

USO DE UMA VACINA TOXÓIDE NO CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS

USE OF A TOXOID VACCINE TO CONTROL CASEOUS LYMPHADENITIS ON GOATS

Francisco Selmo Fernandes Alves¹

Harvey J. Olander²

RESUMO - A linfadenite caseosa (LC) causa perdas econômicas diversas aos rebanhos de caprinos e ovinos. Medidas de controle, como vacinação e os procedimentos de manejo têm obtido limitado sucesso. A cinética da resposta imune em caprinos para esta doença, como também a avaliação de uma vacina eficaz se faz necessária para verificar as medidas adequadas à sua profilaxia. Neste trabalho, foi avaliada a eficácia de uma vacina toxóide no controle da LC em caprinos. Um grupo de caprinos da raça Pardo Alpina foi vacinado por via subcutânea, duas vezes, com um toxóide a 3% e desafiado com $4,2 \times 10^3$ ml *Corynebacterium pseudotuberculosis* por via intradérmica. Os parâmetros observados foram manifestações patológicas e títulos sorológicos detectados pelo teste de inibição da hemólise sinérgica. O uso do toxóide reduziu a propagação do *C. pseudotuberculosis* do local da inoculação a outras partes do corpo, demonstrado pela redução do número e da disseminação de abscessos, quando comparados os animais vacinados com o grupo controle.

PALAVRAS CHAVE - Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, imunoproteção, vacina, caprino.

ABSTRACT - The caseous lymphadenitis causes economic losses to the goat and sheep herds. Measures of control including vaccination and management procedures have been slightly successful. Knowledge of the immunokinetics response of goats with this disease and the response to vaccination would be useful in assessing the efficacy of prophylactic measures. An assessment was made of the immunologic response of goats to vaccination with a toxoid prepared from a goat strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis* followed by an intradermal challenger infection with the same organism. In this study Alpine goats were vaccinated twice subcutaneously with a 3% toxoid vaccine and challenged with 4.2×10^3 ml *C. pseudotuberculosis*. The parameters examined were the pathological manifestations and serological titers measured by the serum hemolysin inhibition test. Vaccination with a toxoid appeared to reduce the risk of organisms spreading from the site of inoculation to establish in other parts of the body. This was demonstrated by the reduced numbers and dissemination of abscesses in vaccinated goats compared to control goats.

KEY WORDS - Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, immunoprotection, vaccine, goat.

INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa é considerada doença crônica, debilitante e contagiosa dos caprinos e ovinos, existindo em todos os países onde são criados. É causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* e trata-se de um sério problema para a caprinovinocultura nacional, evidenciado por perdas econômicas diversas, como desvalorização da pele em 40%, diminuição da produção de leite, custo de drogas e mão-de-obra para tratar

abscessos externos (Figueiredo et al., 1982; Burrell, 1981; Stoops et al., 1984). Duas formas desta doença têm sido observadas: a cutânea externa, caracterizada por linfadenopatia unilateral ou bilateral, e uma forma mais rara, a visceral, com formação de abscessos nos linfonodos internos e/ou órgãos (Ashfaq & Campbell, 1980; Burrell, 1981). Esta condição que acomete ovelhas adultas, é associada e conhecida comumente, nos Estados Unidos, como "síndrome da ovelha magra" (Gates et al., 1977).

O controle da linfadenite caseosa não tem surtido resultados satisfatórios (Burrell, 1981; Nairn et al., 1982). O longo período de incubação e a natureza recorrente desta doença, demonstrada pela formação e aparecimento de abscessos, torna difícil a distinção entre animais infectados e não infectados (Batey, 1986). A introdução de um animal infectado em um rebanho indene resulta em aparecimento de abscessos nos animais ao longo de 2 a 3 anos. E, uma vez estabelecida a doença, é difícil a sua erradicação.

¹PhD em Patologia Comparada. EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, Estrada Sobral Groaíras, km 04, Cx. Postal D-10, Sobral-CE.

²PhD em Patologia Veterinária, Professor. Universidade da Califórnia, Davis, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia Veterinária. 95616 - Davis, Califórnia, USA.

Várias tentativas com vacinas foram conduzidas em experimentos usando coelhos e ovinos, dentre elas uma vacina feita de células mortas (bacterina) do *C. pseudotuberculosis*; contudo, não induziu proteção contra a doença clínica. A mesma vacina misturada à toxina do *Clostridium tetani* e do *Clostridium perfringens* tipo D, protegeu ovelhas que foram avaliadas pela diminuição de abscessos na carcaça (LeaMaster et al., 1987).

Com o uso da toxina inativada (toxóide) do *C. pseudotuberculosis* em ovelhas obteve-se proteção contra a infecção inicial, observada pelo aparecimento de abscessos estéreis no local da inoculação (Nairn et al., 1982). Este preparado, quando foi utilizado em caprinos, demonstrou proteção, reduzindo o número de lesões.

A exotoxina do *C. pseudotuberculosis* inativada em formol a 3% e misturada ao adjuvante incompleto de Freund's produziu resultados promissores no controle da linfadenite caseosa (Brown, 1986).

O desenvolvimento de uma vacina viva atenuada, feita com uma amostra do *C. pseudotuberculosis*, por pesquisadores na Bahia, mostrou resultados significantes. Através de exames anatomopatológicos, verificaram que esta vacina em caprinos, quando utilizada sem adjuvante, foi capaz de conferir imunoproteção a 83,3% dos animais (Ribeiro et al., 1991).

O conhecimento da cinética da resposta imune em caprinos com esta doença, como também a avaliação do tipo de vacina eficaz, fazem-se necessários para indicar as medidas adequadas à sua profilaxia. Neste trabalho, um grupo de caprinos foi vacinado com uma vacina toxóide (3%) concentrada e desafiado com o *C. pseudotuberculosis*. Os parâmetros observados foram manifestações patológicas e títulos sorológicos medidos pelo teste de IHS.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 15 caprinos da raça Pardo Alpina, com idade de 10 semanas, soronegativos, através do teste de inibição da hemólise sinérgica (IHS), para o *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram separados ao acaso em dois grupos: um de 10 animais, constituindo o grupo amostra, o outro com cinco animais, constituindo o grupo controle. Os animais pertenciam ao rebanho da Universidade da Califórnia - Davis (EUA), sem histórico de linfadenite caseosa, e aclimatados em

pasto durante três meses antes da vacinação.

Uma amostra de *C. pseudotuberculosis* isolada de um abscesso de caprino foi cultivada em agar sangue a 37°C por 48 horas, em jarra anaeróbica contendo 5% de CO₂. Uma colônia foi transferida para 500 ml de caldo da infusão de cérebro e coração (ICC) contendo 0,1% de Tween 80 e incubado por 72 horas a 37°C em agitação constante. Após este período, o caldo bacteriano foi semeado em agar sangue para observar sua pureza e centrifugado por 30 minutos a 6.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi filtrado inicialmente através de uma membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm e em seguida de 0,20 µm. Foi adicionado Thymersol (Sigma) [concentração final 1:10.000] ao caldo tóxico e conservado a 4°C. Um volume de 400 ml da toxina foi concentrado através de liofilização e reconstituído em 30 ml de água destilada estéril. Através do teste de IHS, usando agar sangue contendo hemácias sensibilizadas com a toxina do *Rhodococcus equi*, o título hemolítico da toxina foi determinado como sendo a diluição de 1:8. Solução de formaldeído foi adicionada ao produto tóxico, perfazendo o total do volume uma percentagem de 3%, o qual foi incubado por 18 horas a 37°C. Verificou-se que a atividade hemolítica estava inativada, usando o teste de IHS. A antigenicidade foi determinada através do ensaio de competição de ligadura, utilizando toxina formolizada e toxina não alterada, contra soro controle positivo no teste de IHS. A atividade hemolítica da toxina formolizada não existia enquanto a sua antigenicidade era mantida nesta concentração.

O grupo amostra, com dez caprinos, foi vacinado subcutaneamente com 2 ml do preparado contendo 1 ml da toxina formolizada misturado a 1 ml do adjuvante incompleto de Freund's (AIF) na região pré-escapular direita. O grupo controle, contendo cinco caprinos, foi vacinado com 2 ml do preparado (1 ml de ICC misturado a 1 ml de AIF) da mesma maneira que o grupo amostra. A segunda vacinação ocorreu duas semanas após a primeira, seguindo o mesmo procedimento, com aplicações no lado esquerdo de cada animal. Trinta dias após a segunda vacinação os animais foram removidos de uma área isolada, separado o grupo amostra do controle, em diferentes baias, e desafiados intradermicamente com 4,2x10³ ml *C. pseudotuberculosis* na região paralombar.

Os animais foram examinados

diariamente através da palpação dos linfonodos e coletadas amostras de sangue semanalmente para determinar os níveis de anticorpos circulantes durante a vacinação e após o desafio, através do teste de IHS. Os animais foram sacrificados 10 semanas após serem desafiados e o exame completo pós-morte realizado em cada carcaça. As principais vísceras, os linfonodos superficiais e os internos foram examinados à procura de abscessos. Cada linfonodo foi aberto e o material purulento coletado por "swab" para isolamento do *C. pseudotuberculosis*. Os linfonodos aumentados de volume sem a presença de abscessos foram também coletados na tentativa de se isolar *C. pseudotuberculosis*. A localização dos abscessos, o número de abscessos em cada linfonodo e o número de linfonodos com abscesso por animal foram registrados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quarenta e oito horas após a administração do toxóide havia inchaço no local do inóculo, que persistiu por uma semana, diminuindo aos vinte dias. Os animais apresentavam-se clinicamente normais. Dos quatro aos sete dias pós-desafio observou-se reação inflamatória com formação de pequeno abscesso no local da inoculação que persistiu por quinze dias. Do dia 2 até o dia 35 pós-desafio o linfonodo pré-femural direito apresentava-se aumentado de volume em todos os animais.

O número de abscessos em cada linfonodo, o número de linfonodos com abscessos, a localização dos abscessos e os resultados do isolamento bacteriano obtidos à necrópsia estão nas Tab. 1 e 2. Os resultados obtidos com o teste de IHS estão inseridos nas Tab. 3 e 4.

Não foi detectado, através do teste de IHS, título de anticorpos no soro dos caprinos durante o período de vacinação e antes da fase de desafio (Tab. 3 e 4). Em geral, os títulos de anticorpos nos animais vacinados alcançaram seu pico na quinta semana pós-desafio e diminuíram pela oitava semana. Nos animais do grupo controle os títulos aumentaram da segunda semana pós-desafio até a oitava sema-

Tab. 1 - Distribuição isolamento e identificação de bactérias oriundas de abscessos em animais vacinados com toxóide.

Nº do animal	Localização do abscesso na necrópsia	Abscesso por linfonodo	Linfonodos com abscesso por animal	Isolamento bacteriano ⁽¹⁾
01	Linfonodo pré-femural direito	pequeno (1)	1	<i>C. pseudotuberculosis</i>
02	Linfonodo pré-femural direito	grande (1)	1	<i>C. pseudotuberculosis</i>
03	Linfonodo pré-femural direito	pequeno (1)	1	<i>C. pseudotuberculosis</i>
04	Não havia lesão	nenhum	nenhum	nenhum
05	Linfonodo pré-femural direito	pequeno (1)	1	<i>C. pseudotuberculosis</i>
06	Não havia lesão	nenhum	nenhum	nenhum
07	Linfonodo pré-femural direito	pequeno (1)	1	<i>C. pseudotuberculosis</i>
08	Linfonodo pré-femural direito	pequeno (1)	1	<i>C. pseudotuberculosis</i>
09	Linfonodo pré-femural direito	pequeno (1)	1	<i>C. pseudotuberculosis</i>
10	nenhum	nenhum	nenhum	nenhum

⁽¹⁾ Todos os linfonodos preescapulares apresentavam-se hipertrofiados bilateralmente e foram processados na tentativa de isolar *C. pseudotuberculosis*; não houve isolamento.

Tab. 2 - Distribuição, isolamento e identificação de bactérias oriundas de abscessos em animais do grupo controle.

Nº do animal	Localização do abscesso na necrópsia	Abscessos por linfonodo	Linfonodos com abscessos por animal	Isolamento bacteriano
11	Pré-femural direito, traqueobronquial e mediastínico	pequeno (2) pequeno (2) pequeno (2)	3	<i>C. pseudotuberculosis</i>
12	Local da inoculação	pequeno (1)	-	<i>C. pseudotuberculosis</i>
13	Nenhum	nenhum	-	-
14	Pré-femural direito, traqueobronquial e mediastínico pulmão	pequeno (2) pequeno (2) pequeno (3) grande (1)	3 pulmão	<i>C. pseudotuberculosis</i> <i>C. pseudotuberculosis</i>
15	Local da inoculação Linfonodo pré-femural direito	pequeno (1) médio (1)	1	<i>C. pseudotuberculosis</i>

Tab. 3 - Títulos sorológicos detectados pelo teste de IHS nos animais vacinados com toxóide.

Nº do animal	1ª vacinação	2ª vacinação	desafio	1ª semana	2ª semana	5ª semana	8ª semana	10ª semana
01	-	-	-	-	-	1:32	1:32	1:32
02	-	-	-	-	-	1:16	1:4	1:2
03	-	-	-	-	-	1:16	1:8	1:4
04	-	-	-	-	-	1:32	1:32	1:8
05	-	-	-	-	-	1:4	1:2	1:2
06	-	-	-	-	-	-	-	-
07	-	-	-	-	-	1:2	1:16	1:8
08	-	-	-	1:2	-	1:32	1:32	1:16
09	--	--	-	1:2	-	1:2	1:8	1:16
10	-	-	-	-	-	-	-	-

* Título - Refere-se à diluição na qual não ocorreu halo de hemólise.

na, diminuindo pela décima.

No presente estudo, o uso do toxóide demonstrou reduzir a propagação do *C. pseudotuberculosis* do local da inoculação a outras partes do corpo, demonstrado pela redução do número e da disseminação de abscessos, em se comparando animais vacinados e do grupo controle. Cameron et al. (1972), Nairn et al. (1977, 1982) e Brown (1986) sugeriram que as antitoxinas limitam a multiplicação inicial, propagação local e disseminação geral da bactéria *C. pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos. Entretanto, LeaMaster et al. (1987), usando uma bacterina, observaram que havia proteção em ovelhas após a infecção experimental. Estas interpretações reafirmam Hard (1969) ao enunciar que a avaliação da imunidade poderia ser medida pela supressão da formação das lesões. A reação no local da vacinação foi em decorrência do uso de adjuvante incompleto de Freund's, a qual desapareceu dentro de 20 dias. Isto era esperado, pois adjuvantes à base de óleo produzem reações granulomatosas locais (Tizard, 1982). Estas reações não causaram nenhum efeito no estado hígido dos animais neste experimento. A inoculação intradérmica nos caprinos com *C. pseudotuberculosis* resultou em reação inflamatória caracterizada por pequeno abscesso contendo exsudato de aspecto purulento. Neste estudo não houve diferença entre os grupos, observação também registrada por outros pesquisadores os quais verificaram reação inflamatória e lesões supurativas em caprinos vacinados e infectados, atribuindo tais efeitos à exotoxina do *C. pseudotuberculosis* (Ashfaq &

Campbell, 1980; Brown et al., 1986). Resultados também similares foram observados por Jolly (1965) e Gammell & Tartour (1974) em infecção experimental feita através de inoculação intradérmica de *C. pseudotuberculosis* em ovelhas.

Durante 30 dias após a segunda vacinação, nenhum dos animais soroconverteu pelo teste de IHS. Entretanto, foram detectados títulos de anticorpos depois da infecção. Somente um caprino no grupo controle demonstrava título maior que 1:4 nas duas semanas pós-infecção, enquanto que na

quinta semana nove dos quinze animais desafiados apresentavam título sorológico de 1:4 ou mais elevado. Assim, o teste de IHS parece detectar resposta humoral em infecção ativa. No grupo controle, em seis dos dez animais vacinados que apresentavam abscessos à necrópsia, demonstraram títulos terminais maiores que 1:4. Um animal do grupo controle apresentou-se com abscessos disseminados e título sorológico mais elevado em relação àqueles com lesões localizadas. A presença dos títulos de anticorpos é resultado da resposta imune à persistência e produção contínua de antígenos do *C. pseudotuberculosis*. Os animais que não apresentaram lesões, nem deles foi isolado *C. pseudotuberculosis*, não demonstraram títulos sorológicos pelo teste de IHS. Supostamente estes animais foram protegidos por uma resposta imune celular no momento da exposição ao agente, fator que pode ter limitado sua replicação e/ou multiplicação, produção de toxina e resposta de anticorpos (o que poderia ter sido detectado pelo teste de IHS). A diferença na resposta do hospedeiro à infecção está condicionada a fatores genéticos e de meio ambiente, o que resulta em fenômeno imunológico clássico. Outros fatores, além do genético, como níveis de hormônios, nutrição e resistência não específica, estão provavelmente envolvidos na resistência natural da linfadenite caseosa em alguns animais (Batey, 1986).

CONCLUSÕES

No presente estudo, o uso do toxóide a 3% demonstrou reduzir a disseminação do *C. pseudotuberculosis* do local da inoculação a outras partes do corpo.

Os achados patológicos demonstraram que nos animais vacinados com o toxóide parece ter diminuído o poder de disseminação do *C. pseudotuberculosis* a outras partes do corpo (formação de abscessos), em relação aos animais que não foram vacinados. Não houve resposta sorológica ao teste de IHS após a vacinação, entretanto, após a infecção ocorreu uma resposta similar em ambos os grupos. Somente após infecção ativa houve manifestação sorológica do teste de IHS em relação à exotoxina do *C.*

Tab. 4 - Títulos sorológicos detectados pelo teste IHS nos animais do grupo controle.

Nº do animal	1ª vacinação	2ª vacinação	desafio	1ª semana	2ª semana	5ª semana	8ª semana	10ª semana
11	-	-	-	-	1:2	1:32	1:32	1:8
12	-	-	-	-	-	1:4	1:16	1:4
13	-	-	-	1:2	-	-	1:4	-
14	-	-	-	1:2	1:8	1:512	1:1024	1:1024
15	-	-	-	-	1:2	-	1:16	1:16

pseudotuberculosis.

Talvez o uso de uma vacina composta de constituintes da parede celular e toxóide poderia induzir uma resposta imune capaz de proteger da doença.

AGRADECIMENTOS

Ao Small Collaborative Research Program (CRSP) - Universidade da Califórnia, Davis, pelo apoio financeiro e à Dra. Corrie C. Brown pelo incentivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHFAQ, M. K., CAMPBELL, S. G., Experimentally induced caseous lymphadenitis in goats. *American Journal Veterinary Research*, v. 41, n. 11, p. 1789-1792, 1980.
- BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Australian Veterinary Journal*, v. 63, n. 9, p. 269-272, 1986.
- BROWN, C. C. *Caseous lymphadenitis in goats*. PhD Thesis University of California, Davis, 1986.
- BROWN, C. C., OLANDER, H. J., BIBERSTEIN, E. L., MORSE, S. M. Use a toxoid vaccine to protect goats against intradermal exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal Veterinary*, v. 47, n. 5, p. 1116-1119, 1986.
- BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. *Australian Veterinary Journal*, v. 57, n. 3, p. 105-110, 1981.
- CAMERON, C. M., MINAR, J. L., ENGELBRECHT, M. M., PURDON, M. R. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v. 39, n. 1, p. 11-24, 1972.
- FIGUEIREDO, E. A. P., SHELTON, M., PANT, K. P. Goats skins. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3. 1982. p. 488-490.
- GAMMELL, A. A., TARTOUR, G. Haematological and plasma protein changes in sheep experimentally infected with *Corynebacterium ovis*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 84, p. 477-484, 1974.
- GATES, N. L., EVERSON, D. O., HULET, C. V. Effects of thin ewe syndrome on reproductive efficiency. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 171, n. 12, p. 1266-1267, 1977.
- HARD, G. C. Electron microscopy examination of *Corynebacterium ovis*. *Journal of Bacteriology*, v. 27, n. 3, p. 1480-1485, 1969.
- JOLLY, R. D., The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 13, p. 141-147, 1965.
- LEAMASTER, B. R., SHEN, D. T., GORHAM, J. R., et al. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection in sheep against development of caseous lymphadenitis. *American Journal of Veterinary Research* v. 48, n. 5, p. 869-872, 1987.
- NAIRN, M. E., ROBERTSON, J. P., MIDDLETON, D., McQUADE, N. C. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In: ANNUAL CONFERENCE AUSTRALIAN VETERINARY ASSOCIATION, 54. *Proceedings...* 1977. p. 159-161.
- NAIRN, M. E., ROBERTSON, J. P., MIDDLETON, H. D.; McQUADE, N. C. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3. *Proceedings...* 1982.
- STOOPS, S. G., RENSCHAW, H. W., THILSTED, J. P. Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. *American Journal Veterinary Research*, v. 45, n. 3, p. 557-561, 1984.
- RIBEIRO, O. C., DA SILVA, J. A. H., OLIVEIRA, S. C. et al. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n. 4, p. 461-465, 1991.
- TIZARD, I. R. *An introduction to veterinary immunology*. Toronto: W. B. Saunders, 1982.