



XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária
I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária
V Simpósio Brasileiro da CL Davis Foundation

26 a 30 de Setembro de 2011
Centro de Convenções de Goiânia - GO



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE UMA LINHAGEM
RECOMBINANTE DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* NA REDUÇÃO DAS
LESÕES EM LINFONODOS CAPRINOS CAUSADA POR LINFADENITE
CASEOSA**

**EVALUATION OF VACCINE POTENTIAL OF A RECOMBINANT STRAIN OF
Corynebacterium pseudotuberculosis IN REDUCING LYMPH NODE LESIONS IN
GOAT CAUSED BY CASEOUS LYMPHADENITIS**

Dayana Ribeiro¹, Fernanda Alves Dorella², Alessandro de Sá Guimarães³, Teane Milagres Augusto da Silva⁴, Renato de Lima Santos⁵, Marcos Xavier Silva⁶, Aurora Maria Guimarães Gouveia⁷, Vasco Azevedo⁸

1. Doutoranda, Depto. de Microbiologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

E-mail: dayvet2004@hotmail.com

2. Pós-Doutoranda, Depto. de Biologia Geral, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

3. Doutor, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais.

4. Doutoranda, Depto. de Clínica e Cirurgias Veterinárias, EV, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

5. Professor, Depto. de Clínica e Cirurgias Veterinárias, EV, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

6. Professor, Depto. de Medicina Veterinária e Preventiva, EV, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

7. Professora, Depto. de Medicina Veterinária e Preventiva, EV, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

8. Professor, Depto. de Biologia Geral, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

PALAVRAS-CHAVE: Avaliação anátomo-patológica, cepa atenuada, histopatologia, vacina.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is a gram-positive, facultative intracellular pathogen that causes Caseous Lymphadenitis (CLA) in goat and sheep. CLA consists of external and internal abscesses especially in the lymph nodes. There is not enough information about the immune prophylaxis against the infection to reduce the illness incidence. Thus, our laboratory group has been searching new alternative vaccines against CLA. Through random mutagenesis using TnFuZ, we obtained a live attenuated strain, Cp13, a promising mutant in mice vaccination trials. The aim of this study was report the evaluation of vaccine potential of a recombinant strain of *C. pseudotuberculosis* in reduce lymph node injuries in goat caused by CLA. Twenty-four young goats were allocated to receive 1 or 2 doses of recombination strain, inoculated by subcutaneous via and experimental infection were done 30 days post-immunization. Pathologically, the difference of observations into group 1 and 2 revealed no to be significant, however 2 doses of vaccine showed reduce, macroscopically, lesion instead of control. This pilot experiment showed a promising

potential of this recombinant strain to decrease lymph node injuries in goats. However, other experiments have to be done in order to improve some parameters, as well as, protocols of immunization researched against CLA.

KEYWORDS: Vaccine, live mutant, anatomical pathology, histopathology.

INTRODUÇÃO

A bactéria intracelular facultativa *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da Linfadenite Caseosa (LC), enfermidade crônica que acomete caprinos e ovinos. Esta doença é caracterizada pela formação de abscessos com conteúdo necrótico caseoso em linfonodos superficiais, viscerais e órgãos (DORELLA et al, 2006).

Atualmente, não existe uma vacina capaz de conferir proteção contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*, e as disponíveis no mercado apresentam aspectos relevantes a serem considerados quanto à possibilidade de sua utilização. Além disso, nem todas conferem a mesma eficiência em caprinos (WILLIAMSON, 2001).

Com o intuito de se buscar alvos vacinais, o nosso grupo obteve, através de mutagênese aleatória, a linhagem recombinante Cp13 de *C. pseudotuberculosis*. O gene interrompido pela inserção do transposon TnFuZ codifica uma proteína secretada ligadora do sistema de transporte de ferro (DORELLA, 2009).

Testes de imunização empregando esta linhagem recombinante em camundongos BALB/c conferiram 81% de proteção aos animais imunizados, sendo então considerada bastante promissora para ensaios futuros nos hospedeiros-alvo (DORELLA, 2009).

Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial de uma linhagem recombinante em reduzir lesões em linfonodos caprinos, já que esta vem apresentando promissores resultados de proteção em ensaios imunológicos em camundongos, visando futuramente o desenvolvimento de uma vacina contra a LC.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e quatro cabritos com idade entre 2 e 3 meses, soronegativos para o ELISA específico foram empregados neste estudo (CARMINATI et al. 2003). O regime de imunização proposto neste ensaio piloto foi: grupo 1 (n=9) recebeu uma única dose da vacina; grupo 2 (n=10) duas doses de vacina e grupo controle (n=4) recebeu salina. O desafio ocorreu 30 dias após a imunização. As doses vacinais, com volume de 1 mL, continham 2×10^6 UFC/mL de Cp13. A linhagem MIC-6, utilizada no desafio, foi aplicada no mesmo volume e

concentração. Neste ensaio a vacina foi aplicada pela via subcutânea, região pré-escapular direita (vacina) e esquerda (desafio).

Os grupos foram acompanhados durante 4 meses após desafio, quando foram então, sacrificados para avaliações anátomo-patológica e histopatológica.

Avaliações macroscópicas e histológicas dos linfonodos parotídeo, submandibular, pré-escapular e mediastínico foram realizados. Para microscopia, os tecidos coletados foram fixados em formol-tamponado a 10%, processados e corados pela Hematoxilina-Eosina.

RESULTADOS

O resultado das avaliações anátomo-patológicas e histológicas dos linfonodos superficiais bilaterais e mediastino foram categorizados em escores. Os escores variaram entre: 0 - ausência de lesão; 1 - linfadenite discreta; 2 linfadenite moderada; 3 linfadenite acentuada; 4 linfadenite crônica caracterizada por extenso dano tissular, com formação de abscessos repletos de exsudato/ conteúdo necrótico caseoso, circundados por fibroblastos e infiltrado inflamatório mono e polimorfonucleares, dispostos em lamelas concêntricas além de substituição do parênquima por tecido conjuntivo.

A análise dos escores observados está representada no gráfico 1.

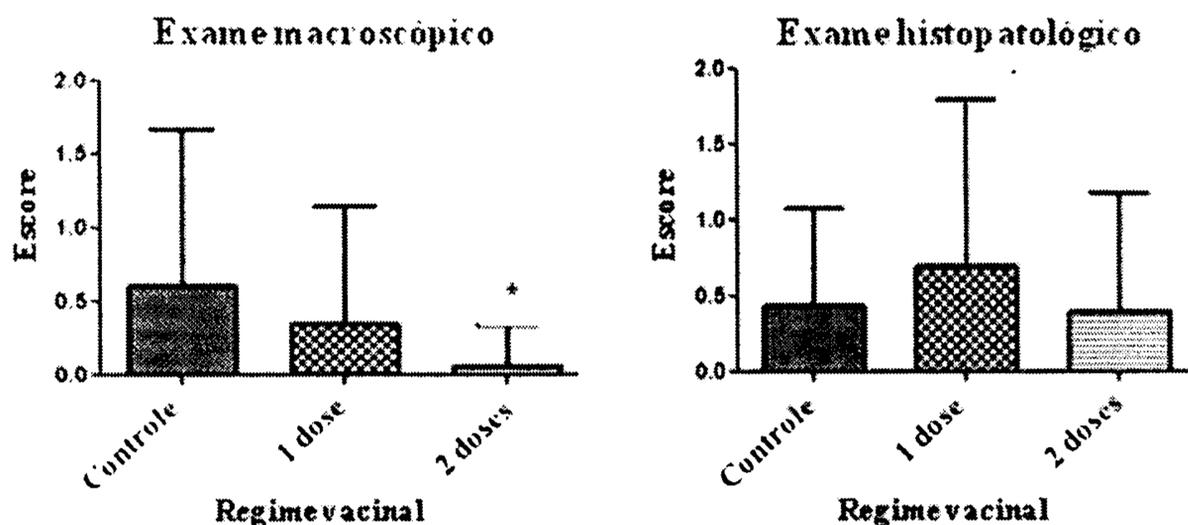


Gráfico 1. Média dos escores observados no exame macroscópico e histopatológico em relação ao tratamento vacinal.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por ensaio piloto de imunização, a capacidade de uma linhagem recombinante de *C. pseudotuberculosis* em reduzir o número e a extensão de lesões em linfonodos de caprinos. Nossos resultados sugerem que a utilização de 2 doses mostrou-se melhor em relação à redução de lesões que o grupo controle, segundo o exame anátomo-patológico, porém não difere entre 1 ou 2 doses segunda a histopatologia.

A ordenação em escores das observações macro e microscópicas dos grupos que receberam 1 e 2 doses mostraram que, em média, a grande maioria estava entre ausência de lesão a discreta linfadenite, 95% (63/66) e 86% (55/64), respectivamente. Portanto, pudemos observar que os regimes vacinais propostos reduzem a severidade das lesões nos linfonodos afetados. Ainda, o regime vacinal onde foram aplicadas 2 doses da vacina recombinante apresentou-se promissor, uma vez que houve redução significativa nas lesões macroscópicas em comparação com àquelas dos animais controle.

A severidade das lesões observadas nos achados histológicos, apesar de não terem diferença significativa entre os tratamentos, foi maior nos animais que receberam 1 dose que o apresentado pelos animais com 2 doses.

CONCLUSÕES

De modo geral, este ensaio piloto de imunização com a linhagem recombinante mostrou um potencial promissor em reduzir lesões em linfonodos caprinos. No entanto, um próximo experimento precisar ser realizado para melhorar os parâmetros da vacinação, bem como, pesquisas de protocolos de imunização contra Linfadenite Caseosa.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio das agências de fomento: CNPq, CAPES e Fapemig

REFERÊNCIAS

- CARMINATI R., BAHIA R., MOURA-COSTA L.F. PAULE B.J.A., VALE V.L., REGIS L., FREIRE S.M., NASCIMENTO I., SCHAEER R., MEYER R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 2, p. 88-93, 2003.
- DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., OLIVEIRA, S.C., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.
- DORELLA, F.A. **Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2009. 191 p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- WILLIAMSON L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359–371, 2001.