

# DADOS PRELIMINARES SOBRE UMA VACINA VIVA CONTRA A LINFADENITE CASEOSA<sup>1</sup>

ORLANDO CAVALCANTE RIBEIRO<sup>2</sup>, JOSÉ ARTHUR HAGE DA SILVA<sup>2</sup>,  
SÉRGIO COSTA OLIVEIRA, ROBERTO MEYER<sup>3</sup> e GILÊNIO BORGES FERNANDES<sup>4</sup>

**RESUMO** - Com o objetivo de desenvolver uma vacina viva com a cepa 1002 do *Corynebacterium pseudotuberculosis*, foram realizados experimentos iniciais com preparados deste microrganismo. Tal cepa naturalmente pouco virulenta foi atenuada através de cultivo durante sete dias em estufa a 37°C. Esta vacina foi inicialmente testada quanto à inocuidade e quanto à dose adequada, após o que, o experimento de campo foi realizado. Este experimento consistiu em três tratamentos: doze caprinos vacinados com a vacina viva; doze caprinos vacinados com a vacina morta, e doze caprinos vacinados com solução salina 0.15 M. Os resultados preliminares deste experimento evidenciam que tal vacina induz uma resposta humoral específica e um percentual significativo de imunoproteção. Tais resultados foram confrontados com os obtidos com uma vacina morta, anteriormente desenvolvida com esta mesma cepa.

Termos para indexação: caprinos, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

## PRELIMINARY RESULTS ON A LIVING VACCINE AGAINST CASEOUS LYPHADENITIS

**ABSTRACT** - In order to develop a live vaccine of the strain 1002 of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, initial experiments were carried out with preparations of this microorganism. This strain, naturally of low virulence, was further attenuated in a 7-day thermic (37°C) treatment. This vaccine was first tested as to innocuousness and dose adequacy after which the field experiment was made. This experiment consisted of three treatments: twelve goats vaccinated with the live vaccine, twelve vaccinated with the dead vaccine and 12 inoculated with a 0.15 M saline solution. The preliminary results of this experiment show that the living vaccine induced a humoral response and a significant immunoprotection level. These results were compared with the data obtained from dead vaccine.

Index terms: goats, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

## INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa, comumente chamada de mal-do-carço ou falsa-tuberculose, é uma doença que acomete ovinos e caprinos e tem como agente etiológico o *Corynebacterium ovis* (Jolly 1965). A enfermidade causa sérios

prejuízos a essas espécies, constituindo, mesmo, uma limitação zootológica às suas explorações.

Numerosas têm sido as tentativas de vacinação; entretanto, todas elas evidenciam apenas resultados insatisfatórios no que diz respeito aos índices de imunoproteção conseguidos em caprinos, segundo Nairn et al. (1982), Cameron & Minnaar (1969), Cameron & Engelbrecht (1971), Cameron et al. (1972), Cameron & Fuls (1973), Nairn et al. (1977), Cameron & Bester (1984), Anderson & Nairn (1984), Brown et al. (1986) e, entre outros, realizaram experimentos com *C. pseudotuberculosis* viva ou morta, com ou sem adjuvantes

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 25 de outubro de 1990

<sup>2</sup> Méd.-Vet., Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia S.A. (EPABA), Caixa Postal 1222, CEP 40210 Salvador, BA.

<sup>3</sup> Médico, Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (ICS-UFBA).

<sup>4</sup> Eng.-Agr., M.Sc., EPABA.

e com o toxóide. Nestes experimentos, os melhores resultados obtidos foram com ovinos e camundongos, o mesmo não ocorrendo com caprinos.

O presente trabalho apresenta os primeiros resultados de experimentos realizados com uma vacina viva, sem adjuvantes, desenvolvida a partir da cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis*, naturalmente de baixa virulência. Esta cepa já vinha sendo utilizada num preparado inativado pela formalina, ao qual se adicionava fosfato de alumínio como adjuvante (vacina morta). Tais experimentos consistiram no teste de inocuidade, de melhor dose, de indução de anticorpos específicos e, finalmente, da confrontação entre "vacina viva" e "vacina morta", em ensaios *in vivo* finalizados pelo "desafio" e necrópsia dos animais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo das vacinas

Cepa 1002 - Esta cepa foi isolada em 1971, no município de Curaçá, BA, a partir de material caseoso extraído de abscessos de caprinos.

Cultivo do microrganismos - O cultivo foi realizado em caldo de triptose enriquecido com lactalbumina e extrato de levedura, e em ágar-triptose contendo o mesmo enriquecimento, seguindo-se as seguintes etapas: para a vacina viva, foram cultivadas inicialmente as bactérias em caldo, por 48 horas, a 37°C. Em seguida, foram expandidas as culturas em garrafas de Roux, nestas mesmas condições, e posteriormente foram cultivadas novamente em caldo, por sete dias, a 37°C. Após este período de tempo, as bactérias vivas foram expandidas em garrafas de Roux, por 48 horas, a 37°C, e em seguida, repicadas em caldo, nestas mesmas condições. Para o preparo da vacina morta, após a expansão inicial em garrafas de Roux, foram transferidas estas bactérias para balões com caldo, por 48 horas, a 37°C. Procedeu-se, então, à inativação com formalina a 5%, seguida de repouso durante sete dias, à temperatura ambiente. Finalmente, adicionou-se fosfato de alumínio como adjuvante.

Confirmação de viabilidade das culturas atenuadas - O teste de viabilidade foi feito pelo método de vazamento em placas, após diluição decimal. Assim, diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  eram semeadas em ágar-

sangue de coelho com alça-de-drigalski (48 horas, 37°C).

Determinação de inocuidade - O teste de inocuidade foi realizado em quatro caprinos, nos quais se inocularam  $2 \times 10^4$  CFU, via intradérmica.

Determinação da dose imunogênica - Inicialmente, utilizou-se como parâmetro a indução de resposta humoral específica contra *C. pseudotuberculosis*, medida pelo teste ELISA. Nestes experimentos foram utilizados cinco grupos de quatro caprinos, inoculados com doses de  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  CFU, respectivamente, além de um grupo-controle não-inoculado, com quatro animais.

### Experimentos com as vacinas viva e morta

Animais - Foram utilizados caprinos hígdos, com quatro a seis meses de idade, mantidos na Estação Experimental de Carabas, Jaguari, Ba.

Grupos e tratamento experimental - Trinta e seis caprinos sorologicamente negativos para *C. pseudotuberculosis* foram divididos em três grupos de doze animais, designados por 1, 2 e 3, os quais foram vacinados com vacina viva, vacina morta e solução salina, respectivamente.

Dos animais dos grupos 1 e 2, seis receberam uma dose, e outros seis receberam duas doses das respectivas vacinas, com intervalo de trinta dias. O desafio foi realizado seis meses após a última vacinação, inoculando-se 100 ml de uma suspensão a 0,7% (v/v) de bactérias vivas, repicadas por 48 horas, a partir de material caseoso extraído de abscessos, em dois pontos da região ingüinal. O sacrifício e a necrópsia foram realizados três meses após o desafio. Os abscessos encontrados através de necrópsia foram removidos, e os seus conteúdos, cultivados em ágar-sangue. Provas bioquímicas de rotina foram realizadas para a identificação dos microrganismos isolados.

Análise dos resultados - Os resultados obtidos foram submetidos ao teste do qui-quadrado e ao teste exato de Fisher.

### Monitoramento sorológico

Os animais dos grupos de experimentação da vacina viva, morta e controle foram acompanhados sorologicamente ao longo de seis meses, com coleta mensal de soro.

A sorologia foi feita pelo ensaio imunoenzimático "ELISA", a seguir descrito resumidamente: Em placas de poliestireno previamente sensibilizadas com sobrenadante de cultura de *C. pseudotuberculosis* em

BHI (fonte de exotoxina) diluído a 1:10 com tampão carbonato-bicarbonato 0,051 M, pH 9,6 e bloqueadas com PBS - leite desnatado a 5%, foram incubadas amostras dos soros-testes e seus controles em diluições de 1:100, durante uma hora, a 37°C, em câmara úmida. Após três lavagens (5 min) com PBS-tween, acrescentou-se antissoro anti-IgG caprino, conjugado com peroxidase, diluído 1:1000, e deixado em incubação durante 45 min, a 37°, em câmara úmida. Após nova lavagem como a anterior, acrescentou-se a solução reveladora contendo fosfato dibásico de sódio 4 mM, ácido cítrico 1 mM, interrompeu-se a reação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 n, e fez-se a leitura em leitor automático de "ELISA" com filtro de 492 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de inocuidade - A necrópsia dos quatro animais, realizada seis meses após a inoculação, seguida de minucioso exame anátomo-patológico, não revelou abscessos ou outras lesões que sugerissem crescimento ou disseminação da *C. pseudotuberculosis*.

Determinação da dose imunogênica - Em todos os cinco grupos de caprinos utilizados neste experimento foram observados através do teste "ELISA", ao longo de quatro meses, valores de densidade óptica que atingiram cerca de quatro vezes mais que o observado no grupo-controle. A Fig. 1 ilustra os resultados médios obtidos nos animais que foram vacinados com 2 x 10<sup>4</sup> CFU. Os animais que receberam doses a partir de 3 x 10<sup>4</sup> CFU desenvolveram, na sua maioria, abscessos no local da inoculação.

Os resultados dos grupos de experimentação da vacina viva, morta e controle, apresentados na Fig. 2, demonstram que os animais vacinados com a vacina viva e morta foram estimulados a produzir anticorpos contra estes preparados, em níveis muito mais elevados que os animais do grupo-controle, sendo a vacina morta capaz de induzir um estímulo ainda maior do que a vacina viva.

Os resultados obtidos após minucioso exame anátomo-patológico dos animais dos grupos 1, 2 e 3 e apresentados na Fig. 3 demonstram que no grupo 1 o percentual de caprinos

que não desenvolveram abscessos característicos a Linfadenite caseosa após o desafio foi duas vezes maior do que o do grupo 2, e três vezes maior do que o do grupo 3, o grupo-controle.

Os resultados apresentados, apesar de preliminares, são sugestivos de que a vacina viva preparada com microrganismos da cepa 1002, envelhecidos por sete dias, e uma dose baixa (2 x 10<sup>4</sup> CFU), é capaz de induzir um percentual de imunoproteção de cerca de 83,3%,

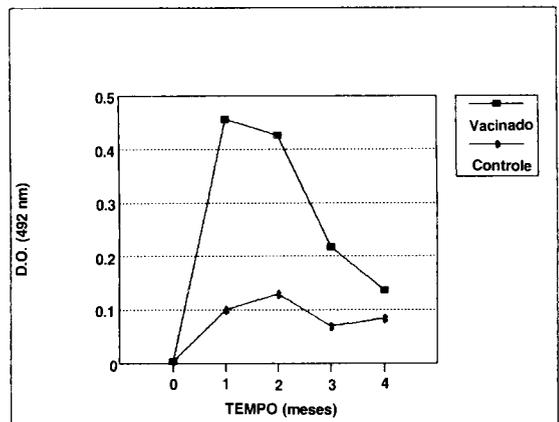


FIG. 1. Valores de densidade óptica (médias) mensurados por "ELISA", a partir de amostras de soros de animais vacinados com 2 x 10<sup>4</sup> CFU de *C. pseudotuberculosis* e de animais-controles.

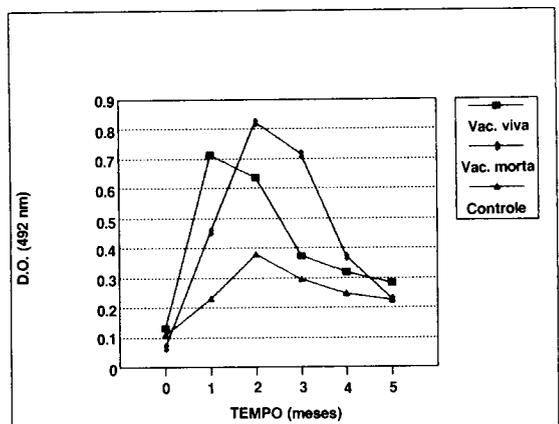
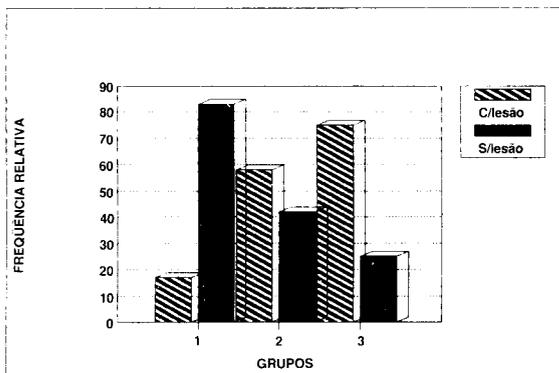


FIG. 2. Valores de D.O. (médias) mensuradas por "ELISA" em amostras de soros de animais com a vacina viva, vacina morta e animais-controles.



**FIG. 3.** Percentual de animais que apresentavam abscessos ou lesões causadas por *C. pseudotuberculosis*, confrontados com os animais que não se infectaram. 1, 2 e 3, grupos experimentais, respectivamente vacina viva, viva morta e controle.

contra 41,6% induzido pela vacina morta e 25% observado no grupo-controle. Estes resultados indicam a vantagem da utilização como vacina, da *C. pseudotuberculosis* viva ao invés da inativada. A vacina viva estimula, aparentemente, menos resposta por anticorpos (Fig. 2) que a vacina inativada, provavelmente por esta estar associada à adjuvante. A resposta humoral contra estes microrganismos parece não contribuir de modo decisivo para a sua eliminação (Cameron 1982). Em experimentos envolvendo preparados vivos, Cameron & Fuls (1973), Brogden et al. (1984) e Garg & Chandiramani (1985) evidenciaram resultados irregulares ou mesmo indesejáveis quando confrontados com os obtidos neste trabalho, ou seja, formação de abscessos nos locais de inoculação, e/ou doença clínica (Cameron & Bester 1984).

Os resultados aqui apresentados com a vacina viva são promissores, especialmente quando confrontados com os obtidos com a vacina morta, uma vez que comprovam sua inocuidade e proteção ao desafio com inóculo virulento.

Novos experimentos, com amostras bem maiores, buscando esclarecer ou definir alguns outros aspectos ou parâmetros que envolvem a

sua utilização em larga escala como vacina, são indicados.

## CONCLUSÕES

1. A presença, ou não, de animais com lesões nos grupos experimentais foi influenciada pelo tratamento ministrado, verificando-se um número menor de animais com lesões no grupo vacinado.
2. Dentre os grupos vacinados, aquele que recebeu a vacina viva apresentou menor incidência de lesões.

## AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Samuel Tenório de Albuquerque, Antônio Serafim, Frederico de Medeiros e Antônio Vicente da S. Dias pela colaboração na condução do trabalho; ao Dr. Vasco Neto e aos pesquisadores da EMBRAPA, Dr. Jerome Langenegger e Dra. Charlotte Langenegger, pelos testes efetuados; ao Dr. Eugene Johnson, pela orientação na supervisão do projeto; aos técnicos e auxiliares da EPABA e ICS-UFBA; ao auxiliar de laboratório Carlos César Oliveira de Carvalho, pelo acompanhamento em todos os segmentos do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, V.M.; NAIRN, M.E. II. Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In: LES MALADIES de la chievre. [S.l.]: Ed. INRA publ., 1984. p.605.
- BROGDEN, K.A.; CUTLIP, R.C.; LEHMKUHE, H.D. Comparison of protection induced in lambs by *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell and cell wall vaccines. **American Journal Veterinary Research**, v.45, p.2393-2395, 1984.
- BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; BIBERSTEIN, F.L.; MORSE, A. Use of a toxoide vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *C. pseudotuberculosis*. **American Journal Veterinary Research**, v.47, n.5, p.119, 1986.

- CAMERON, C.M. The immunogenicity of *C. pseudotuberculosis*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS PRODUCTION AND DISEASE. 1982, Tucson, Arizona. **Proceedings**. Arizona, USA: [s.n.], 1982. p.458-466.
- CAMERON, C.M.; BESTER, F.B. An improved *C. pseudotuberculosis* vaccine for sheep. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.51, p.263, 1984.
- CAMERON, C.M.; ENGELBRECHT, M. Mechanism of immunity to *C. pseudotuberculosis* in mice using inactivated vaccine. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.38, p.73-82, 1971.
- CAMERON, C.M.; FULS, W.J.P. Studies on the enhancement of immunity to *C. pseudotuberculosis*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.40, p.105-114, 1973.
- CAMERON, C.M.; MINNAAR, J.L. Immunization to mice against *C. pseudotuberculosis* infection. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.36, n.2, p.207-210, 1969.
- CAMERON, C.M.; MINAAR, J.L.; ENGELRETH, M.; PURDOM, M. Immune response of Merino sheep to inactivated *C. pseudotuberculosis* vaccine. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.39, n.1, p.11-24, 1972.
- GARG, D.N.; CHANDIRAMANI, N.K. Cellular and humoral immune responses in sheep experimentally injected with killed and live *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Zentralblatt fur Bakteriologie und Hygiene**, v.260, p.117-125, 1985.
- JOLLY, R.D. The pathogenesis of experimental *C. ovis* infection in mice. **New Zealand Veterinary Journal**, v.13, p.141-147, 1965.
- NAIRN, M.E.; ROBERTSON, J.P.; MCQUADE, M.C. The control of caseous in sheep by vaccination. In: ANNU. CONF. AUST. VET. ASSOC., 54., 1977, Sidney, Australia. **Proceedings**. Sidney, Australia: Australia Veterinary Association, 1977.
- NAIRN, M.E.; ROBERTSON, J.P.; MIDDLETON, H.D.; MCQUADE, M.C. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3. **Proceedings**. [S.l.:s.n.], 1982. p.455.