

# **AVALIAÇÃO DA PATOGENIA DO *Mycobacterium bovis* ISOLADO DE BOVINOS EM GOIÁS E DE UMA VACINA BCG RECOMBINANTE, VIA CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) EM CAMUNDONGOS BALB/c**

Letícia Melo OLIVEIRA<sup>1</sup>, Ana Paula JUNQUEIRA-KIPNIS<sup>2</sup>, André KIPNIS<sup>3</sup>, Monalisa Martins TRENTINI<sup>3</sup>, Danilo Pires de RESENDE<sup>3</sup>

*Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Go*

*email: leticiameloo@hotmail.com*

Palavras chave: Tuberculose, resistência, susceptibilidade

## **1. INTRODUÇÃO**

A Tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica e efeito debilitante, causada pelo *Mycobacterium bovis*, cujo hospedeiro primário é o bovino. É uma doença infecciosa com um padrão epidemiológico complexo, que inclui a transmissão entre homens, animais domésticos e animais selvagens (ANDRADE *et al.*, 1991). Possui distribuição mundial, ocorrendo principalmente em países em desenvolvimento e em criações intensivas, como em rebanho leiteiro (BELCHIOR, 2001).

Estima-se que a Tuberculose atingiu, nos tempos atuais, treze milhões de novos casos e dois milhões de mortes por ano (WHO, 2009). A infecção por *M. bovis* é atualmente responsável por apenas uma pequena porcentagem de casos notificados, apesar de ter sido um grande problema de saúde pública na Europa e em outros lugares. Quando da ausência de pasteurização do leite, este microrganismo era transmitido para o homem pelo leite de vacas infectadas, por outro lado, a infecção no ar continua a ocorrer entre trabalhadores da indústria de carne e matadouros, em regiões onde a infecção ainda é prevalente em bovinos (THOEN *et al.*, 2006)

O controle e erradicação da tuberculose zoonótica exige o reconhecimento precoce da infecção em animais e a remoção imediata de todos os animais infectados, a fim de eliminar uma futura fonte de infecção para outros animais e para seres humanos. Atualmente no Brasil, encontra-se em vigor, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e

<sup>1</sup> Graduanda em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Goiás

<sup>2</sup> Profª Drª Orientadora, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

<sup>3</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

Tuberculose (PNCEBT). O programa foi instituído em 2001, com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses e de promover a competitividade da pecuária nacional, principalmente em mercados estrangeiros (LAGE et al, 2006). A vacina *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) tem sido usada por mais de 80 anos como a única vacina para o controle da TB em humanos. Essa vacina foi desenvolvida por dois pesquisadores, Albert Calmette e Jean-Marie Camille Guérin, como uma tentativa de obter suspensões homogêneas (sem aglomeração) nas culturas de um bacilo *M. bovis*, isolado por Nocard de uma novilha com mastite em 1902, no Instituto Pasteur de Paris (CHUNG et al, 2001). Calmette, acidentalmente obteve um organismo atenuado, após passagens *in vitro* da amostra de *M. bovis* através do cultivo das culturas em batata impregnada em bile de boi, e Guérin, seu assistente, observou que após 231 passagens *in vitro* da amostra de *M. bovis*, durante 13 anos, ocorriam alterações na morfologia das colônias e perda gradual da virulência, até falharem em provocar tuberculose progressiva quando injetadas em porcos da índia (cobaias), coelhos, camundongos, bovinos e cavalos (SAKULA et al, 1983). Estas culturas não perderam a morfologia agregada, mantiveram as mesmas propriedades físicas e continuaram exibindo imunogenicidade em modelos experimentais, como chimpanzés, cobaias, camundongos e bovinos (GUPTA & KATOCH, 2009).

A vacina BCG está contra indicada para pacientes com HIV, recém-nascidos com peso menor que dois quilogramas, pacientes imunocomprometidos, ou que apresentam alguma infecção cutânea grave, aqueles que estão submetidos a algum tratamento prolongado com esteróides ou drogas imunossupressoras e doenças infecciosas como sarampo e varicela, mulheres grávidas e pessoas com prova de PPD positivo. Para os indivíduos HIV positivos, com ausência de sinais clínicos, a vacinação não é considerada uma contra indicação (PAUL & FINE 2001). Várias estratégias estão sendo testadas para a obtenção de novas vacinas para a TB. A melhora da imunogenicidade da vacina BCG, mesmo apresentando uma baixa eficácia, representa uma abordagem promissora, uma vez que esta vacina apresenta grande segurança farmacológica (BEHAR et al 1999). Mas apesar dos vários estudos demonstrando o potencial de várias proteínas para constituir uma nova vacina, nenhum deles conseguiu ultrapassar significativamente os níveis de proteção induzidos pela própria BCG quando desafiados pelo *M. tuberculosis* no modelo murino. Desta maneira o nosso grupo construiu uma vacina que combinou as porções imunogênicas (epítomos dominantes) de diversos antígenos que já se mostraram protetores individualmente.

Para implementar uma vacina, a sua patogenicidade deve ser testada em modelos animais, assim como a sua ação imunogênica deve ser testada utilizando uma cepa virulenta ou de rua. Sendo assim, é importante o estudo da patogenia da vacina BCG recombinante e do *Mycobacterium bovis* isolado estado de Goiás.

## 2. OBJETIVO

Avaliar a patogenia do *Mycobacterium bovis* isolado de bovinos em Goiás e da vacina BCG recombinante, via contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em camundongos BALB/c.

## 3. METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- IPTSP da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, utilizando camundongos BALB/c fêmeas, que foram mantidos sob condições estabelecidas pelo Colégio brasileiro de Experimentação animal.

Primeiramente cultivamos o *Mycobacterium bovis* isolado no estado de Goiás em meio Middlebrook 7H9, as culturas foram incubadas a 37°C e agitadas continuamente por 30 dias e então foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min a 4°C. Os pellets foram lavados duas vezes com PBS 1X, ressuspensos em Glicerol 10% e as alicotas foram armazenadas a -80°C até o uso.

Para avaliar a patogenia da vacina BCG recombinante foram utilizados 17 camundongos que foram divididos em 2 grupos. O grupo 1, composto de 12 camundongos inoculados via intra peritoneal com 200µL da vacina BCG recombinante que expressa os epítomos dominantes de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* e o grupo 2 (controle), composto por 5 camundongos inoculados com salina 0,9 % via intra peritoneal. Os camundongos do grupo 1 foram sacrificados com 7, 14, 21 e 30 dias após a infecção para obtenção de Baço e Fígado para processamento e plaqueamento em Agar Müller Hinton 7H11 para determinação das Unidades Formadoras de Colônias - UFC. Para fazer o plaqueamento os órgãos foram triturados e homogeneizados em 1mL de PBS1x, e diluídos a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ . Cem microlitros de cada diluição foram plaqueados em meio 7H11 e observados durante 40 dias. Os animais do grupo 2 controle foram sacrificados com 30 dias após a infecção, com o intuito de verificar a integridade dos órgãos.

A patogenia do isolado de *Mycobacterium bovis* foi avaliada em 2 grupos experimentais: Grupo A contendo 11 camundongos inoculados por via intra peritoneal com 250µL ( $3,9 \times 10^4$  CFU) de *M. bovis* isolado no estado de Goiás e Grupo B controle contendo 4 camundongos inoculados com glicerol 10%. Os animais do grupo A foram sacrificados com 1, 3, 7 e 14 dias após a infecção para obtenção de Baço e Fígado para processamento e plaqueamento em Agar Müller Hinton para determinação da UFC. Para fazer o plaqueamento os órgãos foram triturados e homogeneizados em 1mL de PBS1x , e diluídos a  $10^{-1}$  ,  $10^{-2}$  . Cem microlitros de cada diluição foram plaqueados em meio 7H11 e observados durante 21 dias. Os animais do grupo B controle foram sacrificados com 30 dias após a infecção.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os camundongos infectados com *Mycobacterium bovis* perderam peso, apresentaram pelo eriçado e em todos foi observado hepatomegalia e esplenomegalia. Estes camundongos obtiveram uma média de  $9 \times 10^2$  Unidades Formadoras de Colônias no baço, no primeiro dia após a infecção (FIGURA 1). Três dias após a infecção a média foi de  $9 \times 10^4$  UFC, sete dias após houve um decréscimo na média ( $1,6 \times 10^4$  UFC) e com quatorze dias a quantidade de bactérias no baço voltou a aumentar ( $1 \times 10^5$  UFC). No fígado encontramos a média de  $1,5 \times 10^2$  UFC no primeiro dia após a infecção, três dias após, a média foi de  $1,72 \times 10^5$ . Já no sétimo dia houve (assim como no baço) um decréscimo na média que foi igual a  $1,7 \times 10^2$  UFC. E com quatorze dia também houve um aumento da média ( $3,3 \times 10^4$  UFC).

Nos camundongos BALB/c, infectados com a vacina BCG recombinante , não houve como contar a UFC, pois não houve crescimento.

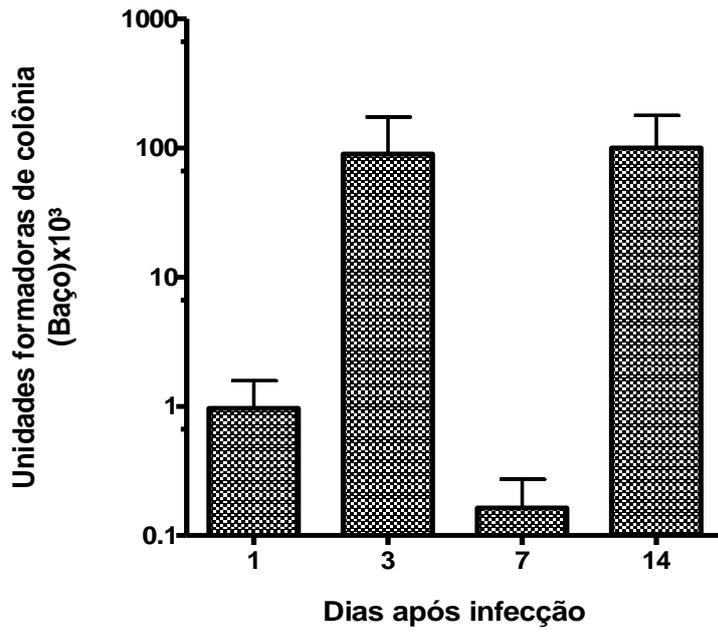


FIGURA 1 – Número de unidades formadoras de colônias do baço de camundongos BALB/c (log 10) após 1, 3, 7 e 14 dias de inoculação intraperitoneal com  $3,9 \times 10^4$  UFC de *Mycobacterium bovis*.

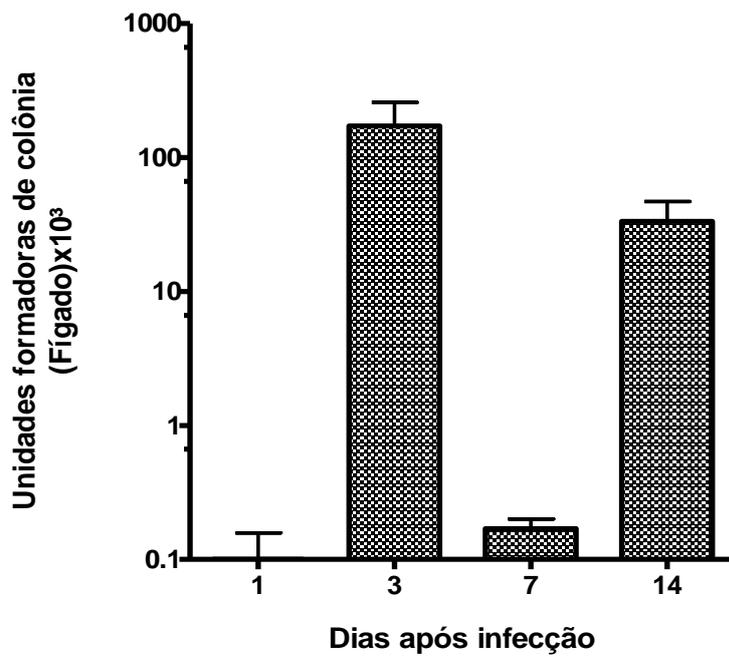


FIGURA 2 – Número de unidades formadoras de colônias do fígado de camundongos BALB/c após 1, 3, 7 e 14 dias de inoculação intraperitoneal com  $3,9 \times 10^4$  UFC de *Mycobacterium bovis*.

FERREIRA NETO et al. (1994) avaliaram quantitativamente a concentração de micobactérias em órgãos de hamsters experimentalmente infectados via intraperitoneal com *Mycobacterium bovis* e obtiveram que 1 dia após a infecção o baço albergou um maior número de bactérias que o fígado e houve grande perda de peso, assim como nosso trabalho.

A diminuição de micobactéria nos órgãos a partir do sétimo dia pode estar relacionada com a ativação da resposta imune adaptativa ou com a baixa patogenia deste isolado quando inoculado em camundongos. FLYNN & CHAN (2001) mostraram que em camundongos, uma semana após a infecção com *M. tuberculosis*, o número de linfócitos TCD4+ e TCD8+ aumenta nos linfonodos associados ao pulmão, demonstrando que as duas células envolvidas devem atuar nas fases iniciais da infecção.

Com quatorze dias após a infecção o número de bacilos voltou a aumentar nos dois órgãos (baço e fígado) demonstrando que a resposta imune inata dos camundongos não foi capaz de conter o bacilo. Embora poucos trabalhos tenham estudado a patogenia de *M. bovis* em camundongos, FERREIRA NETO et al. (1994) em seu trabalho com hamsters afirma que estes animais quando inoculados com *M. bovis* vieram a óbito após uma média 50,6 dias após a infecção. Nesse primeiro momento nosso grupo avaliou somente a fase aguda da infecção, mas continuaremos o nosso trabalho avaliando também após quatorze dias, para melhor caracterização da patogenia do *M. bovis* isolado no estado de Goiás.

Desde 1993, esforços globais para combater a tuberculose concentraram-se principalmente no desenvolvimento de novas drogas para a redução do tempo de tratamento e novas vacinas mais eficientes. Nolan & Lamichhane (2010) demonstraram que a vacina BCG recombinante expressando L, D-transpeptidase é pelo menos tão eficiente quanto a BCG. Porém nenhuma vacina até momento foi capaz de gerar uma proteção mais eficaz que a vacina BCG.

Após a distribuição da vacina BCG por todo o mundo, esta vacina foi preservada pela subcultura e adoção do sistema lote-semente. Durante este período, diferentes Cepas de BCG, agora conhecidas como filhas das cepas BCG original, foram descritas.

Durante a diversificação, algumas cepas filhas perderam regiões genéticas que afetam o seu conteúdo antigênico e talvez sua eficácia protetora. Estudos têm sido realizados no intuito avaliar a proteção destas, como o de CASTILLO-RODAL et al. (2006) que avaliou a proteção de dez diferentes cepas de BCG contra *M. tuberculosis* em camundongos, encontrando a média de 5,71 Log<sub>10</sub> UFC no pulmão após dois meses de infecção, quatro meses após a infecção a média foi de 6,08 Log<sub>10</sub> UFC demonstrando um aumento de *M. tuberculosis* nos pulmões, mesmo quando vacinados. E encontraram também que a UFC foi menor em camundongos vacinados com as cepas BCG Birkhaug e BCG Phipps. Porém não encontramos trabalhos que tenham verificado através da contagem de unidades formadoras de colônias, a patogenia das diferentes cepas de BCG antes do desafio com a micobactéria, não tendo então como comparar o nosso resultado da patogenia da vacina recombinante.

A ausência da vacina BCG recombinante nos órgãos avaliados depois da infecção intraperitoneal pode indicar ausência total de virulência desta vacina após a transformação *in vitro*. Para confirmar esta hipótese, pretendemos inocular camundongos com a cepa de BCG original e a transformada para podermos compará-las.

Conclui-se que o *Mycobacterium bovis* é virulento e patogênico para camundongos BALB/c, e estes não conseguem conter a infecção aguda. A vacina BCG recombinante parece ter perdido a virulência e não foi patogênica para os camundongos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P.V.; MÉNDEZ, M.D.C.; SHILD, A.L. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, **11**(3/4):81-6, 1991

BEHAR, S. M.; DASCHER, C. C.; GRUNSBY, M. J.; WANG, C. R.; BRENNER, M. B. Susceptibility of mice deficient in CD1d or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York. v.189, p.1973-1980, 1999.

BELCHIOR, A. P. C. **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais**, Brasil. 2001. 55f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BENÉVOLO-DE-ANDRADE, T.C.; MONTEIRO-MAIA, R.; COSGROVE, C; CASTELLO-BRANCO, L.R.R. BCG Moreau Rio de Janeiro - An oral vaccine against tuberculosis – Review, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100(5), p.459-465, 2005

CASTILLO-RODAL, A.I.; CASTAÑON-ARREOLA, M.; HERNÁNDES-PANDO, R.; CALVA, J.J.; SADA-DÍAZ, C.E.; LÓPEZ-VIDAL, Y. *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis, **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 74, p. 1718–1724, 2006.

CHUNG, K.T.; BIGGERS, C.J. Albert Léon Charles Calmette (1863-1933) and the Antituberculous BCG Vaccination, **Perspectives in Biology and Medicine**, Chicago v.44.3, p.379-389, 2001.

FERREIRA NETO, J. S; PINHEIRO, S. R; MORAIS, Z. M; SINHORINI, I. L; ITO, F. H; VASCONCELLOS, S. A. Quantitative evaluation of mycobacterial concentration in organs and fluids of experimentally infected hamster with *Mycobacterium bovis*, strain AN 5, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** , v.31(2), p.131-9, 1994.

GUPTA, U.D.; KATOCH, V.M. Animal models of tuberculosis for vaccine development, **Indian Journal Medical Research**, Nova Delhi, 129, pp 11-18, 2009.

LAGE, A.P., ROXO, E., MULLER, E.E. POESTER, CAVALLÉRO, F.P.V., MAUAD, J.C. FERREIRA NETO, J.S., MOTA, P.M.P.C., GONÇALVES, V.S.P. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, DF: MAPA/SDA/DSA, 1.ed. Brasília, DF, 2006. 188p.

NOLAN, S.T.; LAMICHHANE, G. Protective Efficacy of BCG Overexpressing an L,D-Transpeptidase against *M. tuberculosis* Infection. **PLoS One**, v.5(10), 2010.

OTTENHOF, T.H.; KUMARARATNE, D.; CASANOVA, J.L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunology Today**, Cambridge, v.19, p.491-494, 1998.

PAUL E, FINE M 2001. BCG: The Challenge Continues. **Scand Journal Infect Disease**; 33: 243-245.

SAKULA, A. BCG: who were Calmette and Guérin? **Thorax**, London, v.38, p.806-812, 1983.

THOEN, C.; LOBUE, P.; KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis, **Veterinary Microbiology**, v.112 p.339-345 , 2006.