

Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Evaluation of the goats humoral immune response induced by the *Corynebacterium pseudotuberculosis* lyophilized live vaccine

ROBERTO MEYER¹, RENATO CARMINATI², ROBSON BAHIA CERQUEIRA², VERA VALE³, SIMONE VIEGAS⁴, THEREZA MARTINEZ⁴, IVANA NASCIMENTO⁴, ROBERT SCHAER⁴, JOSÉ A. HAGE DA SILVA⁵, MARCOS RIBEIRO², LIA RÉGIS³, BRUNO PAULE⁶, SONGELI MENEZES FREIRE⁷

¹ Professor de Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

² Bolsista. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

³ Mestranda. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

⁴ Professora de Microbiologia da Escola de Medicina Veterinária. UFBA

⁵ Pesquisador. EBDA. Governo do Estado da Bahia

⁶ Doutorando. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

⁷ Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

Resumo

A linfadenite caseosa (LC), comumente chamada de mal-do-caroco, é uma doença que acomete ovinos e caprinos e tem como agente etiológico *Corynebacterium pseudotuberculosis*. É um patógeno intracelular facultativo de macrófagos e é filogeneticamente relacionado com *Mycobacterium tuberculosis*. É uma doença de ocorrência mundial, caracterizada por formação de lesões necróticas encapsuladas caseosas, localizada principalmente nos linfonodos externos e pulmões. A transmissão se dá provavelmente através da pele, pelo contato de animais sadios com animais portadores de abscessos que evoluem a supuração. Eventualmente, tem sido encontrada em bovinos, porém é em ovinos e em caprinos que assume importância econômica e sanitária. Machos e fêmeas podem apresentar a doença em qualquer estação, porém encontram-se mais doentes com o desenvolver da idade, principalmente após um a dois anos de vida. A enfermidade causa sérios prejuízos a essas espécies, constituindo uma limitação zootológica às suas explorações. Com cerca de 80% do rebanho nacional, a região Nordeste é a maior detentora de caprinos do Brasil, onde esses animais são essenciais ao sustento do pequeno agricultor. *Corynebacterium pseudotuberculosis* causa consideráveis prejuízos econômicos à região, que vão desde a condenação de pele e carcaças em razão de abscessos, até perdas em eficiência na reprodução ou na produção de carne e leite. O presente trabalho teve como objetivo avaliar em caprinos a resposta imune humoral induzida pela vacina viva liofilizada, elaborada com a cepa 1002, da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA). Os resultados evidenciaram que o referido preparado liofilizado promove a produção de anticorpos específicos em doses iguais ou maiores do que 10⁹ CFU e que o tratamento ministrado não provocou lesões nos animais vacinados.

Prof. Roberto Meyer

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular

Departamento de Biointeração

Instituto de Ciências da Saúde

Universidade Federal da Bahia

Av. Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela

40.110-100 Salvador, Bahia, Brasil

e-mail: labimuno@svn.com.br / songeli@ufba.br.

Palavras-chave

Resposta imune humoral, vacina viva atenuada liofilizada, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, linfadenite, falsa tuberculose

Introdução

A vacinação para controle da linfadenite caseosa foi descrita inicialmente por Quevedo et al., em 1957. Experimentos na Patagônia, utilizando cultura de *Corynebacterium pseudotuberculosis* formolizada e contendo adjuvante de alumínio, alcançaram uma redução da infecção em até 60% (EGGLETON et al., 1991).

Várias têm sido as tentativas de vacinação, entretanto, todas elas evidenciam apenas resultados insatisfatórios no que diz respeito aos índices de imunoproteção conseguidos em caprinos. Assim, Cameron e Minnaar (1969), Cameron et al. (1972), Cameron e Fuls (1973), Nairn et al. (1974 e 1982), Cameron e Bester (1984), Alves e Olander (1999), entre outros, realizaram experimentos de vacinação com *C. pseudotuberculosis* viva/morta, com ou sem toxóide. Também foram feitas tentativas no sentido de potencializar a indução de imunização com o uso de diferentes adjuvantes (CAMERON; BESTER, 1984). Os resultados preliminares com a vacina viva da referida cepa 1002, na apresentação líquida, evidenciam que esta vacina induz uma resposta humoral específica e um percentual de imunoproteção de cerca de 83%. Estes resultados foram confrontados com os obtidos com uma vacina morta, anteriormente desenvolvida com esta mesma cepa, ficando demonstrado que o preparado vivo é bem mais eficaz do que aquela (RIBELRO et al., 1991). O presente trabalho relata os resultados obtidos na avaliação da resposta por anticorpos induzida pela vacina viva na apresentação liofilizada, produzida com a mesma cepa 1002 e desenvolvida pela mencionada EBDA, nos diferentes grupos experimentais.

Materiais e métodos

Corynebacterium pseudotuberculosis

A cepa 1002 foi isolada em 1971, no município de Curaçá, Bahia, a partir de material caseoso extraído de abscesso de caprinos e mantida no Laboratório de Bacteriologia da EBDA. O cultivo de *C. pseudotuberculosis* foi realizado em caldo triptose enriquecido com lactoalbumina e extrato de levedura, e/ou em ágar-triptose. As culturas foram expandidas em

garrafas de Roux e posteriormente cultivadas em caldo, por sete dias a 37°C. A viabilidade e o ajuste da concentração celular das culturas foram feitos pelo método de vazamento em placas, após diluição decimal. Assim, diluições de 10^{-1} a 10^{-7} foram semeadas em ágar sangue de coelho com alça de Drigalski, na EBDA.

Animais

Caprinos de ambos os sexos, de três a dezoito meses de idade, sem raça definida (SRD), sem sinais clínicos de doenças e sorologicamente negativos para a linfadenite caseosa, foram mantidos na Fazenda Pilar (EBDA), localizada no município de Jaguarari (BA). Esses animais foram submetidos a exame clínico mensal, ao longo de todo o experimento.

Experimentos com vacina viva

A dose imunogênica foi determinada com base na indução de resposta humoral específica contra *C. pseudotuberculosis*, medida pelo teste de ELISA indireto. Para os experimentos, os animais foram divididos em 5 grupos, designados por 1, 2, 3, 4 e 5, os quais foram vacinados com vacina viva atenuada e liofilizada e um grupo foi tomado como controle. Os grupos de 1 a 4 e o grupo controle eram compostos por 10 animais. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam, respectivamente, $2,25 \times 10^{10}$, enquanto os animais dos grupos 3 e 4 foram inoculados com, respectivamente, $2,25 \times 10^{11}$. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam reforço após 90 dias e os dos grupos 3 e 4, aos 180 dias. Os 50 animais do grupo 5 tinham sido inoculados doze meses antes com 10^7 CFU, sem, entretanto, apresentarem nenhuma produção detectável de anticorpos ao longo dos doze meses de acompanhamento. Foram, então, divididos em cinco grupos de 10 animais (5a a 5e) e reforçados com 60, 90, 180, 270 e 360 dias após a primeira inoculação, com 10^9 CFU.

Monitoramento sorológico

Os animais dos grupos de experimentação da vacina liofilizada e controle foram acompanhados sorologicamente ao longo de quatorze meses, com coleta mensal de soro. A sorologia foi feita pelo ensaio imunoenzimático ELISA, descrito resumidamente a seguir.

As placas de poliestireno de fundo chato (marca Costar, EUA) foram sensibilizadas com base na técnica utilizada por Oliveira, Langenegger e Meyer (1992), com pequenas modificações durante a padronização prévia, com o sobrenadante da cultura de *Corynebacterium pseudotuberculosis* diluído a 1:100 em tampão carbonato bicarbonato a 0,05M, pH 9.6 e incubação por 12h a 4°C. Após duas lavagens com salina tampão fosfato contendo 0,05% Tween-20 (PBS-T20), as placas foram bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-T20 contendo 5% de leite desnatado, durante duas horas à temperatura ambiente. A seguir, foram incubadas com 100 µl/poço dos soros testes e controles diluídos 1:100 em PBS-T 20 contendo 1% de leite desnatado durante uma hora a 37°C. Após cinco lavagens em PBS-T20, adicionou-se às placas 100 µl/poço de anti-IgG (molécula inteira) de caprino produzido em coelho, conjugado à peroxidase (marca Dako, EUA), diluída 1:10.000 em PBS-T20. As placas foram incubadas durante 45 minutos a 37°C e, em seguida, foram novamente lavadas cinco vezes em PBS-T 20 e incubadas com 100 µl/poço da solução reveladora (ácido cítrico 0,01M contendo 0,04% de H₂O₂ e 1mg/mL de ortofenilenodiamina) durante 15 minutos, à temperatura ambiente, em ausência de luz. A reação foi interrompida com a adição de 25 µl/poço de uma solução 4N de H₂SO₄. A leitura da densidade óptica foi realizada em fotocolorímetro automático para ELISA (marca Biorad, EUA), com filtro de 490nm.

Análise estatística

O estudo estatístico foi feito por ANOVA, levando-se em conta os efeitos dose e tempo.

Resultados e discussão

Em todos os grupos utilizados nos testes deste experimento, observou-se por ELISA, ao longo de quatorze meses, valores de D.O. maiores do que os valores observados no grupo controle.

Notou-se que, em alguns grupos que vinham apresentando resposta pouco intensa (por

exemplo, o grupo 5), uma nova inoculação com uma dose bem maior de microrganismos levou a uma maior produção de anticorpos. A tendência apresentada foi confirmada nos resultados da cinética da produção de anticorpos, conforme gráficos apresentados (FIG. 2-10).

Pelo fato de os animais serem criados em regime extensivo, alguns se extraviaram durante algumas coletas mensais de sangue.

No grupo controle, entre o quinto e o décimo mês, pôde-se observar (FIG. 1) um aumento da produção de anticorpos detectados por ELISA, provavelmente graças ao contágio natural destes animais não vacinados com animais de outros grupos que foram inoculados com a vacina viva. Entretanto os animais deste grupo controle não apresentaram sintomas durante o manejo ou durante o exame clínico realizado mensalmente.

A variação da resposta dos animais dos grupos que são mostrados nas diversas figuras deve-se às diferenças entre os animais dentro de cada grupo.

O declínio observado na produção dos anticorpos dosados deve-se, provavelmente, ao catabolismo protéico natural dos anticorpos, que voltam a estar incrementados com o ressurgimento do estímulo reiniciado com a proliferação da bactéria que constitui a vacina viva (FIG. 2 a 10).

Os resultados conseguidos com esta mesma cepa em meio líquido ("vacina líquida"), em experimentos realizados, em 1991, por Ribeiro et al., demonstraram que níveis mais altos de anticorpos foram obtidos com doses menores (10⁴ bactérias).

Tentativas realizadas em 1999 evidenciaram que o preparado liofilizado em doses de 10⁶ e 10⁷ bactérias não induziu níveis detectáveis de anticorpos, com diferença significativa daqueles obtidos no grupo controle. Somente doses iguais ou superiores a 10⁹ microrganismos liofilizados foram capazes de estimular a resposta humoral, de modo detectável pelo ensaio imunoenzimático ELISA.

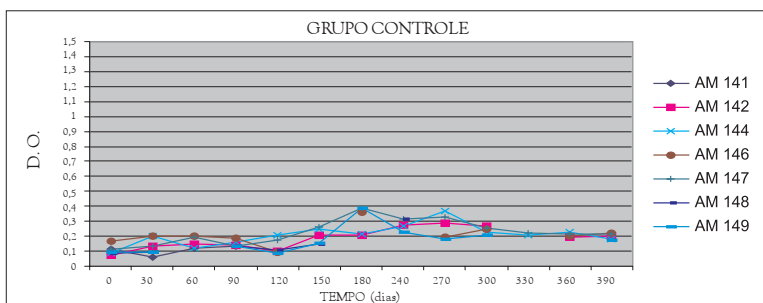


FIGURA 1

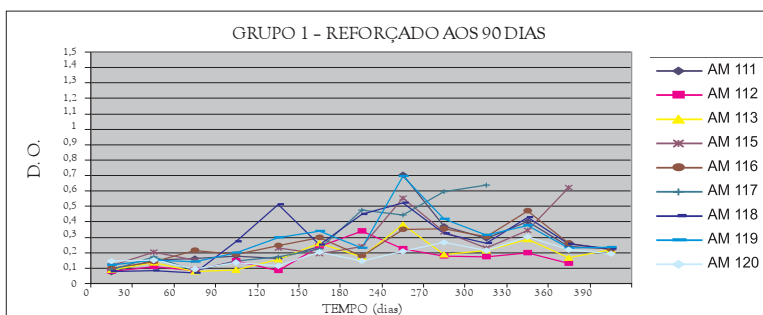


FIGURA 2

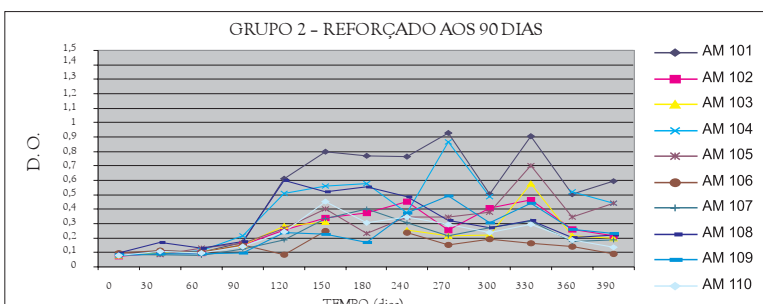


FIGURA 3

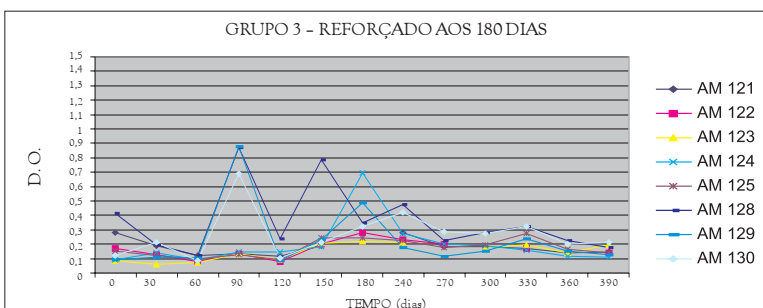


FIGURA 4

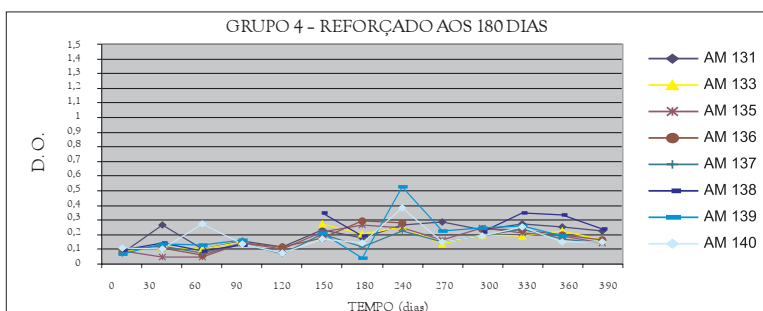


FIGURA 5

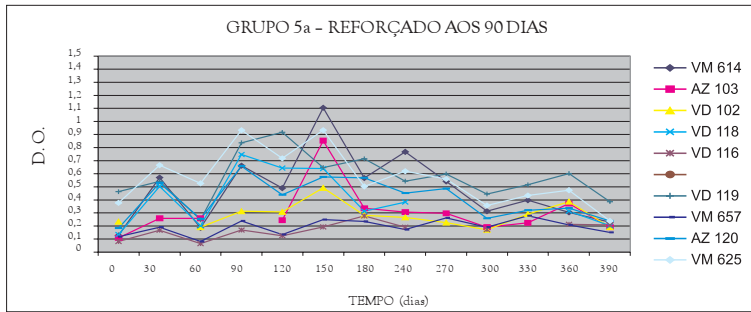


FIGURA 6

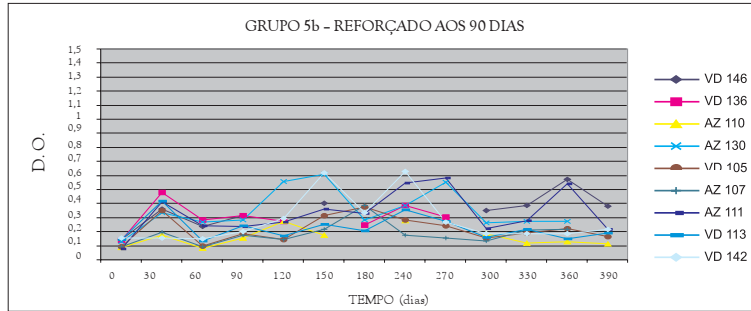


FIGURA 7

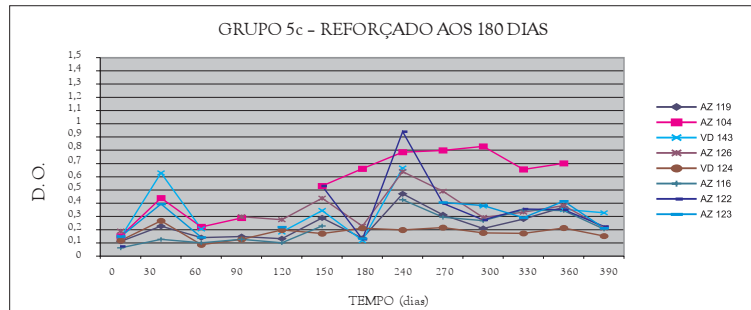


FIGURA 8

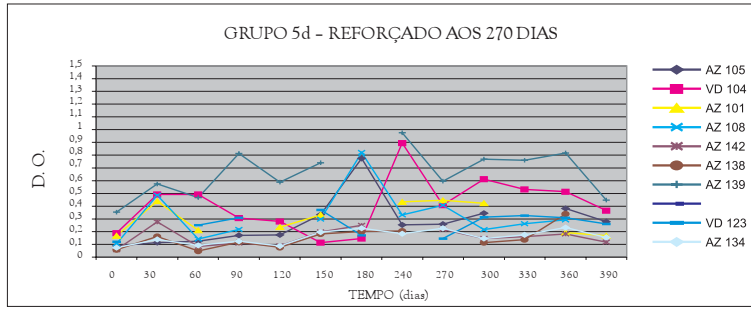


FIGURA 9

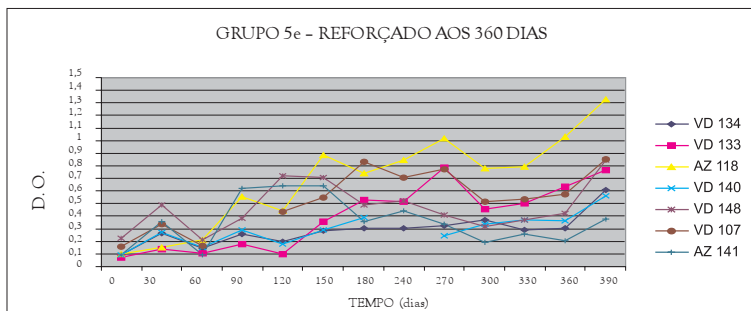


FIGURA 10

As diferenças acima podem ser explicadas pela morte de microrganismos após a liofilização, bem como pelo possível aumento da atenuação dos mesmos, tendo em vista o contínuo e sucessivo repique de culturas. Ademais, doses de até 10^{11} CFU desta cepa são bem toleradas pelos caprinos submetidos à imunização. Em nenhum deles foi notada a presença de abscessos no local da vacinação ou em qualquer linfonodo superficial, detectável ao exame físico. Estudos mais acurados com análise anatomopatológica de cortes dos linfonodos internos e de imunorreatividade específica, por *western blot* dos soros dos diversos grupos encontram-se em fase de conclusão experimental e análise dos dados.

Conclusões

- 1) Os diferentes esquemas de vacinação utilizados mostraram a indução da produção de anticorpos, determinados por

ELISA, com valores de D. O. maiores do que os valores observados no grupo controle.

- 2) Os animais que receberam 10^{10} CFU não mostraram, até 90 dias, aumento significativo de anticorpos específicos. O reforço no 90º dia com $4,5 \times 10^{10}$ CFU, aparentemente, mudou a tendência das curvas, indicando um aumento de produção de anticorpos.
- 3) A administração de apenas uma dose do imunógeno, na magnitude de 10^{11} CFU, induz níveis significativos de anticorpos, mensurados pelo ELISA.
- 4) O preparado liofilizado aparentemente promove a produção de anticorpos específicos em doses iguais ou maiores do que 10^9 CFU.
- 5) O tratamento ministrado não provocou lesões nos animais vacinados.

Abstract

Caseous Lymphadenitis (CL), also known as “mal-do-carço”, is a disease which infects ovines and caprines and eventually humans. The aethiologic agent of this disease is the *Corynebacterium pseudotuberculosis*. It is a facultative intracellular pathogen of macrophages and it is phylogenetically related to *Mycobacterium tuberculosis*. It is a worldwide disease characterized by caseous necrotic capsule-like lesions located mainly in the external lymph nodes and lungs. The infection probably happens by the contact of healthy animals with exuding abscesses of sick ones. Some bovines have been found infected but ovines and caprines are the ones which have an economic and sanitary significance. Both sexes can develop the disease at anytime but animals older than 1 or 2 years are more frequently infected. That disease causes real harmful consequences to these animals turning into a zoopathologic barrier to its economic exploitation. Eighty percent of all caprine herds are located in Brazil's Northeastern Region and play a special role in the economic support for its people, farmers and manufacturers. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* causes high economic losses in that region. The losses range over skin and bones damages, due to abscesses, as well as lower flesh/meat and milk manufacturing production and low reproduction rates. The aim of our study was to analyze the goats humoral immune response induced by the *Corynebacterium pseudotuberculosis* lyophilized live vaccine. The results obtained from these experiments showed that the lyophilized vaccine results in a specific antibody production at doses as high as (or higher than) 10^9 bacteria cells and that the treatment used in that experiment have not caused lesions in the vaccinated animals.

Key words

Humoral response, attenuated lyophilized live vaccine, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, lymphadenitis, false tuberculosis

Referências

- ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. *Veterinária Notícias*, v. 5, n. 1, p. 69-75, 1999.
- CAMERON, C. M.; BESTER, J. F. An improved *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine for sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, n. 51, p. 263-267, 1984.

CAMERON, C. M.; FULS, W. J. Studies on the enhancement of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 40, n. 3, p. 105-113, set. 1973.

CAMERON, C. M.; MINNAR, J. L. Immunization of mice against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 36, n. 2, p. 207-210, 1969.

- CAMERON, C. M. et al. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 39, n. 1 p. 11-24, 1972.
- EGGLETON, D. G. et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian Vet. Journal**, n. 68, p. 317-319, 1991.
- NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. **Aust. Vet. Journal**, n. 50, p. 537-542, 1974.
- NAIRN, M. E. et al. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., 1982. **Proceedings...** Tucson, 1982. p. 455-457.
- OLIVEIRA, S. C.; LANGENEGGER, C. H.; MEYER, R. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): optimal condition to detect antibodies produced against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 23, n. 4, p. 149-151, 1992.
- QUEVEDO, J. M. et al. Evaluación de una vacuna contra linfadenite caseosa en la oveja. **Rev. Invest. Ganade**, n. 1, p. 47, 1957.
- RIBEIRO, O. C. et al. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 461-465, 1991.