenças de

bioprocessos de fabricação e mesmo de linhagens bacterianas utilizadas na sua produção podem resultar em padrões distintos de reação. Tais restrições dificultam a comparação de resultados decorrentes do uso de tuberculinas de procedências diferentes.

Ademais, o processo de produção de antígenos recombinantes de *M. tuberculosis* tem claras vantagens de biossegurança sobre a produção convencional do PPD, pois restringe a manipulação direta do microrganismo, e ainda assim inativado, apenas na primeira etapa do processo, a extração do DNA micobacteriano. Uma vez padronizadas as condições de fabricação e obtidos os clones de destino, o processo de fabricação demanda tempo expressivamente inferior à produção do PPD convencional. O emprego de fermentadores industriais para cultivo de cepas de expressão permite facilidade para ampliação de escala de produção, de modo a ser viável o atendimento da demanda global por este método diagnóstico.

7 CONCLUSÕES

1. A metodologia empregada para caracterização molecular do elemento de inserção *IS6110* (mixed-linker PCR DNA fingerprinting) em isolados clínicos obtidos de pacientes com tuberculose atendidos no Estado do Paraná permitiu a diferenciação de 93,5% dos isolados testados e a conseqüente seleção de cepas para o processo de clonagem, demonstrando ser uma ferramenta de alto poder de discriminação para genotipagem molecular de *M. tuberculosis*.
2. O baixo número de formação em *cluster* (3,2%) para a seqüência *IS6110* apontado neste trabalho sugere um predomínio de desenvolvimento da doença por reativação de infecção latente em relação à transmissão exógena no Estado do Paraná.
3. Os processos utilizados para amplificação de genes, clonagem molecular, expressão e purificação de proteínas permitiram a obtenção de sete proteínas recombinantes (ESAT-6, CFP10, TB10.3, TB10.4, MTSP11, MPT70, MPT83) de *M. tuberculosis*. A plataforma de clonagem escolhida, sistema Gateway®, confirmou sua eficiência e praticidade ao eliminar diversas etapas de clonagem e sub-clonagem convencionais, com elevado índice de sucesso.
4. Foram detectados anticorpos em soro de coelhos hiperimunizados acima do controle positivo contra quatro (TB10.4, MTSP11, ESAT-6 e MPT70) das sete proteínas recombinantes testadas em ensaios ELISA. As proteínas MTSP11 e MPT70 foram as mais reativas e constituem-se em um possível parâmetro para estudos de diagnóstico sorológico de tuberculose.
5. Os testes biológicos de avaliação de resposta imune celular demonstraram que todas as sete proteínas recombinantes testadas

produziram reação positiva de endureção em teste intradérmico em cobaias *C. porcellus* previamente sensibilizados com *M. tuberculosis*.

6. Quando aplicadas em conjunto (coquetel múltiplo com as sete proteínas recombinantes), na concentração de 0,04 mg/mL, os resultados de intradermorreação em *C. porcellus* foram expressivamente superiores aos obtidos pelo PPD padrão, representando uma alternativa concreta e factível para produção de antígenos recombinantes de *M. tuberculosis* em substituição ao PPD convencional.
7. O presente trabalho atingiu, portanto, seu objetivo geral de produzir reagentes de potencial diagnóstico para tuberculose a partir de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*.

8 PERSPECTIVAS

A resposta imunológica celular de hipersensibilidade tardia aos produtos desenvolvidos neste trabalho foi avaliada em animais sensibilizados previamente com inóculos formados com cepas inativadas de *M. tuberculosis* H37Rv. A sensibilização dos animais, seguida de testes intradérmicos, reproduziu uma situação na qual foi possível a detecção de infecção prévia pela micobactéria em um organismo e a conseqüente resposta imunológica deste contra o antígeno protéico recombinante.

Ademais, a resposta sorológica foi verificada pela presença de anticorpos contra algumas das proteínas recombinantes produzidas neste trabalho em soros de coelhos imunizados com a micobactéria.

As perspectivas lançadas por esses resultados implicam na avaliação do potencial diagnóstico das proteínas recombinantes em organismos humanos, mediante ensaios, *in vitro*, de linfoproliferação, produção de linfocinas e detecção de anticorpos a partir de amostras obtidas de pacientes.

Dadas as possibilidades de maior especificidade no diagnóstico, por se tratarem de proteínas de secreção de *M. tuberculosis*, ausentes em micobactérias não patogênicas ou em *M. bovis* BCG, faz-se necessária a pesquisa clínica utilizando as proteínas recombinantes produto deste trabalho em grupos de estudos bem caracterizados compostos, dentre outras possibilidades, por (i) indivíduos saudáveis não reatores à tuberculina, (ii) indivíduos saudáveis, porém reatores à tuberculina, (iii) pacientes com baciloscopia e cultura positivas para tuberculose, (iv) pacientes com baciloscopia negativa e cultura positiva para tuberculose, (v) pacientes com baciloscopia e cultura negativas, porém exame radiológico sugestivo de tuberculose, (vi) pacientes imunocomprometidos e (vii) pacientes acometidos de outras doenças pulmonares.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V.; VALLECILLO, A.J.; GUTIERREZ-PABELLO, J.A.; SUAREZ-GÜEMES, F.; MCNAIR J.; CATALDI, A.; ESPITIA, C.; ANDERSEN, P.; POLLOCK, J.M. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44(12), p. 4326-4335, 2006.
- AIDA, Y.; PABST, M.J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **Journal of Immunological Methods**, v. 132, p. 191-195, 1990.
- ALLAND, D.; KALKUT, G.E.; MOSS, A.R.; MCADAM, R.A.; HAHN, J.A.; BOSWORTH, W.; DRUCKER, E.; BLOOM, B.R. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. **New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 1710-1716, 1994.
- ARANAZ, A.; LIEBANA, E.; GOMEZ-MAMPASO, E.; GALAN, J.C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLAZQUEZ, J.; BAQUERO, F.O.; MATEOS, A.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. *M. tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *M. tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1263-1273, 1999.
- BAPTISTA, I.M.F.D.; OELEMANN, M.C.; OPROMOLLA, D.V.A.; SUFFYS, P.N. Drug resistance and genotypes of strains of *M. tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1147-1152, 2002.
- BARIETY, M. Villemin and the inoculability of tuberculosis. **Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine Continues**, v. 149, n. 32, p. 761-767, 1965.
- BASSO, A.J. **Genotipagem, utilizando a seqüência de inserção IS6110, de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes portadores da infecção pelo HIV em Moçambique, África**. Campinas, 2006, 70 f. Dissertação (Mestre em Clínica Médica). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.
- BECHTEL, S.; ROSENFELDER, H.; DUDA, A.; SCHMIDT, C.P.; ERNST, U.; WELLENREUTHER, R.; MEHRLE, A.; SCHUSTER, C.; BAHR, A.; BLÖCKER, H.; HEUBNER, D.; HOERLEIN, A.; MICHEL, G.; WEDLER, H.; KÖHRER, K.; OTTENWÄLDER B.; POUSTKA, A.; WIEMANN, S.; SCHUPP, I. The full-ORF clone resource of the German cDNA Consortium. **BMC Genomics**, v. 31(8), p. 399, 2007.
- BEHR, M.A.; WILSON, M.A.; GILL, W.P.; SALAMON, H.; SCHOOLNIK, G.K.; RANE, S.; SMALL, P.M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. **Science**, v. 284, p. 1520-1523, 1999.
- BELLAMY R. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. **Thorax**, v. 53(7), p. 588-593.

BERGEY'S. **Manual of Systematic Bacteriology**. 9.ed. Baltimore, EUA: Willians & Wilkins, v. 2, p. 1436-1438, 1986.

BERNARD, P.; COUTURIER, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, p. 735-745, 1992.

BIFANI, P.J.; MATHEMA, B.; KUREPINA, N.E.; KREISWIRTH, B.N. Global dissemination of the *M. tuberculosis* W-Beijing family strains. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 45-52, 2002.

BOESEN H.; JENSEN B.N.; WILCKE T.; ANDERSEN, P. Human T-Cell responses to secreted antigen fraction of *M. tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 63(4), p. 1491-1497, 1995.

BOOM, W.H.; CANADAY, D.H.; FULTON, S.A.; GEHRING, A.J.; ROJAS, R.E.; TORRES, M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis**, v. 86, p. 98-106, 2003.

BORGDORFF, M.W.; NAGELKERKE, N.; VAN SOOLINGEN, D.; PEW H.; VAN EMBDEN, J.V.; VAN EMBDEN, J.D.A. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993–1995 using DNA fingerprinting. **American Journal of Epidemiology**, v. 147, p. 187-195, 1998.

BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, M.M.; DE GOES MADEIRA, S.; LIMA, C.; BOFFO, M.; MATTOS, I.; SILVA, P.E.A.; DELLAGOSTIN, O.A. Molecular characterization of *M. tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 1338-1344, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico para o Controle da Tuberculose.**, n. 148, 6ª ed, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tuberculose Todas as Formas - Distribuição de casos novos e óbitos, Brasil, 1980 – 2005.** Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tuberculose_serie_2006> Acesso em 01 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. **Relatório da Situação: Paraná**, 3ª ed, 2007.

BRENNAN, P. **WHO Tuberculosis Diagnostic Workshop. World Health Organization Global Tuberculosis Programme.** Tests for infeccion (prevalence surveys) and current technology as applied to low income countries. Cleveland, EUA, 1997. p.8-9.

BURGER, M; RASKIN, S.; BROCKELT, S.R.; AMTHOR, B.; GEISS, H.K.; HAAS, W.H. Fingerprinting of *M. tuberculosis* complex culture isolates collected in Brazil and spotted onto filter paper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36(2), p. 573-576, 1998.

CAFRUNE, P.I.; RILEY, L.W.; POSSUELO, L.G.; VALIM, A.R.; BORGES, M.; RIBEIRO, M.O.; ROSSETTI, M.L.; ZAHA, A. Recent transmission of tuberculosis involving retired patients. **Journal of Infection**, v. 53, p. 370-376, 2006.

CALUSNI, A.L.; ROSCANI, G.N.; VILLARES, M.C.; SOINI, H.; GRAVISS, E.A.; RAMOS, M.D.E. IS6110 restriction fragment length polymorphism of *M. tuberculosis* isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Campinas, Brazil: evidence of intercontinental distribution of strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 655-658, 2003.

CANETTI, G.; RIST, N.; GROSSET, J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. **Revue de Tuberculose et de Pneumologie**, v. 27, p. 217, 1963.

CAVE, M.D.; EISENACH K.D.; MCDERMOTT P.F.; BATES J.H.; CRAWFORD J.T. IS6110: conservation of sequence in the *M. tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprint. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, p. 73-80, 1991.

CHAN, E. D., REVES, R.; BELISLE, J.T.; BRENNAN, P.J.; HAHN, W.E. Diagnosis of tuberculosis by a visually detectable immunoassay for lipoarabinomannan. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 1713–1719, 2000.

CHAUHAN, A.; CHAUHAN, D.S.; PARASHAR, D.; GUPTA, P.; SHARMA, V.D.; SACHAN, A.S.; GUPTA, R.; AGARAWAL, B.M.; KATOCH, V.M. DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* isolates from Agra region by IS6110 probe. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 22, p. 238-240, 2004.

CHUNG, K.T.; BIGGERS, C.J. Albert Léon Charles Calmette (1893-1933) and the antituberculous BCG vaccination. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 44, p. 379-389, 2001.

COLE, S.T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Deciphering the biology of *M. tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

CONSENSO BRASILEIRO DE TUBERCULOSE, 2. Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Ribeirão Preto, v. 30(1), jun., 2004. 86 p. Suplemento.

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R; CATALDI, A; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, MI; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *M. tuberculosis* complex: *M. pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1305-1314, 2003.

DABROWSKI, S.; BRILLOWSKA, A.; KUR, J. 1999. Use of the green fluorescent protein variant (YFP) to monitor MetArg human proinsulin production in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 16, p. 315-323, 1999.

DALL'STELLA, R. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de tuberculina com cepas brasileiras de *M. tuberculosis* para diagnóstico da tuberculose em humanos.** Curitiba, 2003, 133 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

DALL'STELLA, R.; KRIEGER, M.A.; BURGER, M.; AGOTTANI, .B.; CHAHAD-EHLERS, S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Development of bioprocess for the production of purified protein derivative with Brazilian strains of *M. tuberculosis* for diagnosis use. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 278-287, 2007.

DANIEL, T.M.; DEBANNE, S.M. Enzyme-linked immunosorbent assay using *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis. **Chest**, v. 88(3), p. 388–392, 1985.

DAVIES, G.R.; PILLAY, M.; STURM, A.W.; WILKINSON, D. Emergence of multidrug-resistant tuberculosis in a community-based directly observed treatment programme in rural South Africa. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 3, p. 799-804, 1999.

DAVIS, G.D.; ELISEE, C.; NEWHAM, D.M.; HARRISON, R.G. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65(4), p. 382-388, 1999.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, v. 26, p. 379-393, 1945.

DRICOT, A.; RUAL, J.F.; LAMESCH, P.; BERTIN, N.; DUPUY, D.; HAO, T.; LAMBERT, C.; HALLEZ, R.; DELROISSE, J.M.; VANDENHAUTE, J.; LOPEZ-GOÑI, I.; MORIYON, I.; GARCIA-LOBO, J.M.; SANGARI, F.J.; MACMILLAN, A.P.; CUTLER, S.J.; WHATMORE, A.M.; BOZAK, S.; SEQUERRA, R.; DOUCETTE-STAMM, L.; VIDAL, M.; HILL, D.E.; LETESSON, J.J.; DE BOLLE, X. Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. **Genome Research**, v. 14(10B), p. 2201-2206, 2004.

FANDINHO, F.C.O.; KRITSKI, A.L.; HOFER, C.; CONDE, J.R.H.; FERREIRA, R.M.C.; SAAD, M.H.F.; SILVA, M.G.; RILEY, L.W.; FONSECA, L.S. RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 271-275, 2000.

FANG, Z.; MORRISON, N.; WATT, B.; DOING, C.; FORBES, K.J. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *M. tuberculosis* strain. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2102-2109, 1998.

FINE, P.E.M. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, p. S353-S359, 1989.

FINKBEINER, W.E. "Respiratory pathology. General Features of Respiratory Pathology". In: MURRA, Y.J.F.; NADEL, J.A. **Respiratory Medicine**, 2ª ed., WB. Saunders company, 1994. p. 441-468.

FLEISCHMANN, R. D., D. ALLAND, J. A. EISEN, L. CARPENTER, O. WHITE, J. PETERSON, R. DEBOY, R. DODSON, M. GWINN, D. HAFT, E. HICKEY, J. F. KOLONAY, W. C. NELSON, L. A. UMayAM, M. ERMOLAEVA, S. L. SALZBERG, A. DELCHER, T. UTTERBACK, J. WEIDMAN, H. KHOURI, J. GILL, A. MIKULA, W. BISHAI, W. R. JACOBS, JR., J. C. VENTER, AND C. M. FRASER. Whole-genome comparison of *M. tuberculosis* clinical and laboratory strains. **Journal of Bacteriology**. v. 184, p. 5479-5490, 2002.

FLYNN, J.L.; CHAN, J. What's good for the host is good for the bug. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 98-102, 2005.

GARAY, S.M. Pulmonary tuberculosis. In: ROM, W.N.; GARAY, S. **Tuberculosis**. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 345-394.

GARCIA-GARCIA M.; PALACIOS-MARTINEZ M.; PONCE-DE-LEO, N.A.; JIMENEZ-CORONA, M.E.; JIMENEZ-CORONA, A.; BALANDRANO-CAMPOS, S.; OLIVERA-DIAZ, H.; VALDESPINO-GOMEZ, J.L.; SMALL PM. The role of core groups in transmitting *M. tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, p. 12-17, 2000.

GASCOYNE-BINZI, D.M.; BARLOW, R.E.L.; FROTHINGHAM, R.; ROBINSON, G; COLLYNS, T.A.; GELLETLIE, R.; HAWKEY, P.M. Rapid identification of laboratory contamination with *M. tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 69-74, 2001.

GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K.E.; FRANKEN, K.L.M.C.; SUBRANTO, Y.W.; WIELES, B.; AREND, S.M.; SAMPAIO, E.P.; BOER, T.D.; FABER, W.R.; NAAFS, B.; OTTENHOFF, T.H.M. Identification and Characterization of the ESAT-6 homologue of *M. leprae* and T-cell cross-reactivity with *M. tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 70(5), p. 2544-2548, 2002.

GOESSENS, W.H.F.; DE MAN, P.; KOELEMAN, J.G.M.; LUIJENDIJK, A.; TE WITT, R.; ENDTZ, H.P.; VAN BELKUM, A. Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET Assays for Detection of *M. tuberculosis* in Respiratory Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 2563-2566, 2005.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Doenças Pulmonares. In:_____. **Tratado de Medicina Interna**, 22^a ed., 2005.

GUINN, K.M.; HICKEY, M.J.; MATHUR, S.K.; ZAKEL, K.L.; GROTZKE, J.E.; LEWINSOHN, D.M.; SMITH, S.; SHERMAN, D.R. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/ CFP-10 and for virulence of *M. tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 359-370, 2004.

GUTIERREZ, M.C.; VINCENT, V.; AUBERT, D.; BIZET, J.; GAILLOT, O.; LEBRUN, L.; LE PENDEVEN, C.; LE PENNEC, M.P.; MATHIEU, D.; OFFREDO, C.; PANGON, B.; PIERRE-AUDIGIER, C. Molecular fingerprinting of *M. tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. **Journal of Clinical Microbiology**, 1998; v. 36, p. 486-492, 1998.

HAAS, W. H.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L.; CRAWFORD, J. T. Mixed-Linker polymerase chain reaction: a new method for a rapid fingerprinting of isolates of *M. tuberculosis* **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31(5), p. 1293-1298, 1993.

HAAS, D.W.; DÊS PREZ, R.M. *M. tuberculosis* In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN O.R.G.S. **Principles and practice of infectious disease**. 4^a ed. Nova York: Churchill Livingstone, 1995. p. 2213-2243.

HARTLEY, J. L., TEMPLE, G. F., AND BRASCH, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. **Genome Research**, v. 10, p. 1788-1795, 2000.

HESS, J.; KAUFMANN, S.H.E. Development of novel tuberculosis vaccine. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences** v. 2, p. 953-958, 1999.

HEWINSON, R.G.; MICHELL, S.L.; RUSSELL, W.P.; MCADAM, R.A.; JACOBS, W.R.Jr. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *M. tuberculosis* with homology to MPT70. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 43, p. 490-499, 1996.

HUEBNER, R.E.; SCHEIN, M.F.; BASS, J.B.Jr. The tuberculin skin test. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 968-975, 1993.

INVITROGEN. **Gateway® Technology. A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems**. ed E. USA:Invitrogen, 2003.

JANKNECHT, R.; DE MARTYNOFF, G.; LOU, J.; HIPSKIND, R.A.; NORDHEIM, A.; STUNNENBERG, H.G. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 8972-8976, 1991.

KAMBASHI, B.; MBULO, G.; MCNERNEY, R.; TEMBWE, R.; KAMBASHI, A.; TIHON, V.; GODFREY-FAUSSETT, P. Utility of nucleic acid amplification techniques for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in sub-Saharan Africa. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 5(4), p. 364-369, 2001.

KATO, I.; KURIYAMA, I.; ASANO, N.; IKEDA, K.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Inhibitory effect of dipeptide alcohol derivatives containing mercapto group on eukaryotic DNA polymerase alpha. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 16(4), p. 653-659, 2005.

KATOMAEDA, M.; Small P.M. User's guide to tuberculosis resources on the Internet. **Journal of Clinical Investigation**, v. 10, p. 533-537, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J. W. C. **Diagnóstico microbiológico, texto e atlas colorido**. 5.ed. São Paulo: Medsi, 2001. p. 903-963.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; de SOUZA, G.R.M. **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria**. São Paulo: Atheneu, 2000.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W.H.; HERMANS, P.W.M.; MARTIN, C. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *M. tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2607-2618, 1999.

LADEL, C.H.; SZALAY, G.; RIEDEL, D.; KAUFMANN, S.H. Interleukin-12 secretion by *M. tuberculosis*-infected macrophagos. **Infection and Immunity**, v. 65(5), p. 1936-1938, 1997.

LALVANI, A.; BROOKES, R.; WILKINSON, R.J.; MALIN, A.S.; PATHAN, A.A.; ANDERSEN, P.; DOCKRELL, H.; PASVOL, G.; HILL, A.V. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *M. tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95(1), p. 270-275, 1998.

LAMBREGTS-VAN WEEZENBEEK C.S.; SEBEK, M.M.; VAN GERVEN, P.J.; DE VRIES, G.; VERVER, S.; KALISVAART, N.A. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprinting surveillance in the Netherlands: 6 years experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12(3), p. 463-470, 2003.

LANDY, A. Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 913-949, 1989.

LIGHTBODY KL, RENSHAW PS, COLLINS ML, WRIGHT RL, HUNT DM, GORDON SV, HEWINSON RG, BUXTON RS, WILLIAMSON RA, CARR MD. Characterisation of complex formation between members of the *M. tuberculosis* complex CFP-10/ESAT-6 protein family: towards an understanding of the rules governing complex formation and thereby functional flexibility. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, p. 255-262, 2004.

LILLEBAEK, T.; ANDERSEN, A.B.; BAUER, J.; DIRKSEN, A.; GLISMANN, S.; HAAS P.; KOK-JENSEN, A. Risk of *M. tuberculosis* transmission in a low-incidence country due to immigration from high-incidence areas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 855-61, 2001.

LIM, J.H.; KIM, H.J.; LEE, K.S.; JO, E.K.; SONG, C.H.; JUNG, S.B.; KIM, S.Y.; LEE, J.S.; PAIK, T.H.; PARK, J.K. Identification of the new T-cell-stimulating antigens from *M. tuberculosis* culture filtrate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232(1), p. 51-59, 2004.

LINDWALL, G.; CHAU, M.; GARDNER, S.R.; KOHLSTAEDT, L.A. A sparse matrix approach to the solubilization of overexpressed proteins. **Protein Engineering**, v. 13(1), p. 67-71, 2000.

LIPSKY, BA; GATES, J; TENOVER, FC; PLORDE, JJ. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 6(2), p. 214-222, 1984.

LIU, S.; TOBIAS, R.; MCCLURE, S.; STYBA, G.; SHI, Q.; JACKOWSKI, G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. **Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 455-463, 1997.

LYASHCHENKO, K.; MANCA, C.; COLANGELI, R.; HEIJBEL, A.; WILLIAMS, A.; GENNARO, M.L. Use of *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Antigen Cocktails for a Skin Test Specific for Tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 66(8), p. 3606-3610, 1998.

LYASHCHENKO, K.P.; WIKER, H.G.; HARBOE, M.; MCNAIR, J.; KOMISSARENKO, S.V.; POLLOCK, J.M. 2001. Novel monoclonal antibodies against major antigens of *Mycobacterium bovis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 53: p. 498-502, 2001.

MARIANI, F.; PICCOLELLA, E.; COLIZZI, V.; RAPPUOLI, R.; GROSS, R. Characterization of an IS-like element from *M. tuberculosis*. **Journal of General Microbiology**, v. 35, p. 273-277, 1997.

MARKS, G.L. Genetics of Tuberculosis. In: BASS, J.B. **Tuberculosis. The Medical clinics of North America**. v. 77; p. 1219-1233, 1993.

MAZUREK, G.H.; CAVE, M.D.; EISENACH, K.D.; WALLACE R.J.; BATES, J.H.; CRAWFORD, J.T. Chromosomal DNA fingerprinting patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29(9), p. 2030-2033, 1991.

McGUINNESS, G.; RUBINOWITZ, A.N. Imaging of thoracic tuberculosis infections. In: ROM, W.N.; GARAY, S.M. **Tuberculosis**. USA Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 395-425.

METCHOCK, B.G.; NOLTE, F.S.; WALLACE, R.J. M. In: MURRAY, P.K. et al. **Manual of clinical microbiology**. 7.ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1999. p. 399-439.

MILTGEN, J.; MORILLON, M.; KOECK, J.L.; VARNEROT, A.; BRIANT, J.F.; NGUYEN, G.; VERRON, D.; BONNET, D.; VINCENT, V. Two Cases of Pulmonary Tuberculosis Caused by *M. tuberculosis* subsp. *canetti*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8(11), p. 1350-1352, 2002.

MONTESSORI, V. Species distribution in human immuno deficiency virus – related mycobacterial infections: implications for selections of initial treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 989-992, 1996.

MORGAN MA, HORSTMEIER CD, DEYOUNG DR, ROBERTS GD. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, 1983 v. 8(2), p. 384–388, 1983.

MOSTROM, P.; GORDON, M.; RIDELL, M.; RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 694-704, 2002.

MURBY, M.; UHLEN, M.; STAHL, S. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 7(2), p. 129-136, 1996.

MURTHY, M.K.; PARASA, R.R.V.; DEENADAYALAN, A.; SHARMA, P.; RAJA, A. Evaluation of the diagnostic potential of region of deletion-1–encoded antigen culture filtrate protein-10 in pulmonary tuberculosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 295–302, 2007.

ORGANIZACIÓN PAN-AMERICANA DE LA SALUD. Tuberculosis: hoja informativa 2004, Américas. Ginebra; 2004. Disponível em <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-fact/sheet-2004.html>; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005.

ORME, I.M.T Cell response to *M. tuberculosis*. **Journal of Infectious Diseases**, v.167, p. 1481-1497, 1993.

PAI, M.; RILEY, L.W.; COLFORD, J.M. Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4(12), p. 761-776, 2004.

PALOMINO, J.C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **European Respiratory Journal**, v. 26, p. 339-350, 2005.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Número De Casos Novos De Tuberculose Pulmonar Bacilífero, Todas As Formas e Coeficiente de Incidência por 100.000 Habitantes**. Disponível em <<http://www.saude.pr.gov.br/>> Acesso em 01 dez. 2007.

PETERSON, E.M.; NAKASONE, A.; PLATON-DELEON, J.M.; JANG, Y.; DE LA MAZA, L.M.; DESMOND, E. Comparison of Direct and Concentrated Acid-Fast Smears To Identify Specimens Culture Positive for *Mycobacterium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 3564-3568, 1999.

PTASHNE, M. **A Genetic Switch: Phage and Higher Organisms**. Cambridge, MA: Cell Press. 1992.

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p. 598–599, 1975.

PROLLA, J.C.; PORTO, N.S.; ULBRICH-KULCZYNSKI, J.M.; BOGLIOLO, L. Pulmões. Pleura. Mediastino. In: BRASILEIRO FILHO, G.; PITELLA, J.E.H.; PEREIRA, F.E.L.; BAMBIRRA, E.A.; BARBOSA, A.J.A. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

PYM, A.S.; BRODIN, P.; BROSCHE, R.; HUERRE, M; COLE, S.T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *M. bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 709–717, 2002.

QIAGEN. **The QIAexpressionist™. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins**. 5ª ed. USA: Qiagen, 2003.

RADHAKRISHNAN, I, K.M.Y.; KUMAR, R.A.; MUNDAYOOR, S. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *M. tuberculosis* from Kerala, India. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1683, 2001.

RAMOS, M.D.; SOINI, H.; ROSCANNI, G.C.; JAQUES, M.; VILLARES, M.C.; MUSSER, J.M. Extensive gross-contamination of specimens with *M. tuberculosis* in a reference laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 916-919, 1999.

RENSHAW, P.S.; PANAGIOTIDOU, P.; WHELAN, A.; GORDON, S.V.; HEWINSON, R.G.; WILLIAMSON, R.A.; CARR, M.D. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *M. tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterisation of the structural properties of ESAT-6, CFP-10 and the ESAT-6/CFP-10 complex: Implications for pathogenesis and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 21598–21603, 2002.

RIBEIRO, S.N.; GERHARDT FILHO, G.; LAPA e Silva, J.R.; SOUZA, G.R. Tuberculose. In: Bethlem, N. **Pneumologia**. São Paulo: Atheneu, 4^a ed., 1995. p. 379-448.

RICHELDI, L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v 174, p. 736–742, 2006.

RINAS, U.; BAYNES, J.E. Overexpression of bacterial hemoglobin causes incorporation of pre- β -lactamase into cytoplasmic inclusion bodies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 561-566, 1993.

ROACH, D.R.; BEAN, A.G.D.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M.P.; BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 4620-4627, 2002.

ROBERTS, G.D.; GOODMAN, N.L.; HEIFETS, L.; LARSH, H.W.; LINDNER, T.H.; MCCLATCHY, J.K.; MCGINNIS, M.R.; SIDDIQI, S.H.; WRIGHT, P. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 18(3), p. 689–696, 1983.

ROBERTS, A.D.; SONNENBERG, M.G.; ORDWAY, D.J.; FURNEY, S.K.; BRENNAN, P.J.; BELISLE, J.T.; ORME, I.M. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *M. tuberculosis*. **Immunology**, v. 85, p. 502-8, 1995.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculosis: the neglected calamity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35(1), p. 51-58, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^a Ed. Cold Spring Harbor Press, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SCHIRM, J.; OOSTENDORP, L.A.; MULDER, J.G. Comparison of Amplicor, in-house PCR, and conventional culture for detection of *M. tuberculosis* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33(12), p. 3221-3224, 1995.

SELVARAJ, R.; GOPALW, G.; RAJA, A.; KUMARASWAMI, V. Pattern recognition technique in immunological antigenic tests to identify *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tuberculosis**, v. 82(6), p. 261-266, 2002.

SKJØT, R.L.V.; BROCK, I.; AREND, S.M.; MUNK, M.E.; THEISEN, M.; OTTENHOFF, T.H.M.; ANDERSEN, P. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and Tb12.9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family. **Infection Immunology**, v. 70, p. 5446–5453, 2002.

SOINI, H.; MUSSER, J.M. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clinical Chemistry**, Washington, DC., v. 47, p. 809-814, 2001.

SOUZA, WV; ALBUQUERQUE, MFM; BARCELLOS, CC; XIMENES, RAA; CARVALHO, MS. Tuberculosis in Brazil: construction of a territorially based surveillance system. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 1, 2005.

STAGER, C.E.; LIBONATI, J.P.; SIDDIQI, S.H.; DAVIS, J.R.; HOOPER, N.M.; BAKER, J.F.; CARTER, M.E.. Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29(1), p. 154–157, 1991.

STANLEY, S.A.; RAGHAVEN, S.; HWANG, W.H.; COX, J.S. Acute infection and macrophage subversion by *M. tuberculosis* require a specialised secretion system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 13001–13006, 2003.

STEWART, G.R.; ROBERTSON, B.D.; YOUNG, D.B. Tuberculosis: a problem with persistence. **Nature**, v. 1, p. 97-105, 2003.

STRASSLE, A.; PUTNIK, J.; WEBER, R.; FEHR-MERHOF, A.; WUST, J.; PFYFFER, G.E. Molecular epidemiology of *M. tuberculosis* strains isolated from patients in a human immunodeficiency virus cohort in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 374-378, 1997.

SUFFYS, P.N.; ARAÚJO, M.E.I.; ROSSETTI, M.L.; ZAHA, A.; BARROSO, E.W.; BARRETO, A.M.W.; CAMPOS, E.; VAN SOOLINGEN, D.; KREMER, K.; HEERSMA, H.; DEGRAVE, W.M. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *M. tuberculosis* and comparison with an international fingerprinting database. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 343-351, 2000.

TDR; FIND. **Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential**. Geneva: WHO Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2006.

THIERRY, D.; BRISSON-NOEL, A.; VICENT-LÉVY FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J.L.; GICQUEL, B. Characterization of a *M. tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 2668-2673, 1990.

TORREA, G.; OFFREDO, C.; SIMONET, M.; GICQUEL, B.; BERCHE, P.; PIERRE-AUDIGIER, C. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *M. tuberculosis* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1043-1049, 1996.

VAN EMBDEN, J.; VAN SOOLINGEN, D.; SMALL, P.M.; HERMANS, P.W. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. **Research in Microbiology**, v. 143, p. 385-391, 1992.

VAN EMBDEN, J. Strain identification of *M. tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized Strain identification of *M. tuberculosis* methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 406-409, 1993.

VAN SOOLINGEN, D. et al. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31(8), p. 1987-1995, 1993.

VAN SOOLINGEN, D.; VAN DER ZANDEN, A.G.M.; HAAS, P.E.W.; NOORDHOEK, G.T.; KIERS, A.; FOUORAINE, N.A.; PORTAELS, F.; KOLK, A.H.J.; KREMER, K.; VAN EMBDEN, J.D.A. Diagnosis of *M. microti* infections among humans by using novel genetic markers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1840-1845, 1998.

WALL, J.G.; PLÜCKTHUN, A. Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6(5), p. 507-516, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control. Country profile-Brazil**. Geneva: Switzerland; 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report 2006: Global Tuberculosis Control: surveillance, planning financing**. World Health Organization. Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing**. Geneva: WHO Report, 2007.

XUE, T; STAVROPOULOS, E.; YANG, M.; RAGNO, S.; VORDERMEIER, M.; CHAMBERS, M.; HEWINSON, G.; LOWRIE, D.B.; COLSTON, M.J.; TASCAN, R.E.. RNA encoding the MPT83 antigen induces protective immune responses against *M. tuberculosis* infection. **Infection Immunology**. v. 72(11), p. 6324-6329, 2004.

YASUKAWA, T.; KANEI-ISHII, C.; MAEKAWA, T.; FUJIMOTO, J.; YAMAMOTO, T.; ISHII, S. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270(43), p. 25328-35331, 1995.

YOUNG, D. B. M. protein antigens: a compilation. **Molecular Microbiology**, v. 6(2), p. 133-45, 1992.

YOUNG, D.B. Ten years of research progress and wath's to come. **Tuberculosis**. v. 83, p. 77-81, 2003.

YUA, D.; LIA, M.; HUB, X.; CAI, H. A combined DNA vaccine enhances protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Brucella abortus* in the presence of an IL-12 expression vector. **Vaccine**, v. 25(37-38), p. 6744-6754, 2007.

ANEXO 1
RELAÇÃO DOS GENES SUBMETIDOS À AMPLIFICAÇÃO POR PCR E DAS
RESPECTIVAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

Relação dos genes amplificados e das respectivas seqüências nucleotídicas codificantes de proteínas, indicando em negrito as regiões de complementaridade dos iniciadores de reação

1. Rv0061

ATGTGCGCCGACGCCAGCCGTCAGGGAGCGTTGGGCTGCTCGGACGGAAT
 TGCCCCACCGCAACCACCCGGTGGCGGCGGGCCGGGGAGGGGCTCACCGC
 CGCTGACACAATCGAAGTAAACTGTGGGCCGGTAAACCACGTTTGCATCCAC
 TGGTGCCAAAACGAGCCGTCGGGGTACTTCTCGCCGTCGCACACGGCCAAGT
 CGCCAAAACCCCATCGGCCACCCGGGCAATAGCCTTTCGTCATGTCCGGCTG
 ATGCGGGTCAGGTGGATCTGCGCTGGCAACCGAGGCAGGAAACACAAGCGC
 CGCTGCACAACCCAGTATCGCAGTACTCAGGCGAGCAAACCTTCAACTTCATT
 CAAACTCCGTCAAACGTTGAATCGACTCGGCGGACTCCAAGCGAT**GGTCA**
GCTTGCGGATGA

2. Rv3879c

ATGAGTATTACAGGCCGACGGGCAGCTATGCCAGACAGATGCTGGATCCGG
 GCGGCTGGGTGGAAGCCGATGAAGACACTTTCTATGACCGGGCCAGGAATA
 TAGCCAGGTTTTGCAAAGGGTCACCGATGTATTGGACACCTGCCGCCAGCAG
 AAAGGCCACGTCTTCGAAGGCGGCCTATGGTCCGGCGGCGCCGCCAATGCT
 GCCAACGGCGCCCTGGGTGCAAACATCAATCAATTGATGACGCTGCAGGATTA
 TCTCGCCACGGTGATTACCTGGCACAGGCATATTGCCGGGTTGATTGAGCAAG
 CTAATCCGATATCGGCAATAATGTGGATGGCGCTCAACGGGAGATCGATATC
 CTGGAGAATGACCCTAGCCTGGATGCTGATGAGCGCCATACCGCCATCAATTC
 ATTGGTCACGGCGACGCATGGGGCCAATGTCACTCTGGTCGCCGAGACCGCT
 GAGCGGGTGCTGGAATCCAAGAATTGGAAACCTCCGAAGAACGCACTCGAGG
 ATTTGCTTCAGCAGAAGTCGCCGCCACCCCCAGACGTGCCTACCCTGGTCGT
 GCCATCCCCGGGCACACCGGGCACACCGGGAAACCCCGATCACCCCGGGAAC
 CCGATCACACCAACGCCCGGCACTCCCGTCACGCCGGTGACCCCGGGCAAG
 CCGGTCACCCCGGTGACCCCGGTCAAACCGGGCACACCAGGCGAGCCAACC
 CCGATCACGCCGGTCACCCCGGTGCGCCCGGCCACACCGGCAACCCCG
 GCCACGCCCGTTACCCAGCTCCCGCTCCACACCCGCAGCCGGCTCCGGCA
 CCGGCGCCATCGCCTGGGCCCCAGCCGTTACACCGGCCACTCCCGGTCCG
 TCTGGTCCAGCAACACCGGGCACCCAGGGGGCGAGCCGGCGCCGCACGTC
 AAACCCGCGGCGTTGGCGGAGCAACCTGGTGTGCCGGGCCAGCATGCGGGC
 GGGGGGACGCAGTCGGGGCCTGCCATGCGGACGAATCCGCCGCGTCCGGT
 ACGCCGGCTGCGGCGTCCGGTGTCCCGGGCGCACGGGCGGCGGCGCCGCG
 GCCGAGCGGTACCGCCGTGGGAGCGGGCGCGGTTTCGAGCGTGGGTACGG
 CCGCGGCTCGGGCGCGGGGTGCGATGCTGCCACTGGGCGGGCGCCGGTG
 GCTACCTCGGACAAGGCGGCGGCACCCGAGCACGCGGGCGGCCTCGGCGCG
 GACGGCACCTCCTGCCCGCCCGGTGCGACCGATCACATCGACAAACCCGAT
 CGCAGCGAGTCTGCAGATGACGGTACGCCGGTGTGATGATCCCGGTGTCGG
 CGGCTCGGGCGGCACGCGACGCCGCCACTGCAGCTGCCAGCGCCCGCCAG
 CGTGGCCGCGGTGATGCGCTGCGGTTGGCGCGACGCATCGCGGCGGCGCTC
 AACGCGTCCGACAACAACGCGGGCGACTACGGGTTCTTCTGGATCACCGCGG
 TGACCACCGACGGTTCATCGTGTGGCCAACAGCTATGGGCTGGCCTACAT
 ACCCGACGGGATGGAATTGCCGAATAAGGTGTAATTGGCCAGCGCGGATCAC
 GCAATCCCGGTTGACGAAATTGCACGCTGTGCCACCTACCCGGTTTTGGCCGT
 GCAAGCCTGGGCGGCTTTCCACGACATGACGCTGCGGGCGGTGATCGGTAC

CGCGGAGCAGTTGGCCAGTTCGGATCCCGGTGTGGCCAAGATTGTGCTGGAG
 CCAGATGACATTCCGGAGAGCGGCAAATGACGGGCCGGTCGCGGCTGGAG
 GTCGTGACCCCTCGGCGGCGGCTCAGCTGGCCGACACTACCGATCAGCGTT
 TGCTCGACTTGTGCGCCGGCGCCGGTGGATGTCAATCCACCGGGCGATGA
 GCGGCACATGCTGTGGTTCGAGCTGATGAAGCCCATGACCAGCACCGCTACC
 GGCCGCGAGGCCGCTCATCTGCGGGCGTTCCGGGCCTACGCTGCCCACTCA
 CAGGAGATTGCCCTGCACCAAGCGCACACTGCGACTGACGCGGCCGTCCAGC
 GTGTGGCCGTGCGCGGACTGGCTGTACTGGCAATACGTACACCGGGTTGCTCGA
CGGGCCCTGGCCGCGCATGCTGA

3. Rv0203

ATGAAGACAGGCACCGCGACGACGCGGGCGCAGGCTGTTGGCAGTACTGATC
 GCCCTCGCGTTGCCGGGGGCCGCCGTTGCGCTGCTGGCCGAACCATCAGCG
 ACCGGCGCGTCGGACCCGTGCGCGGCCAGCGAAGTGGCGAGGACGGTCCG
 TTCGGTCCCAAGTCGATGGGCGACTACCTGGATTACACCCAGAGACCAAC
 CAGGTGATGACCGCGGTCTTGCAGCAGCAGGTAGGGCCGGGGTTCGGTCCGA
 TCGCTGAAGGCCCATTTTCGAGGCGAATCCCAAGGTGCGATCGGATCTGCAG
 CGCTTTCGCAACCGCTGACCGATCTTTCGACTCGGTGCTCGCTGCCGATCAG
 CGGCCTGCAGGCGATCGGTTTGATGCAGGCGGTGC**AGGGCGCCCGCCGGTA**
G

4. Rv1271c

ATGTTATCGCCGTTATCGCCTCGCATTATCGCAGCGTTCACCACTGCAGTCGG
 CGCCGCCGCCATCGGACTTGCCGTCGCCACCGCCGGCACCGCCGGCGCCAA
 CACCAAAGACGAAGCCTTCATTGCTCAGATGGAGTCCATTGGCGTCACCTTCT
 CCTCACCGCAGGTGGCCACCCAGCAAGCCCAGCTGGTCTGCAAGAAGCTGGC
 CAGCGGCCGAAACCGGCACCGAGATCGCCGAGGAGGTCTCAGCCAAACCAA
 CCTGACCACTAAGCAGGCAGCCTACTTCGTGTCGACGCAACCAAGGCCTAC
 TGCCCGCAATAC**CGCCAGCCAGCTCACCTAG**

5. Rv3874

ATGGCAGAGATGAAGACCGATGCCGCTACCCTCGCGCAGGAGGCAGGTAAT
 TTCGAGCGGATCTCCGGCGACCTGAAAACCCAGATCGACCAGGTGGAGTCGA
 CGGCAGGTTTCGTTGCAGGGCCAGTGGCGCGGCGCGGGGACGGCCGCC
 CAGGCCGCGGTGGTGCCTTCCAAGAAGCAGCCAATAAGCAGAAGCAGGAAC
 TCGACGAGATCTCGACGAATATTCGTGAGGCCGGCGTCCAATACTCGAGGGC
 CGACGAGGAGCAGCAGCAGGCGCTGTCCT**CGCAAATGGGCTTCTGA**

6. Rv0288

ATGTGCGCAAATCATGTACAACTACCCCGCGATGTTGGGTACGCCGGGGATA
 TGGCCGGATATGCCGGCACGCTGCAGAGCTTGGGTGCCGAGATCGCCGTGG
 AGCAGGCCGCGTTGCAGAGTGCCTGGCAGGGCGATACCGGGATCACGTATC
 AGGCGTGGCAGGCACAGTGAACAGGCCATGGAAGATTTGGTGCGGGCCT
 ATCATGCGATGTCCAGCACCCATGAAGCCAACCCATGGCGATGATGGCCG
 CGACACGGCCGAAGCC**CGCCAAATGGGGCGGCTAG**

7. Rv3019c

ATGTGCGCAGATTATGTACAACTATCCGGCGATGATGGCTCATGCCGGGGACA
 TGGCCGTTATGCGGGCACGCTGCAGAGCTTGGGGGCCGATATCGCCAGTG
 AGCAGGCCGTGCTGTCCAGTGCTTGGCAGGGTGATACCGGGATCACGTATCA
 GGGCTGGCAGACCCAGTGAACAGGCCCTAGAGGATCTGGTGCGGGCCTA
 TCAGTCGATGTCTGGCACCCATGAGTCCAACCCATGGCGATGTTGGCTCGA
 GATGGGGCCGAAGCC**CGCCAAGTGGGGCGGCTAG**

8. Rv3004

ATGGCGCACTTCGCCGTGGGATTCTGACCCTGGGTCTGCTGGTGCCGGTAC
 TGACCTGGCCGGTGAGCGCCCCGCTGTTAGTCATTCCGGTGGCGTTGTCCGGC
 ATCGATCATTCCGGCTCCGCACGCTCGCCGACGAGCGGGGCGTGACCGTGCG
 GACGCTGGTCGGCAGCCGCGCGGTGCGCTGGGACGACATCGACGGGCTGCG
 GTTCCACCGCGGGTCTGGGCGCGCGCAACGCTCAAGGACGGTACCGAGCT
 GCGATTGCCCGCGGTGACCTTTGCGACGCTGCCGCACCTGACCGAAGCCAGC
 TCGGGACGGGT**CCCCAACCCGTACCGATGA**

9. Rv0164

ATGACGGCAATCTCGTGCTCACCGCGACCCAGGTATGCTTCCCGAATGCCAG
 TTTTGAGCAAGACCGTCGAGGTCACCGCCGACGCCGCATCGATCATGGCCAT
 CGTTGCCGATATCGAGCGCTACCCAGAGTGGAAATGAAGGGGTCAAGGGCGCA
 TGGGTGCTCGCTCGCTACGATGACGGGCGTCCCAGCCAGGTGCGGCTCGAC
 ACCGCTGTTCAAGGCATCGAGGGCACCTATATCCACGCCGTGTA**CTACCCAG**
 GCGAAAACCAGATTCAAACCGTCATGCAGCAGGGTGA**ACTGTTTGCCAAGCAG**
 GAGCAGCTGTTCAGTGTGGTGGCAACCGGCCGCGAGCTTGCTCACGGTG
 GACATGGACGTCCAGGTCACCATGCCGGTGCCCGAGCCGATGGTGAAGATGC
 TGCTCAACAACGTCTGGAGCATCTCGCCGAAAATCTCAAG**GCAGCGCGCCGA**
GCAGCTGGCGGCCAGCTAA

10. Rv3204

ATGGCGCCGGTGACCGACGAACAGGTGGAGCTGGTGCGCTCACTGGTCGCG
 GCCATCCCACTCGGCCGGGTGTCCACCTACGGCGACATCGCAGCTCTCACAG
 GGCTTTCCAGTCCGCGTATTGTCCGGCTGGATTATGCGGACCGATTCTCGGAT
 CTGCCCTGGCACCCGGGTGATCAGAGCCTCCGGGCGCCAGCACAGCACCTG
 GCCACCCGGCAGTTGGAGTTGTTGCGCGCAGAGGGCGTTCTCAGTGTTGACG
 GCCGGGTGGCGCTGAGCGAGATCCGCT**ATGAGTTTCCGCCGGGCTGA**

11. Rv3880c

ATGAGCATGGACGAATTGGACCCGCATGTCGCCCGGGCGTTGACGCTGGCG
 GCGCGGTTTCAGTCGGCCCTAGACGGGACGCTCAATCAGATGAACAACGGAT
 CCTTCCGCGCCACCGACGAAGCCGAGACCGTCAAGTGATGCGCAGGCCCGC
 GGCGTCCGCGTATAACGACGCGGGCGGGCGAGCAGCTGACCGCTGCGTTATC
 GGCCATGTCCCGCGCG**GATGAACGAAGGAATGGCCTAA**

12. Rv1837c

ATGACAGATCGCGTGTCGGTGGGCAACTTGCGCATCGCTCGGGTGCTCTACG
 ACTTCGTGAACAATGAAGCCCTGCCTGGCACCGATATCGACCCGGACAGCTTC
 TGGGCGGGCGTTCGACAAGGTCGTGCGCGACCTGACCCCGCAGAACCAAGCT
 CTGTTGAACGCCCGCGACGAGCTGCAGGGCGCAGATCGACAAGTGGCACCGG
 CGTCGGGTGATCGAGCCCATCGACATGGATGCCTACCGCCAGTTCCTCACCG
 AGATCGGCTACCTGCTTCCCGAACCTGATGACTTCACCATCACACGTCCGGT
 GTCGACGCTGAGATCACACGACCGCCGGCCCCAGCTGGTGGTGCCGGTG
 CTAACGCGCGGTTTGCTCTGAACGCGGCCAACGCTCGCTGGGGCTCCCTCT
 ACGACGCCTTGTATGGCACCGATGTCATCCCCGAGACCGACGGCGCCGAAAA
 AGGCCCCACGTACAACAAGGTTTCGTGGCGACAAGGTGATCGCGTATGCCCGC
 AAGTTCCTCGACGACAGTGTTCCGCTGTCGTCCGGTTCCTTTGGCGACGCCA
 CCGGTTTTCACAGTGCAGGATGGCCAGCTCGTGGTTGCCTTGCCGGATAAGTC
 CACCGGCCTGGCCAACCCCGGCCAGTTCGCCGGCTACACCGGCGCAGCCGA
 GTCGCCGACATCGGTGCTGCTAATCAATCACGGTTTGCACATCGAGATCCTGA
 TCGATCCGGAGTCGCAGGTCCGGACCAACCGACCGGGCCGGCGTCAAGGACG
 TGATCCTGGAATCCGCGATCACACGATCATGGACTTCGAGGACTCGGTGGC
 CGCCGTGGACGCCCGCCGACAAGGTGCTGGGTTATCGGAACTGGCTCGGCCT

GAACAAGGGCGACCTGGCAGCAGCGGTAGACAAGGACGGCACCGCTTTCT
 GCGGGTGCTCAATAGGGACCGGAACACACCGCACCCGGCGGTGGCCAGTT
 CACGCTGCCTGGACGCAGCCTCATGTTTCGTCGCAACGTGGTCACTTGATG
 ACGAATGACGCCATCGTCGACACTGACGGCAGCGAGGTGTTTGAAGGCATCA
 TGGATGCCCTATTCACCGGCCTGATCGCCATCCACGGGCTAAAGGCCAGCGA
 CGTCAACGGGCGCTGATCAACAGCCGCACCGGCTCCATCTACATCGTCAAG
 CCGAAGATGCACGGTCCGGCCGAGGTGGCGTTTACCTGCGAACTGTTGAGCC
 GGGTTGAAGATGTGCTGGGGTTGCCGAAAACACCATGAAGATCGGCATCAT
 GGACGAGGAACGCCGACCACGGTCAACCTCAAGGCGTGCATCAAAGCTGCC
 GCGGACCGCGTGGTGTTCATCAACACCGGGTTCCTGGACCGCACCGGCGATA
 AATCCACACCTCGATGGAGGCCGGCCCGATGGTGCGCAAGGGCACCATGAAG
 AGCCAGCCGTGGATCTTGGCCTACGAGGACCACAACGTTCGATGCCGGCCTGG
 CCGCCGGGTTGAGCGGCCGAGCCAGGTTCGGCAAGGGCATGTGGACAATGA
 CCGAGCTGATGGCCGACATGGTTCGAGACAAAATCGCCCAGCCGCGCGCCG
 GGGCCAGCACCGCCTGGGTTCCCTCTCCACTGCGGCCACCCTGCATGCGCT
 GCACTACCACCAGGTTCGACGTTCGCGCGGTGCAACAAGGACTGGCGGGGAA
 GCGTTCGCGCCACCATCGAACAATTGCTGACCATTCCGCTGGCCAAGGAATTG
 GCCTGGGCTCCCGACGAGATCCGCGAAGAGGTTCGACAACAACGTCAATCCA
 TCCTCGGCTACGTGGTTCGCTGGGTTGATCAAGGTGTCGGCTGCTCGAAGGT
 GCCCGACATCCACGACGTTCGCGCTCATGGAGGACCGGGCCACGCTGCGAAT
 CTCCAGCCAATTGTTGGCCAACCTGGCTGCGCCACGGTGTGATCACCAGCGCG
 GATGTGCGGGCCAGCTTGGAGCGGATGGCGCCGTTGGTTCGATCGACAAAAC
 GCGGGCGACGTGGCATAACCGACCGATGGCACCCAACCTTCGACGACAGTATCG
 CCTTCCTGGCCGCGCAGGAGCTGATCTTGTCCGGGGCCAGCAGCCCAACG
 GCTACACCGAGCCGATCCTGCACCGACGTTCGTCGGGAGTTTAAGGCCCGGGC
 CGCTGAGAAGCCCGGCCCATCGGACAGGGCCCGGT**GACGATGCGGGCCCGCTA**
G

13. Rv2031c

ATGGCCACCACCCTTCCCGTTCAGCGCCACCCGCGGTCCCTCTTCCCCGAGT
 TTTCTGAGCTGTTTCGCGGCCTTCCCGTCATTTCGCCGACTCCGGCCACCTTC
 GACACCCGTTGATGCGGCTGGAAGACGAGATGAAAGAGGGGCGCTACGAG
 GTACGCGCGGAGCTTCCCGGGGTTCGACCCCGACAAGGACGTTCGACATTATGG
 TCCGCGATGGTCAGCTGACCATCAAGGCCGAGCGCACCGAGCAGAAGGACTT
 CGACGGTTCGCTCGGAATTCGCGTACGGTTCCTTCGTTTCGCACGGTGTGCTG
 CCGGTAGGTGCTGACGAGGACGACATTAAGGCCACCTACGACAAGGGCATTG
 TACTGTGTCGGTGGCGGTTTCGGAAGGGAAGCCAACCGAAAAGCACATTCA
GATCCGGTCCACCAACTGA

14. Rv3763

GTGAAGCGTGGACTGACGGTTCGCGGTAGCCGGAGCCGCCATTCTGGTTCGCA
 GGTCTTTCCGGATGTTCAAGCAACAAGTCGACTACAGGAAGCGGTGAGACCA
 CGACCGCGGCAGGCACGACGGCAAGCCCCGGCGCCGCTCCGGGCCGAAG
 GTCGTTCATCGACGGTAAGGACCAGAACGTTCACCGGCTCCGTGGTGTGCACAA
 CCGCGGCCGCAATGTCAACATCGCGATCGGCGGGGGCGGCGACCGGCATTG
 CCGCCGTGCTCACCGACGGCAACCTCCGGAGGTGAAGTCCGTTGGGCTCG
 GTAACGTCAACGGCGTACGCTGGGATACAGTTCGGGCACCGGACAGGGTAA
 CGCCTCGGCAACCAAGGACGGCAGCCACTACAAGATCACTGGGACCGCTACC
 GGGGTTCGACATGGCCAACCCGATGTCACCGGTGAACAAGTCGTTTGA**AATCG**
AGGTGACCTGTTCTAA

15. Rv0934

GTGAAAATTCGTTTGCATACGCTGTTGGCCGTGTTGACCGCTGCGCCGCTGC
 TGCTAGCAGCGGCGGGCTGTGGCTCGAAACCACCGAGCGGTTTCGCTGAAAC

GGGCGCCGGCGCCGGTACTGTCGCGACTACCCCGCGTCGTCGCCGGTGAC
 GTTGGCGGAGACCGGTAGCACGCTGCTCTACCCGCTGTTCAACCTGTGGGGT
 CCGGCCTTTCACGAGAGGTATCCGAACGTCACGATCACCGCTCAGGGCACCG
 GTTCTGGTGCCGGGATCGCGCAGGCCCGCCGCGGGACGGTCAACATTGGGG
 CCTCCGACGCCTATCTGTGCGAAGGTGATATGGCCGCGCACAAGGGGGCTGAT
 GAACATCGCGCTAGCCATCTCCGCTCAGCAGGTCAACTACAACCTGCCCGGA
 GTGAGCGAGCACCTCAAGCTGAACGGAAAAGTCCTGGCGGCCATGTACCAGG
 GCACCATCAAAACCTGGGACGACCCGCGAGATCGCTGCGCTCAACCCCGGCGT
 GAACCTGCCCGGCACCGCGGTAGTTCCGCTGCACCGCTCCGACGGGTCCGG
 TGACACCTTCTTGTTACCCAGTACCTGTCCAAGCAAGATCCCGAGGGGTGGG
 GCAAGTCGCCCGGCTTCGGCACCCGCTCGACTTCCCGGCGGTGCCGGGTG
 CGCTGGGTGAGAACGGCAACGGCGGCATGGTGACCGGTTGCGCCGAGACAC
 CGGGCTGCGTGGCCTATATCGGCATCAGCTTCTCGACCAGGCCAGTCAACG
 GGGACTCGGCGAGGCCCAACTAGGCAATAGCTCTGGCAATTTCTTGTTGCC
 GACGCGCAAAGCATTACAGGCCGCGGCGGCTGGCTTCGCATCGAAAACCCCG
 GCGAACCAGGCGATTTGATGATCGACGGGCCCGCCCGGACGGCTACCCG
 ATCATCAACTACGAGTACGCCATCGTCAACAACCGGCAAAGGACGCCGCCA
 CCGCGCAGACCTTGCAGGCATTTCTGCACTGGGCGATCACCGACGGCAACAA
 GGCCTCGTTCCTCGACCAGGTTCAATTCAGCCGCTGCCGCCCGCGGTGGTG
 AAGTTGTCTGACGCGTT**GATCGCGACGATTTCCAGCTAG**

16. Rv3875

ATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTCGCGGGTATCGAGGCCGCGGCAAGCGCA
 ATCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCAATCCCTCCTTGACGAGGGGAAGCAGTC
 CCTGACCAAGCTCGCAGCGGCCTGGGGCGGTAGCGGTTCCGAGGCCGTACCA
 GGGTGTCCAGCAAAAATGGGACGCCACGGCTACCGAGCTGAACAACGCGCTG
 CAGAACCTGGCGCGGACGATCAGCGAAGCCGGTCAGGCAATGGCTTCGACC
 GAAGGCAAC**GTCACTGGGATGTTTCGATAG**

17. Rv0040c

ATGATCCAGATCGCGCGCACCTGGCGGGTCTTCGCAGGCCGGCATGGCCACC
 GGTTTCATCGGCGTGGTGCTGGTCACCCGCCGGGAAGGCCTCAGCGGATCCC
 CTGCTGCCACCGCCGCCTATCCCTGCCCCAGTCTCGGCGCCGGCAACAGTCC
 CGCCCGTGCAGAACCTCACGGCGCTTCCGGGCGGGAGCAGCAACAGGTTCT
 CACCGGCGCCAGCACCCGACCCGATCGCGTCGCCGATTCCGGTCCGAGCAC
 CCGGGTCCACCGCTGTGCCCCCGCTGCCGCCGCGAGTACTCCCGCGATCA
 GCGGCACACTTCGGGACCACCTCCGGGAGAAGGGCGTCAAGCTGGAGGCAC
 AGCGACCGCACGGATTCAAGGCGCTCGACATCACACTGCCCATGCCGCCGCG
 CTGGACTCAGGTGCCCGACCCCAACGTGCCCGACGCGTTCTGGTGGTATCGCC
 GACCGGTTGGGCAACAGCGTCTACACGTGAATGCGCAGCTGGTGGTGATA
 GGCTGATCGGTGACTTCGATCCCGCTGAGGCCATCACACACGGCTACATTGA
 CAGCCAGAAATTGCTCGCATGGCAGACCACAAACGCCTCGATGGCCAATTTCC
 ACGGCTTTCGTCATCAATCATCGAGGGCACCTACCGCGAAAACGACATGACC
 CTAACACCTCCCGGCGCCACGTCATCGCCACCTCCGGAGCCGACAAGTACC
 TGGTTTCGCTGTCCGGTGACCACCGCGCTGTGCGCAGGCGGTACCGACGGGC
 CGGCCACCGATGCGATTGTCAACGGATTCCAAGTGGTTGCGCATGCGGCCGCC
 CGCTCAGGCGCCTGCCCGGCACCCGGTTCGGCACCGGTGGGACTACCCGG
 GCAGGCGCCTGGGTATCCGCCCGCGGGCACCCCTGAC**CCAGTCCCGCCGCG**
CTAG

18. Rv1860

ATGCATCAGGTGGACCCCAACTTGACACGTCGCAAGGGACGATTGGCGGCA
 CTGGCTATCGCGGCGATGGCCAGCGCCAGCCTGGTGACCGTTGCGGTGCC
 GCGACCGCCAACGCCGATCCGGAGCCAGCGCCCGGTACCCACAACGGCC

GCCTCGCCGCCGTCGACCGCTGCAGCGCCACCCGCACCCGGCGACACCTGTT
 GCCCCCCACCACCGGCCGCCGCAACACGCCGAATGCCAGCCGGGCGAT
 CCCAACGCAGCACCTCCGCCGCCGACCCGAACGCACCCGCCACCTGTC
 ATTGCCCAAACGCACCCCAACCTGTCCGGATCGACAACCCGGTTGGAGGAT
 TCAGCTTCGCGCTGCCTGCTGGCTGGGTGGAGTCTGACGCCGCCACTTCGA
 CTACGGTTCAGCACTCCTCAGCAAACACCCGGGGACCCGCCATTTCCCGGA
 CAGCCGCCGCCGGTGGCCAATGACACCCGTATCGTGCTCGGCCGGCTAGAC
 CAAAAGCTTTACGCCAGCGCCGAAGCCACCGACTCCAAGGCCGCGGCCCGGT
 TGGGCTCGGACATGGGTGAGTTCTATATGCCCTACCCGGGCACCCGGATCAA
 CCAGGAAACCGTCTCGCTCGACGCCAACGGGGTGTCTGGAAGCGCGTCGTAT
 TACGAAGTCAAGTTCAGCGATCCGAGTAAGCCGAACGGCCAGATCTGGACGG
 GCGTAATCGGCTCGCCCGCGGCCAACGCACCCGACGCCGGGCCCCCTCAGC
 GCTGGTTTGTGGTATGGCTCGGGACCGCCAACAACCCGGTGGACAAGGGCG
 CGGCCAAGGCGCTGGCCGAATCGATCCGGCCTTTGGTGCCCCGCCGCCGG
 CGCCGGCACCCGGCTCCTGCAGAGCCCGCTCCGGCGCCGGCGCCGGCCGGG
 GAAGTCGCTCCTACCCCGACGACACCCGACACCCGAC**GCGGACCTTACCGGCCT
 GA**

19. Rv3803c

ATGAAGGGTCGGTCCGGCGCTGCTGCGGGCGCTCTGGATTGCCGCACTGTCA
 TTCGGGTTGGGCGGTGTGCGGTTAGCCGCGGAACCCACCGCCAAGGCCGCC
 CCATACGAGAACCTGATGGTGCCGTGCGCCTCGATGGGCCGGGACATCCCGG
 TGGCCTTCCTAGCCGGTGGGCCGCACGCGGTGTATCTGCTGGACGCCTTCAA
 CGCCGGCCCGGATGTCAGTAACTGGGTACCCGCGGGTAACGCGATGAACAC
 GTTGGCGGGCAAGGGGATTTCCGGTGGTGGCACCCGGCCGGTGGTGCGTACAG
 CATGTACACCAACTGGGAGCAGGATGGCAGCAAGCAGTGGGACACCTTCTTG
 TCCGCTGAGCTGCCCGACTGGCTGGCCGCTAACCCGGGGCTTGGCCCCCGGT
 GGCCATGCGGGCCGTTGGCGCCGCTCAGGGCGGTTACGGGGCGATGGCGCTG
 GCGGCCTTCCACCCCGACCGCTTCGGCTTCGCTGGCTCGATGTCGGGCTTTT
 TGTACCCGTCGAACACCACCACCAACGGTGGCATCGCGGCGGGCATGCAGCA
 ATTCCGGCGGTGTGGACACCAACGGAATGTGGGGAGCACACAGCTGGGTCG
 GTGGAAGTGGCACGACCCGTGGGTGCATGCCAGCCTGCTGGCGCAAAACAAC
 ACCCGGGTGTGGGTGTGGAGCCCGACCAACCCGGGAGCCAGCGATCCCGCC
 GCCATGATCGGCCAAGCCGCCGAGGCGATGGGTAAACAGCCGCATGTTCTACA
 ACCAGTATCGCAGCGTCGGCGGGCACAACGGACACTTCGACTTCCAGCCAG
 CGGTGACAACGGCTGGGGCTCGTGGGCGCCCCAGCTGGGCGCTATGTCGGG
 CGATAT**CGTCCGGTCCGATCCGCTAA**

20. Rv1926c

ATGAAGCTCACCAATGATCAAGACGGCAGTAGCGGTCTGGCCATGGCG
 GCCATCGCGACCTTTGCGGCACCGGTGCGGTTGGCTGCCTATCCCATCACCG
 GAAAACCTTGGCAGTGAGCTAACGATGACCGACACCGTTGGCCAAGTCGTGCT
 CGGCTGGAAGGTCAGTGATCTCAAATCCAGCACGGCAGTCATCCCCGGCTAT
 CCGGTGGCCGGCCAGGTCTGGGAGGCCACTGCCACGGTCAATGCGATTTCG
 GGCAGCGTCACGCCCGCGGTCTCGCAGTTCAATGCCCGCACCCGCCGACGGC
 ATCAACTACCCGGTGTGTGGCAAGCCGCGGGCCCCGACACCATTAGCGGAG
 CCACTATCCCCAAGGCGAACAATCGACCGGCAAAATCTACTTCGATGTCACC
 GGCCCATCGCCAACCATCGTCGCGATGAACAACGGCATGGAGGATCT**GCTGA
 TTTGGGAGCCGTAG**

21. Rv1980c

GTGCGCATCAAGATCTTCATGCTGGTCCACGGCTGTGCTTTTGTCTGTTGTTG
 GGGTGTGGCCACGGCCGCGCCCAAGACCTACTGCGAGGAGTTGAAAGGCAC
 CGATACCGGCCAGGCGTGCCAGATTCAAATGTCCGACCCGGCCTACAACATC

AACATCAGCCTGCCAGTTACTACCCCGACCAGAAGTCGCTGGAAAATTACAT
 CGCCCAGACGCGCGACAAGTTCCTCAGCGCGGCCACATCGTCCACTCCACGC
 GAAGCCCCCTACGAATTGAATATCACCTCGGCCACATACCAGTCCGCGATACC
 GCCGCGTGGTACGCAGGCCGTGGTGTCAAGGTCTACCAGAACGCCGGCGG
 CACGCACCCAACGACCACGTACAAGGCCTTCGATTGGGACCAGGCCTATCGC
 AAGCCAATCACCTATGACACGCTGTGGCAGGCTGACACCGATCCGCTGCCAG
 TCGTCTTCCCCATTGTGCAAGGTGAACTGAGCAAGCAGACCGGACAACAGGTA
 TCGATAGCGCCGAATGCCGGCTTGGACCCGGTGAATTATCAGAACTTCGCAGT
 CACGAACGACGGGGTGATTTTCTTCTTCAACCCGGGGGAGTTGCTGCCCGAA
 GCAGCCGGCCCAACCCAGGTATTGGTCCCACGTTCCGCGAT**CGACTCGATGC
 TGGCCTAG**

22. Rv2875

ATGAAGGTAAAGAACAATTGCGGCAACCAGTTTCGCGGGCGGCCGGCCTG
 GCGGCTCTGGCGGTGGCTGTCTACCGCCGGCGGCCGCAGGCGATCTGGTG
 GGCCCGGGCTGCGCGGAATACGCGGCAGCCAATCCCACTGGGCCGGCCTCG
 GTGCAGGGAATGTCGCAGGACCCGGTCGCGGTGGCGGCCTCGAACAATCCG
 GAGTTGACAACGCTGACGGCTGCACTGTGGGCCAGCTCAATCCGCAAGTAA
 ACCTGGTGGACACCCTCAACAGCGGTGAGTACACGGTGTTTCGCACCGACCAA
 CGCGGCATTTAGCAAGCTGCCGGCATCCACGATCGACGAGCTCAAGACCAAT
 TCGTCACTGCTGACCAGCATCCTGACCTACCACGTAGTGCCGGGCCAAACCA
 GCCCGGCCAACGTCGTCCGCACCCGTGACACCCTCCAGGGCGCCAGCGTGA
 CGGTGACCGGTGAGGTAACAGCCTCAAGGTGCGTAACGCCGACGTCGTCTG
 TGGTGGGGTGTCTACCGCCAACGCGACGGTGTACATGATTGACAGCGT**GCTA
 ATGCCTCCGGCGTAA**

23. Rv2873

ATGATCAACGTTTCAGGCCAAACCGGCCGCAGCAGCGAGCCTCGCAGCCATC
 GCGATTGCGTTCTTAGCGGGTTGTTTCGAGCACCAAACCCGTGTGCAAGACA
 CCAGCCCGAAACCGGCCGACCAGCCCGGCCGGCGCCCGTTACCACGGCGGCCAA
 TGGCTGACCCCGCAGCGGACCTGATTGGTCGTGGGTGCGCGCAATACGCGG
 CGAAAATCCCACCGGTCCCGGATCGGTGGCCGGAATGGCGCAAGACCCGG
 TCGTACCGCGGCTTCCAACAACCCGATGCTCAGTACCCTGACCTCGGCTCT
 GTCGGGCAAGCTGAACCCGGATGTGAATCTGGTCGACACCCTCAACGGCGGG
 GAGTACACCGTTTTCGCCCCACCAACGCCGCATTGACAAGCTGCCGGCGG
 CCACTATCGATCAACTCAAGACTGACGCCAAGCTGCTCAGCAGCATCCTGACC
 TACCACGTGATAGCCGGCCAGGCGAGTCCGAGCAGGATCGACGGCACCCATC
 AGACCCTGCAAGGTGCCGACCTGACGGTGATAGGCGCCCGCGACGACCTCAT
 GGTCAACAACGCCGGTTTGGTATGTGGCGGAGTTCACACCGCCAACGCGACG
 GTGTACATGATCGATACGGTGCT**GATGCCCCCGGCACAGTAA**

24. Rv3873

ATGCTGTGGCACGCAATGCCACCGGAGCTAAATACCGCACGGCTGATGGCCG
 GCGCGGGTCCGGCTCCAATGCTTGCGGCGGCCGCGGGATGGCAGACGCTTT
 CGGCGGCTCTGGACGCTCAGGCCGTGAGTTGACCGCGCGCCTGAACTCTCT
 GGGAGAAGCCTGGACTGGAGGTGGCAGCGACAAGGCGCTTGCGGCTGCAAC
 GCCGATGGTGGTCTGGCTACAAACCGCGTCAACACAGGCCAAGACCCGTGCG
 ATGCAGGCGACGGCGCAAGCCGCGGCATACACCAGGCCATGGCCACGACG
 CCGTGCCTGCCGGAGATCGCCGCCAACACATCACCCAGGCCGTCTTACGG
 CCACCAACTTCTTCGGTATCAACACGATCCCGATCGCGTTGACCGAGATGGAT
 TATTTTCATCCGTATGTGGAACAGGCAGCCCTGGCAATGGAGGTCTACCAGGC
 CGAGACCGCGGTTAACACGCTTTTCGAGAAGCTCGAGCCGATGGCGTGCATC
 CTTGATCCCGGCCGCGAGCCAGAGCACGACGAACCCGATCTTCGGAATGCCCT
 CCCCTGGCAGCTCAACACCGGTTGGCCAGTTGCCGCCGGCGGGCTACCCAGA

CCCTCGGCCAACTGGGTGAGATGAGCGGCCCGATGCAGCAGCTGACCCAGC
CGCTGCAGCAGGTGACGTCGTTGTTACGCCAGGTGGGCGGCACCGGCCGCG
GCAACCCAGCCGACGAGGAAGCCGCGCAGATGGGCCTGCTCGGCACCAGTC
CGCTGTGCAACCATCCGCTGGCTGGTGGATCAGGCCCCAGCGCGGGCGCGG
GCCTGCTGCGCGCGGAGTCGCTACCTGGCGCAGGTGGGTCGTTGACCCGCA
CGCCGCTGATGTCTCAGCTGATCGAAAAGCCGTTGCCCCCTCGGTGATGCC
GGCGGCTGCTGCCGGATCGTCGGCGACGGGTGGCGCCGCTCCGGTGGGTG
CGGGAGCGATGGGCCAGGGTGCGCAATCCGGCGGCTCCACCAGGCCGGGT
TGGTCGCGCCGGCACCGCTCGCGCAGGAGCGTGAAGAAGACGACGAGGACG
ACTGGG**ACGAAGAGGACGACTGGTGA**

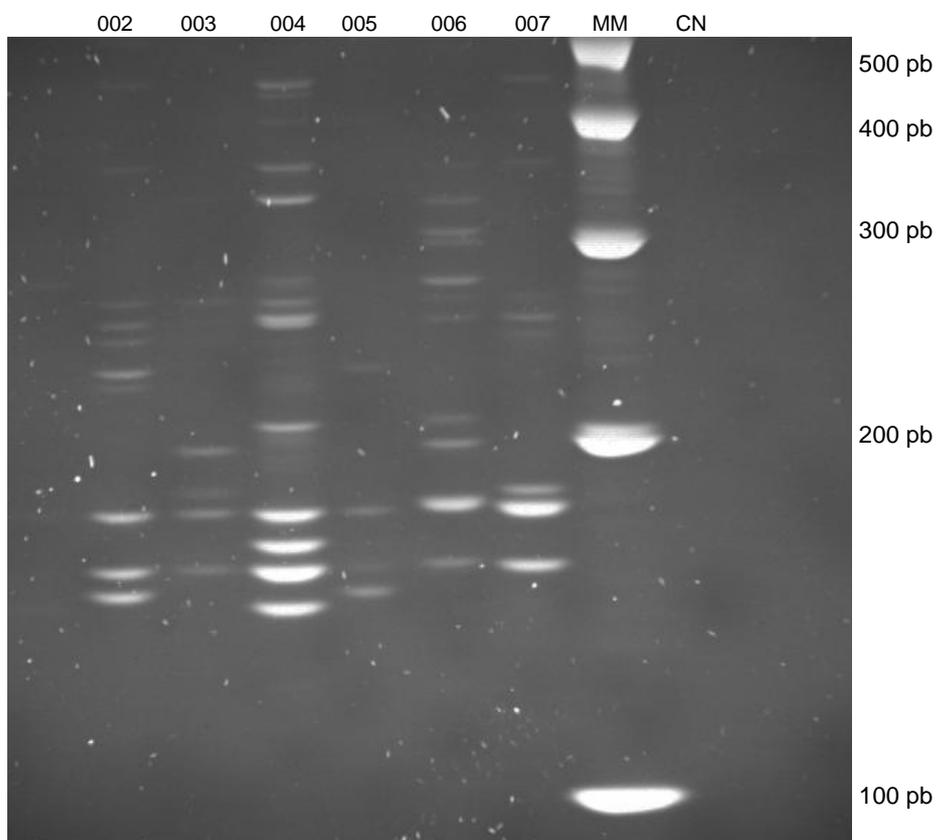
25. Rv2430c

ATGCATTTGAAGCGTACCCACCGGAGGTCAACTCCGCCAACATATATGCCG
GCCCCGGTCCTGACTCGATGTTGGCTGCCGCCAGGGCGTGGAGGTCGTTGG
ATGTGGAAATGACGGCCGTGCAGAGGTGTTCAACCGAACGCTGCTGTCTCT
GATGGACGCCTGGGCGGGTCCAGTGGTGCAGTTGATGGAGGCAGCCAA
GCCGTTTGTGAGGTGGCTGACCGACCTCTGTGTGCAGCTGTCTGAGGTCGAG
AGGCAGATCCACGAGATCGTGCGGGCCTATGAATGGGCACATCACGATATGG
TGCCCCTGGCGCAGATCTACAACAACCGTGCTGAGAGGCAGATTCTGATCGA
CAACAACGCGCTTGGGCAATCACTGCGCAGATCGCCGACCTCGACCAAGAA
TATGACGACTTCTGGGACGAGGACGGAGAGGTGATGAGGGACTACAGGCTTC
GGGTGTCGGATGCGTTGTCGAAGTTGACTCCGTGGAAGGCGCCGCCGCGGAT
CGCCACAGTACCGTGTTGGTTCGACCCGGTGTACCCAGCACGGCGT**CATCG**
CGTACAGACACTTAG

ANEXO 2

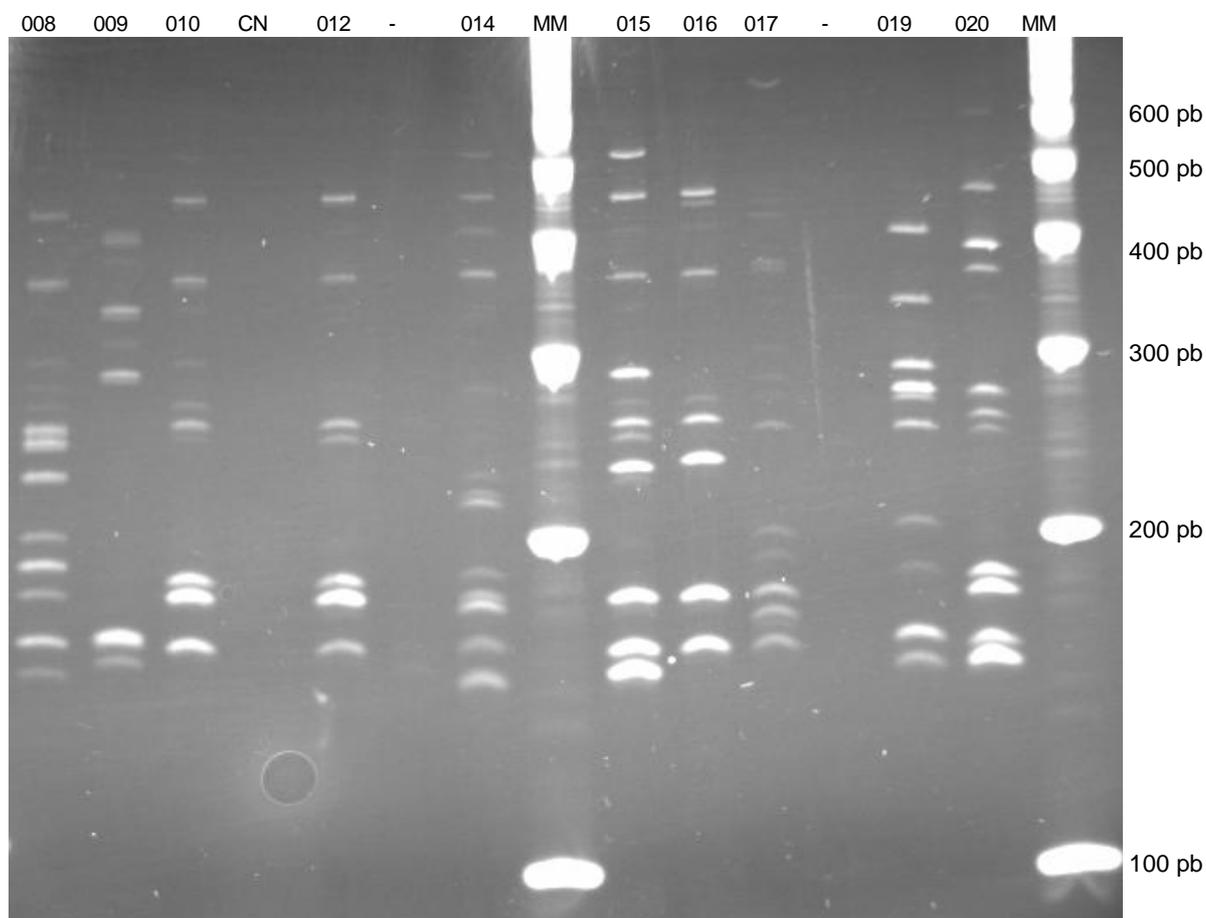
**GÉIS DE ELETROFORESE COM IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR
MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis***

FIGURA 51- GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



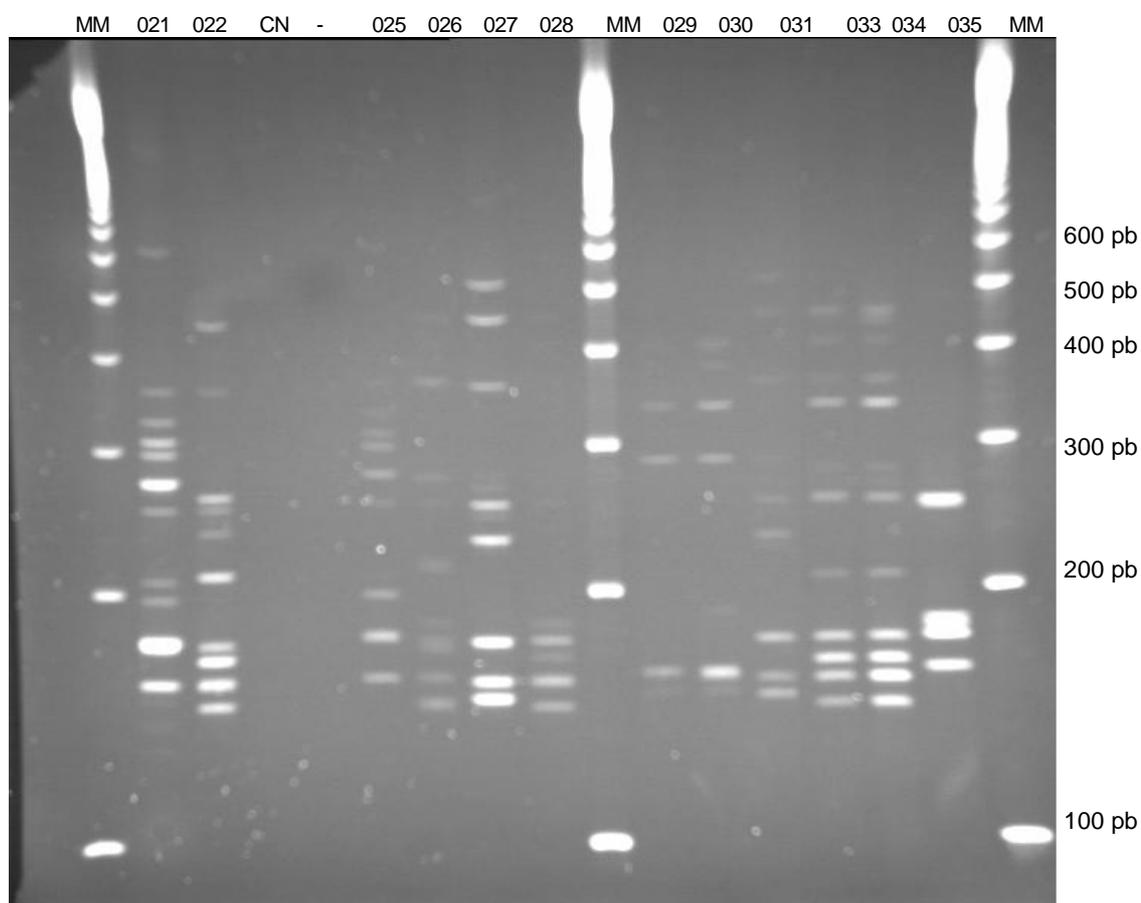
NOTA: Números 002 a 007 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 pb; CN = controle negativo

FIGURA 52- GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



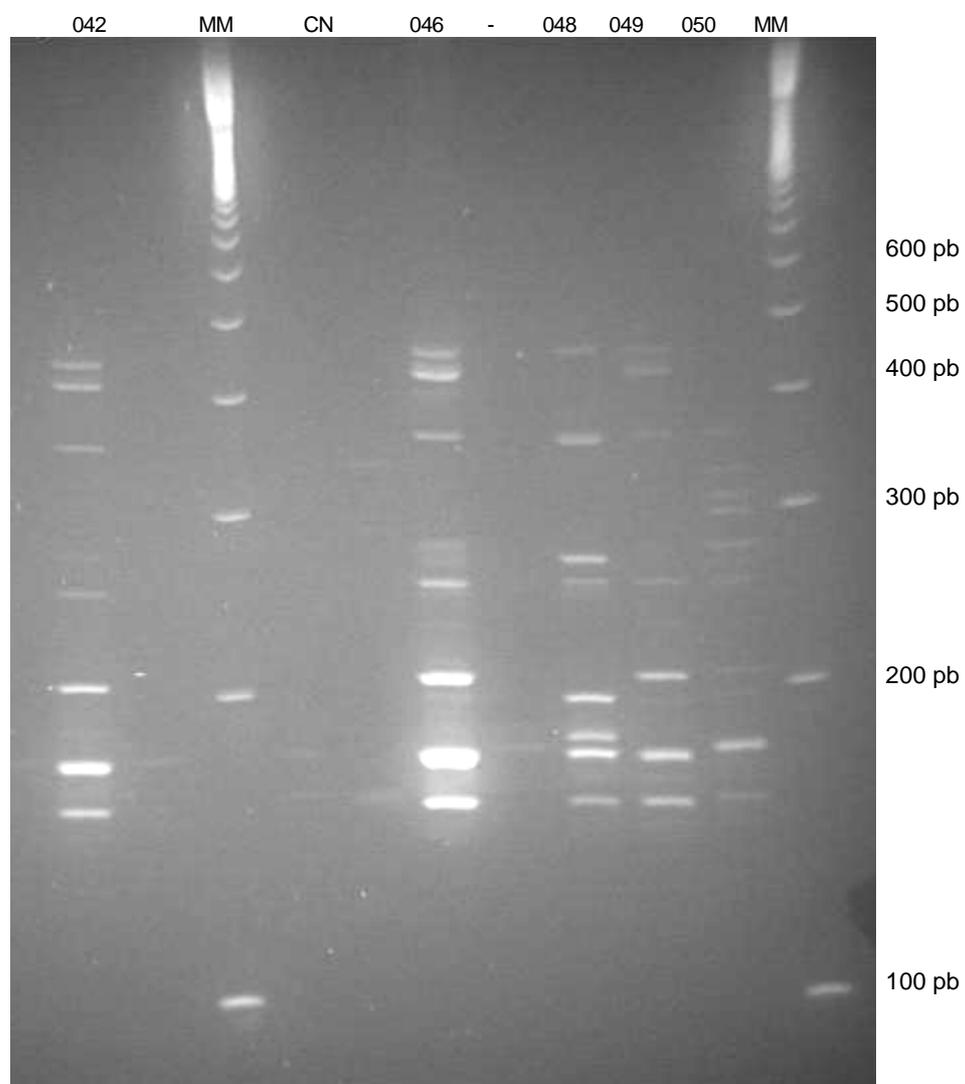
NOTA: Números 008 a 010, 012, 014, 015 a 017, 019 e 020 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 pb; CN = controle negativo; - = linha não utilizada

FIGURA 53- GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



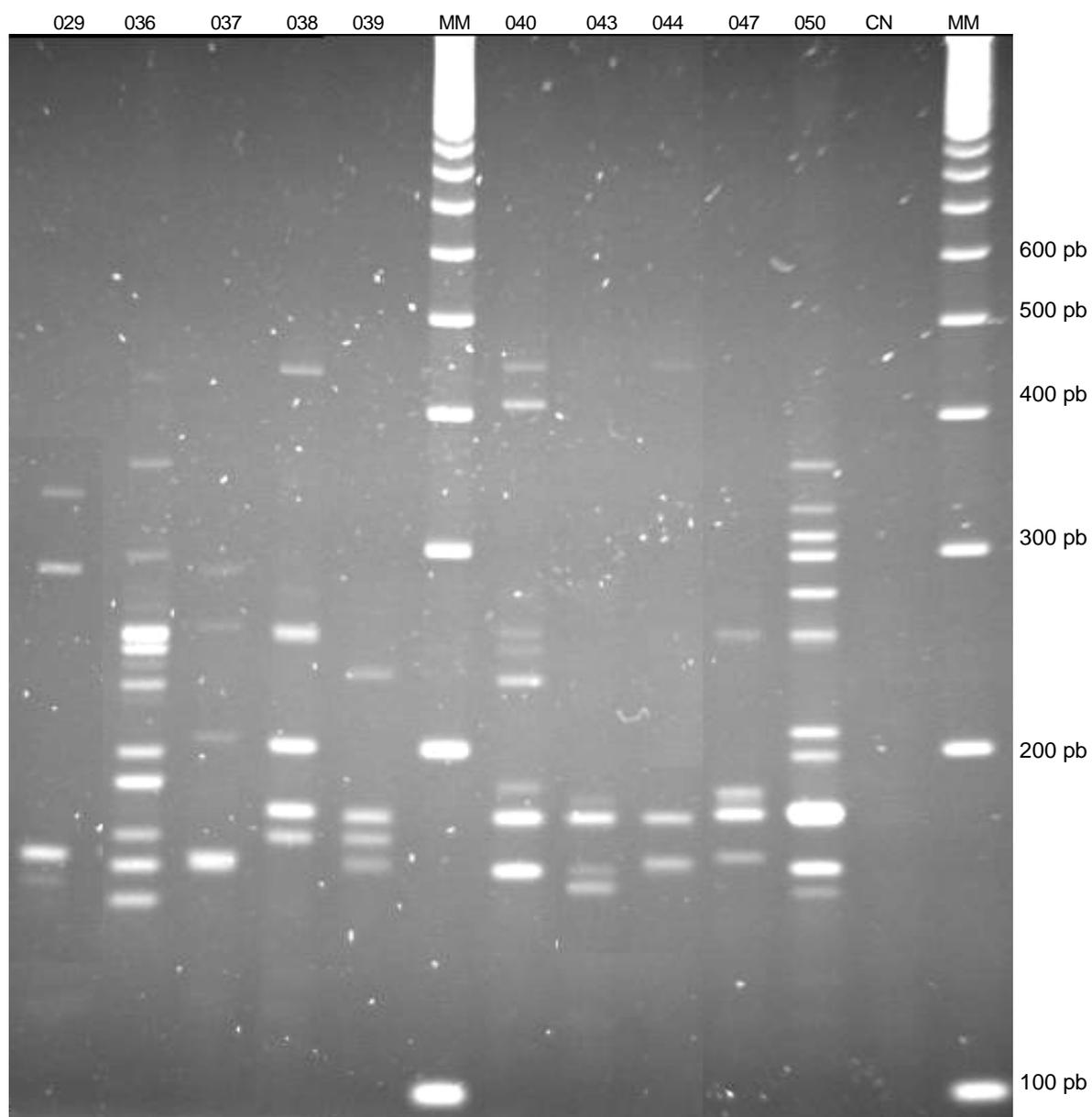
NOTA: Números 021, 022, 025 a 028, 029 a 035 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 pb; CN = controle negativo; - = linha não utilizada

FIGURA 54- GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



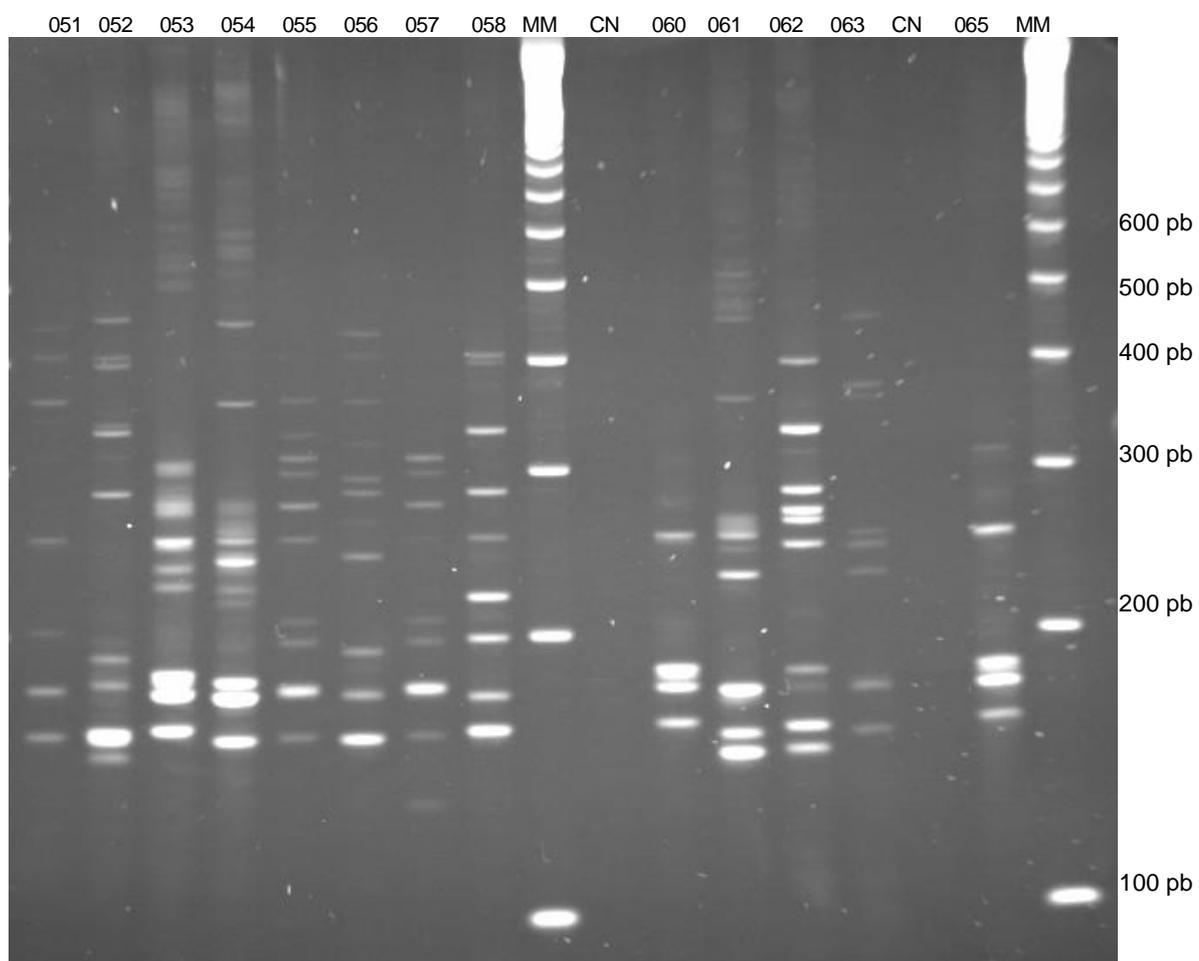
NOTA: Números 042, 046, 048 a 050 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 pb; CN = controle negativo; - = linha não utilizada

FIGURA 55- GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



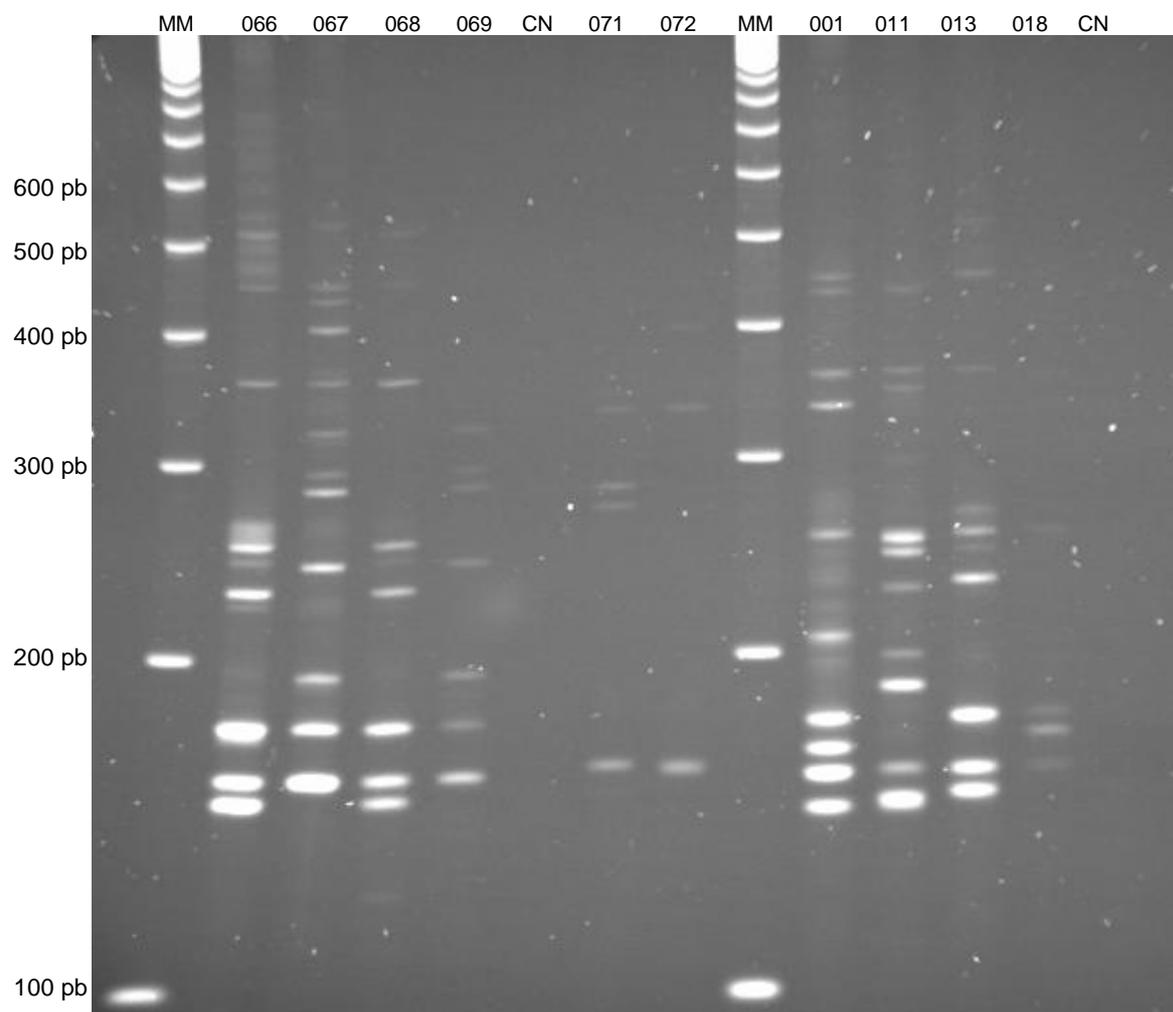
NOTA: Números 029, 036 a 040, 043, 044, 047, 050 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 pb; CN = controle negativo

FIGURA 56- GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



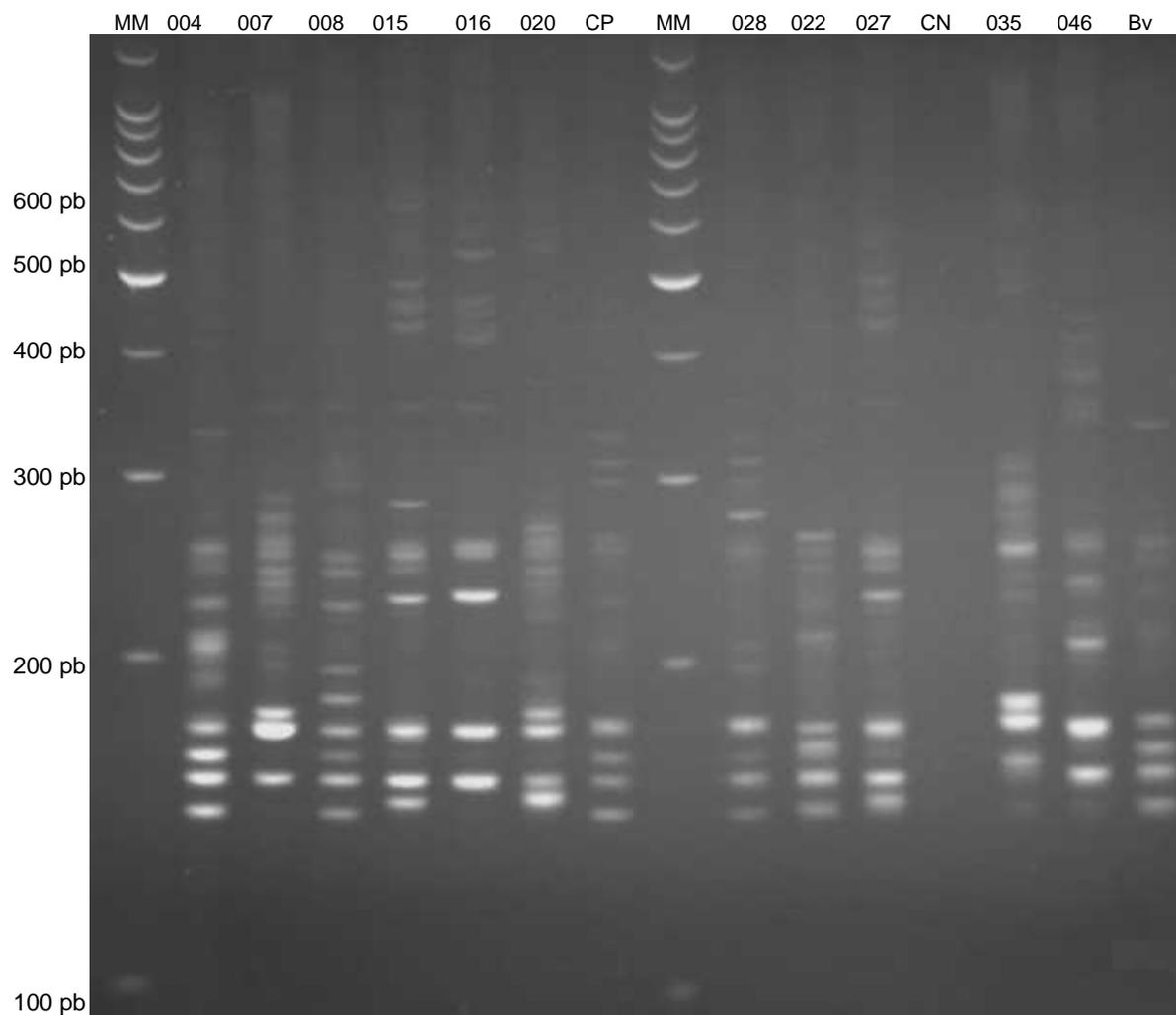
NOTA: Números 051 a 058, 060 a 063, 065 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 pb; CN = controle negativo

FIGURA 57- GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



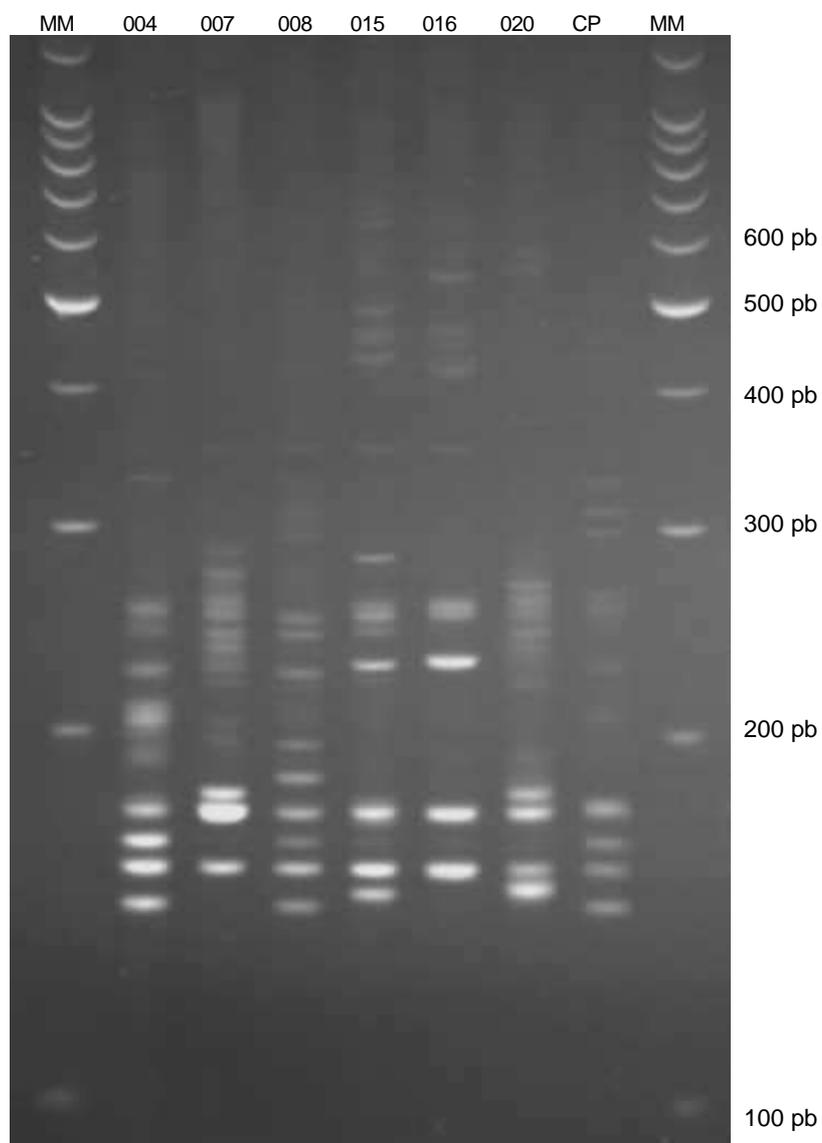
NOTA: Números 066 a 069, 071, 072, 001, 011, 013, 018 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 pb; CN = controle negativo

FIGURA 58- GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



NOTA: Números 004, 007, 008, 015, 016, 020, 022, 027, 028, 035, 046 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 pb; CN = controle negativo, CP = controle positivo, cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, Bv = cepa de *M. bovis* BCG

FIGURA 59- GEL DE ELETROFORESE CONTENDO IMPRESSÕES DIGITAIS GENÉTICAS POR MIXED-LINKER DNA FINGERPRINTING DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*



NOTA: Números 004, 007, 008, 015, 016 e 020 = cepas de *M. tuberculosis*; MM = marcador molecular em escala ascendente de 100 pb; CP = controle positivo