

PRODUÇÃO PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DERIVADO PROTEICO PURIFICADO (PPD) DE *Mycobacterium avium hominissuis*

Mariane S. Dal Pizzol¹, Beatris Kramer², Virgínia S. Silva³ e José R. Pandolfi³

¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, estagiária da Embrapa Suínos e Aves, bolsista CNPQ/PIBIC.

²Analista na Embrapa Suínos e Aves.

³Pesquisadores na Embrapa Suínos e Aves, jose.pandolfi@embrapa.br.

Palavras-chave: *Mycobacterium avium hominissuis*, PPD, tuberculose.

INTRODUÇÃO

A tuberculose suína tem como agente etiológico a espécie *M. bovis*, uma bactéria pertencente à ordem *Actinomycetales*, e à família *Mycobacteriaceae*, descrita por Robert Kock em 1882. É uma das espécies causadoras da tuberculose em mamíferos, que constituem um grupo de cinco micobactérias filogeneticamente relacionadas, o CMTB, a saber: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e o *M. canettii* (1). Outro grupo de micobactérias genotipicamente diferentes das constituintes do CMTB, forma o MAC, o qual inclui duas espécies (*M. avium* e *M. intracellulare*). O *M. avium* é subdividido em quatro subespécies: *M. a. avium*, *M. a. paratuberculosis*, *M. a. silvaticum* e *M. a. hominissuis*. São bactérias que provocam reação cruzada nos testes de hipersensibilidade a derivados protéicos purificados, como a prova da tuberculina comparada (2). A prova da tuberculina pareada consiste na avaliação de uma reação de hipersensibilidade tardia deflagrada em animais previamente expostos ao bacilo da tuberculose. Como antígenos, para desencadear a reação de hipersensibilidade, são empregadas tuberculinas sintéticas de dois tipos: o PPD bovino, produzido por *M. bovis*; e o PPD aviário proveniente do *M. avium avium* (3). Este teste é o teste padrão para a identificação da tuberculose bovina (4) e também é o teste oficial, no Brasil, para uso em suínos, todavia é utilizada apenas para a identificação de rebanhos, não tendo poder discriminatório individual (5). Dessa forma, apesar do avanço nas técnicas moleculares, na monitoria de rebanhos, ainda existem grandes obstáculos a serem transpostos. Assim, este trabalho teve como objetivo produzir e padronizar o PPD de *M. avium hominissuis* e compará-lo ao PPD aviário comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas bactérias do do MAC (*Mycobacterium avium hominissuis*). As cepas foram cultivadas em frascos contendo 50mL de meio líquido 7H9, a 37° por até 120 dias. Após o crescimento, o material foi autoclavado em temperatura de 121°C por 45 minutos. As garrafas foram deixadas esfriar em temperatura ambiente. As foram separadas do meio líquido por centrifugação. As proteínas contidas no sobrenadante foram precipitadas com adição de ácido tricloroacético (TCA) a 40%, para concentração final de 4%. Esta solução foi mantida a temperatura ambiente durante a noite, sem agitação. No outro dia, a maior parte do sobrenadante foi retirada por aspiração. O restante do líquido foi utilizado para suspender as proteínas, permitindo que sejam transferidas para tubos de centrifugação. Estes foram centrifugados a 2500xg, em temperatura ambiente, para a remoção do sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com solução de TCA e então uma vez, com solução de NaCl a 10%. O precipitado lavado foi então suspenso em solução tampão fosfato (PBS) estéril e eu pH foi ajustado a 7,0 com solução de NaOH 10N. Após quantificação protéica pelo método de Bradford, a solução foi envasada e mantida protegida da luz, em temperatura de 4°C. A concentração protéica foi equiparada às dos PPDs comerciais, para 0,5mg/mL, com PBS estéril adicionado de fenol a 0,5%. O material foi mantido em temperatura entre 2 a 8°C, até o momento do uso. A esterilidade dos antígenos foi verificada por inoculação de 100µL do PPD hominissuis padronizado nos meios de cultivo Ágar Nutriente, Ágar Sangue, Ágar MacConckey e BHI e incubação em temperatura de 37°C por 24 horas e também através de inoculação de 100µL do PPD purificado nos meios 7H9, 7H10, LJ e Middlebrook, com incubação em temperatura de 30°C por até 120 dias. O PPD hominissuis foi então avaliado frente ao PPD aviário comercial na prova da tuberculina comparada, realizada em animais de descarte da Embrapa Suínos e Aves, previamente imunizados com antígenos inativados. Esta imunização foi feita em grupos de animais, ao longo do tempo, conforme a disponibilidade de instalações. O dia da imunização foi considerado o dia zero, quando foi colhida a primeira amostra de sangue para posterior análise sorológica. Foram obtidas ainda amostras séricas no dia 63 pós-imunização. Os animais foram imunizados com aplicação de 25mg do antígeno inativado, por via intramuscular. Foram empregados 60 fêmeas, divididos em 06 tratamentos sendo: T1. não imunizados, T2. imunizados com *M. avium hominissuis*; T3. imunizados com *M.bovis*; T4. imunizados com *M. avium hominissuis* e com *M. bovis*; T5. imunizados com *M.avium avium* e; T6. imunizados com *M. avium avium* e com *M. bovis*. A comparação dos PPDs foi feita com 63 dias após a imunização dos animais, com o teste do PPD aviário comercial sempre comparado ao do PPD hominissuis. Foram injetadas 0,05mg de PPD (equivalente a 0,1mL), sendo a orelha direita destinada ao PPD aviário comercial e a esquerda ao PPD hominissuis. As leituras das tuberculinas foram feitas após 48 horas, segundo a Instrução normativa SDA no. 019-2002 (5), com paquímetro no maior diâmetro da lesão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PPD hominissuis foi obtido adequadamente padronizado (Figura 1), e testado estéril nos diferentes meios de cultura. Após passar nos testes de esterilidade a comparação entre os PPDs foi feita através das medidas realizadas nas reações cutâneas causadas pelo estímulo de cada um dos PPDs testados (Figura 2). Os dados obtidos mostraram que o PPD hominissuis apresentou resultados semelhantes àqueles produzidos com o uso do PPD aviário comercial, ou seja, eles produzem resposta específica aos antígenos de *M. avium avium* e *M. avium hominissuis* semelhantes. Na comparação às respostas cruzadas produzidas em animais imunizados com antígenos de *M. bovis* BCG o PPD hominissuis também produziu reações iguais àquelas produzidas pelo PPD aviário comercial, demonstrando assim que, nestas condições experimentais, não foi capaz de melhorar a capacidade discriminatória do teste. Este resultado poderia ser explicado devido à grande diferença produzida na resposta imune dos animais imunizados com antígeno inativado quando comparada àquelas de animais naturalmente infectados. Tanto as doses de antígenos, os metabólitos excretados pelas micobactérias durante a infecção (natural ou experimental), e mesmo a estimulação prolongada do sistema imune que ocorre durante a infecção, quando comparada à imunização com antígenos inativados, podem ser fatores que levaram à essa diferença. Todavia esse mesmo comportamento seria esperado para os PPDs comerciais e não ocorreu. Estes resultados sugerem um estudo dos genomas das micobactérias utilizadas neste trabalho, afim de identificar antígenos específicos que poderiam ser empregados em um PPD sintético.

CONCLUSÕES

O PPD hominissuis não foi capaz produzir respostas imunes mais específicas do que aquelas produzidas pelo estímulo do PPD aviário comercial.

REFERÊNCIAS

1. RIET-CORREA, F.; GARCIA, M. Tuberculose. IN: RIET CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças dos ruminantes e eqüinos**. 2.ed. São Paulo, 2001, v.1, p.351-362.
2. DVORSKA L, MATLOVA L, BARTOS M, PARMOVA I, BARTL J, SVASTOVA, P, BULL TJ, PAVLIK I. **Study of Mycobacterium avium complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000**. Veterinary microbiology, v. 99, p.239-50, 2004.
3. MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. **The tuberculin test**. Veterinary Microbiology, v.40, p.111-124, 1994.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bovine Tuberculosis**. IN: OIE terrestrial Manual. Chap. 2.4.7, 16p. 2009. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf>. Acesso em 26/08/2015.
5. BRASIL. **Instrução Normativa/SDA 19**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Brasília, 2002. 10p.
6. MARTINS, L.S., LEÃO, S.C., MORÉS, N., SILVA, V.S., DUTRA, V., PINHEIRO, S.R., BALIAN, S., HOMEM, V.S.F., FERREIRA, F., FERREIRA NETO, J.S. **Epidemiologia e controle das micobacterioses em suínos no Sul do Brasil - estimativa do impacto econômico** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.69, n.1, p.39-43, jan./mar., 2002.

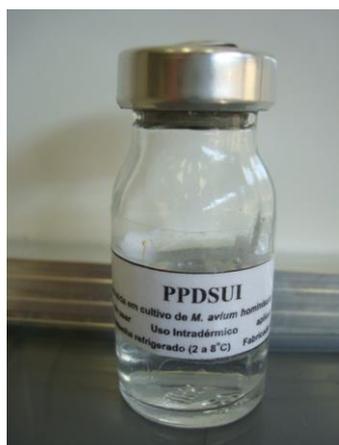


Figura 1. Frasco de PPD hominissuis padronizado, testado e envasado para ser utilizado nos experimentos.



Figura 2. Exemplo de reação cutânea ao PPD. Observa-se lesão inflamatória que pode ser observada pela vermelhidão. A dupla seta demonstra o maior diâmetro, que deve ser medido com o paquímetro. Foto: cortesia do Dr. Nelson Morés.