

## AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOPROTETOR DE DIFERENTES VACINAS CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAPRINOS<sup>1</sup>

DENISE C. CARVALHO<sup>2</sup>, ROBERT SCHAEER<sup>2</sup>, CLAUDIA BRODSKYN<sup>2</sup>  
IVANA L. O. NASCIMENTO<sup>2</sup>, SONGELI FREIRE<sup>2</sup> e ROBERTO MEYER<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Carvalho D. C., Schaer R., Brodskyn C., Nascimento I.L.O., Freire S. & Meyer R. 1990. [Levels of immunoprotection induced in goats against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using several types of vaccines.] Avaliação do efeito imunoprotetor de diferentes vacinas contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 10(3/4):59-62. Lab. Imunologia e Biologia Molecular, Inst. Ciênc. Saúde, UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Campus Universitário do Canela, 40140 Salvador, Bahia, Brazil.

In order to evaluate the immune response of goats against *Corynebacterium pseudotuberculosis*, 23 groups, comprising 196 animals, were immunized with several antigenic preparations obtained from the bacteriae, at different time intervals, and using various kinds of adjuvants. The results indicated that the rate of immunoprotection in the immunized animals challenged after 120 days was below 60%. The animals challenged between 8 and 10 months showed protection levels ranging from 44.5 to 22.3%. The lowest rate of incidence of the disease appeared in the animals challenged between 30 and 60 days after the last immunization.

**INDEX TERMS:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ovis*, Caseous lymphadenitis, immunoprotection, goats.

**SINOPSE.-** Com o objetivo de observar a imunoproteção desenvolvida em caprinos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* esses animais foram submetidos a diferentes esquemas de imunização, sendo utilizados inóculos de diferentes preparados antigênicos desta bactéria em intervalos de tempo variados e com diversos adjuvantes. Os resultados revelaram que o percentual de imunoproteção nos animais imunizados e desafiados 180 dias após estava abaixo de 60%. Já os animais desafiados dez meses após a primeira inoculação apresentaram níveis de imunoproteção entre 44,5 e 22,3%. O menor índice da doença foi observado nos animais desafiados entre 30 e 60 dias após a última inoculação do preparado antigênico.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ovis*, linfadenite caseosa, imunoproteção, caprinos.

### INTRODUÇÃO

Há muito que se busca uma vacina contra linfadenite caseosa que induza uma significativa imunoproteção. Várias tentativas tem sido feitas nesse sentido, em caprinos, ovinos e camundongos (Cameron & Fuls 1973, Cameron 1982, Nairn 1982), com resultados pouco consistentes. Anticorpos contra a exotoxina ou antígenos somáticos deste microrganismo parecem não ser importantes para combater a infecção (Cameron 1982, Garg & Chandirmani 1985). Vários tem sido os antígenos utilizados tais como bactéria inteira, viva ou morta, parede celular (Brogden et al. 1984) e toxoide obtido a partir de exotoxi-

nas (Nairn et al. 1977, Brown et al. 1986). Também foram feitas tentativas no sentido de potencializar a indução de imunização com uso de diferentes adjuvantes (Cameron & Bester 1984, Brogden et al. 1985) e de BCG (Barafat 1979). Ensaios realizados com a vacina contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* desenvolvida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia (EPABA) utilizando-se a cepa 1002 (ou "Curaça"), mostraram percentuais de proteção em torno de 80% (Ribeiro 1983, comunicação pessoal). O monitoramento da cinética de produção de anticorpos anti *C. pseudotuberculosis* em animais imunizados com esta vacina mostrou que ela era capaz de induzir títulos elevados de anticorpos específicos (Pinheiro et al. 1988).

O presente trabalho relata os resultados obtidos quando se testou a vacina anteriormente mencionada bem como outros preparados antigênicos, utilizando-se a mesma cepa (1002).

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados caprinos com idade a partir de 6 meses, clinicamente sadios, com sorologia negativa para *Corynebacterium pseudotuberculosis* (testado através do ensaio imunoenzimático - ELISA). Os animais foram mantidos em cativeiro na Escola de Medicina Veterinária e no Instituto de Ciências da Saúde e em criação extensiva na Fazenda Experimental de Itiuba da EPABA.

Foram utilizados os seguinte preparados antigênicos descritos abaixo:

A Vacina da EPABA constituída por *C. pseudotuberculosis*

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 4 de janeiro de 1989.

<sup>2</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Campus do Canela, 40140 Salvador, Bahia.

(cepa 1002) cultivada em caldo triptose com extrato de levedura e lactalbumina), inativada em formol a 5% na concentração de 0,65% (volume de massa bacteriana/volume de suspensão); a esta suspensão é adicionado fosfato de alumínio na proporção 1:1, sendo a dose recomendada 6,0 ml por via subcutânea. Outros inóculos foram preparados a partir da suspensão bacteriana inativa em formol: a) sem a adição do fosfato de alumínio; b) lavando-se e ressuspensando-se a massa bacteriana em solução salina 0,85% (SS); c) com a concentração da massa bacteriana duas vezes maior (1,3% v/v); d) substituindo o fosfato de alumínio por Adjuvante Completo de Freund.

A parede bacteriana, obtida a partir da massa bacteriana quebrada em ultra-som foi centrifugada a 3.000 g por 10 min., o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 10.000 g por 30 min.; o precipitado foi ressuspenso em solução salina tamponada (PBS). Utilizou-se também como antígeno o sobrenadante obtido após a centrifugação a 3.000 g. Em ambos os casos ajustou-se o inóculo para conter 1,0 mg de proteína e procedeu-se a inoculação utilizando-se fosfato de alumínio como adjuvante.

O BCG, sob a forma de Preparado comercial (CEME - Rio de Janeiro, Brasil), utilizado na dose de 0,1 ml por animal. Extratos bacterianos obtidos através de tratamento da massa bacteriana com os detergentes sódio dodecil sulfato (SDS) ou deoxicolato de sódio (DOC), em concentração de 0,5% em PBS. Tal mistura era deixada por 2h a temperatura ambiente com agitações freqüentes. Após centrifugação, o sobrenadante era dialisado repetidas vezes contra SS e ajustado para 1,0 mg de proteína por inóculo. Usou-se como adjuvante o fosfato de alumínio.

A pesquisa foi realizada utilizando-se um total de 196 animais envolvendo os seguintes experimentos:

Nos experimentos 1 a 6, cinco animais por grupo, os animais foram imunizados com a vacina da EPABA com ou sem meio de cultura e adjuvante; com BCG e *C. pseudotuberculosis*, viva, patogênica e o grupo controle com SS.

Nos experimentos 7 a 10, nove animais por grupo, os animais foram imunizados com a vacina da EPABA; com inóculo constituído por parede bacteriana; com cultura de *C. pseudotuberculosis* inativada em formol, lavada e ressuspensa em SS, e o grupo controle somente com SS.

Nos experimentos 11 a 23, dez animais por grupo, foram feitos novos ensaios com a vacina da EPABA e com a massa bacteriana inativada em formol modificando-se os intervalos de inoculação e o uso ou não de adjuvantes; também foram utilizados preparados antigênicos obtidos através da quebra da massa bacteriana com ultra-som e através do tratamento com detergentes (SDS e DOC). Nestes experimentos os animais foram mantidos em regime de criação extensiva na fazenda da EPABA.

A vacina foi sempre inoculada por via-cutânea. Os quadros 1 e 2 apresentam maiores detalhes a respeito dos inóculos utilizados, dos períodos de inoculação e dos resultados obtidos.

Os desafios foram realizadas colocando-se 50 µl de uma suspensão a 0,7% de bactéria, obtida de cultura em caldo triptose com 48 horas de incubação, sobre a pele escarificada, em dois pontos da região inguinal.

Quadro 1. Caracterização dos grupos de caprinos utilizados na experimentação controlada e resultados da imunoproteção

Experi- mento	Nº de animais	Vacinação (dias)					Vacina	Desafio (período) <sup>a</sup>	Resultados (Índice de proteção, %)
		0	15	30	60	180			
1	5	+		+	+		Vacina (EPABA)	120	40
2	5	+	+ <sup>b</sup>				BCG e HBCG + <i>C. pseudotuberculosis</i>	165	0
3	5	+		+	+		<i>C. pseudotuberculosis</i> c/ meio de cultura a 1,3% V/V + fosfato de alumínio	120	20
4	5	+		+	+		<i>C. pseudotuberculosis</i> c/meio de cultura a 0,65% V/V sem adjuvantes	120	60
5	5	+		+	+		<i>C. pseudotuberculosis</i> lavada e ressuspensa em salina a 0,65% V/V + fosfato de alumínio	120	40
6	5						Controle, sem tratamento	180 <sup>c</sup>	20
7	9	+			+		Vacina (EPABA)	240	45,5
8	9	+			+		Parede bacteriana 0,65% V/V + fosfato de alumínio	240	22,3
9	9	+			+		<i>C. pseudotuberculosis</i> lavada e ressuspensa em salina 0,6% V/V + fosfato de alumínio	240	33,3
10	9						Controle, sem tratamento	300 <sup>c</sup>	22,3

<sup>a</sup> Dias após a última vacinação.

<sup>b</sup> *C. pseudotuberculosis* viva, atenuada.

<sup>c</sup> Dias após o início do experimento.

Foram realizadas biopsias e necropsias a partir de um mês após o desafio. O material caseoso dos abscessos foi retirado assepticamente e cultivado em gelose sangue, as bactérias isoladas foram caracterizadas por provas bioquímicas. O material para exame histopatológico foi retirado de abscessos em linfonodos, fígado, baço e pulmão, fixado em formol a 10%, submetido aos procedimentos rotineiros para cortes em parafina e corado com hematoxilina-eosina.

## RESULTADOS

O Quadro 1 resume os resultados obtidos com os animais nos experimentos 1 a 6. De 40 a 100% dos animais imunizados com os diferentes inóculos, assim como os do grupo controle, desenvolveram linfadenite caseosa após a agressão realizada 180 dias depois do início do experimento. Os animais imunizados nos experimentos 7, 8, 9 e 10 foram agredidos 10 meses após a primeira inoculação e desenvolveram a doença numa percentagem que variou de 55,5 a 77,7%. O percentual de animais que desenvolveu linfadenite caseosa no experimento de campo variou com o tratamento e a época da "agressão" (Quadro 2). A

identificação bioquímica do microrganismo e o estudo anátomo-patológico do material de biopsia ou de necropsia confirmaram o desenvolvimento da linfadenite caseosa em todos os animais "agredidos" que apresentaram abscessos em linfonodos ou em órgãos internos (pulmão, baço e fígado).

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos 1 e 7 (Quadro 1) com a utilização da vacina da EPABA, constituída pela massa bacteriana inativada em formol junto com o meio de cultura e fosfato de alumínio, não mostraram diferenças significativas daqueles obtidos com o uso da massa bacteriana sem o meio de cultura (experimento 4) ou sem o fosfato de alumínio (experimento 5). Da mesma forma, a utilização de um preparado com maior concentração do antígeno (experimento 3) também não interferiu sobre a resposta apresentada. O mesmo ocorreu quando se utilizou o BCG como estimulante de uma resposta macrofágica inespecífica. Tais conclusões entretanto se limitam à situação específica da agressão após 120 dias da última inoculação. No que se refere aos experimentos 7 a 10, os

Quadro 2. Caracterização dos grupos de caprinos utilizados na experimentação a campo e resultados da imunoproteção

Experi- mento	Nº de animais	Vacinação (dias)					Vacina	Desafio (período) <sup>a</sup>	Resultados (Índice de proteção, %)
		0	15	30	60	100			
11	10	+		+			Vacina (EPABA)	30	70
12	10	+		+			Vacina (EPABA)	60	70
13	10	+		+			Vacina (EPABA)	90	50
14	10	+				+	<i>C. pseudotuberculosis</i> lavada e ressuspensa em salina 0,65% V/V + fosfato de alumínio	90	40
15	10	+				+	<i>C. pseudotuberculosis</i> c/ meio de cultura 0,65% V/V, sem adjuvantes	90	40
16	10	+				+	<i>C. pseudotuberculosis</i> c/ meio de cultura 0,65% V/V + Adjuvante Com- pleto de Freund	30	70
17	10	+		+			<i>C. pseudotuberculosis</i> c/meio de cultura 0,65% V/V + Adjuvante Com- pleto de Freund	30	70
18	10	+				+	Parede bacteriana + Fosfato de Alumínio	30	70
19	10	+				+	Sobrenadante 300 g + Fosfato de Alumínio	30	80
20	10	+				+	Extrato obtido com SDS + Fosfato de Alumínio	30	60
21	10	+				+	Extrato obtido com DOC + Fosfato de Alumínio	30	70
22	10	+				+	Fosfato de Alumínio	90	30
23	10						Controle, sem trata- mento	190 <sup>b</sup>	20

<sup>a</sup> Dias após a última vacinação.

<sup>b</sup> Dias após o início do experimento.

resultados mostram que os percentuais de imunoproteção estão abaixo de 50% em todos os animais desafiados após oito meses da última inoculação. O experimento 8 que recebeu como antígeno a parede bacteriana e o experimento controle (experimento 10) apresentam exatamente o mesmo percentual de infecção, ou seja, 77,7%. Os experimentos 11 a 23 demonstram que a agressão sendo feita entre 30 e 60 dias após a última inoculação, resulta em menor incidência de doença, em decorrência, possivelmente, de uma estimulação inespecífica do sistema mononuclear fagocitário. Isto é particularmente válido para os ensaios realizados com a vacina da EPABA (experimentos 1, 7, 11, 12, 13), onde ocorreram percentuais de imunoproteção superiores a 70%. Após 90 dias os índices caíram para 50% ou menos no terceiro, quarto ou oitavo mês. Esta vacina é entretanto, capaz de induzir uma resposta anticórpica específica contra *C. pseudotuberculosis* com títulos altos e duradouros (Pinheiro et al. 1988). Este fato está de acordo com o observado por alguns autores, em camundongos e ovinos onde, apesar de anticorpos serem produzidos sob determinadas condições em grande quantidade, não são entretanto capazes de induzir imunoproteção (Cameron & Buchan 1966, Cameron et al., 1972, Nairn 1982, Garg & Chandiramani 1985). Os resultados obtidos com as preparações antigênicas semipurificadas (precipitados, sobrenadantes, extratos conseguidos com SDS e DOC), são preliminares e não permitem ainda discussão. Entretanto, estes procedimentos parecem ser uma importante alternativa na busca de componentes capazes de desenvolverem, nos caprinos, uma imunoproteção eficaz contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

#### REFERÊNCIAS

Barrafat A.A. 1985. Immunization against caseous lymphadenitis of sheep

- using attenuated bovine tubercle bacillus of Calmette and Guerin (BCG). Bull. Off. Int. Epizoot. 91 (9/10): 679-683.
- Bulletin de l'Off. Int. des Epizoot. 91 (9/10): 679-683.
- Brogden K.A., Cutlijo R.C. & Lehmkuhl H.D. 1984. Comparison of protection induced in lambs by *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell and cell wall vaccines. Am. J. Vet. Res. 45(11):2393-2399.
- Brogden K.A., Cutlijo R.C. & Lehmkuhl H.D. 1985. Immunogenicity of *C. pseudotuberculosis* and the effect of adjuvants in mice. J. Comp. Pathol. 95(2):167-172.
- Brown C.C., Olander H. J., Bibersten E.L. & Morse S. 1986. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 47:116-124.
- Cameron C.M. 1982. The immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Proc. 3rd Int. Conf. Goat Production and Disease, p. 458-466.
- Cameron C.M. Bester I.J. 1984. An improved *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine for sheep. Onderstepoort J. Vet. Res. 51(4): 263-268.
- Cameron C.M. & Bwchan L. 1966. Identification of the protective and toxic antigens of *C. pseudotuberculosis*. Onderstepoort J. Vet. Res. 33:39-48.
- Cameron C.M. & Fuls W.P. 1973. Studies on the enhancement of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Onderstepoort J. Vet. Res. 40:103-114.
- Cameron C.M., Minnaar J.L., Engelbrecht M. & Purchon M. 1972. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Onderstepoort J. Vet. Res. 39:11-24.
- Garg D.N. & Chandiramani N.E. 1985. Cellular and humoral immune response in sheep experimentally infected with killed and live. *C. pseudotuberculosis*. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. 260 (1):117-122.
- Nairn M.E. 1982. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. Proc. 3rd Int. Conf. Goat Production and Disease, p. 455-456.
- Nairn M.E., Robertson J.P. McQuade N.C. 1977. The control of caseous lymphadenitis in sheep by vaccination. Proc. 54th Ann. Conf. Aust. Vet. Assoc., p. 159-168.
- Pinheiro D., Carvalho D., Schaer R. & Meyer R. 1988. A resposta humoral em caprinos imunizados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. II. A cinética da resposta anticórpica a diferentes esquemas de imunização. Arq. Esc. Med. Vet. UFBA. (Entregue para publicação)