

AVALIAÇÃO DE VACINA CONTRA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS MANTIDOS EM REGIME EXTENSIVO¹

ORLANDO CAVALCANTE RIBEIRO², JOSÉ ARTHUR HAGE DA SILVA², PAULO CESAR COSTA MAIA² e WILSON GOSLAN CAMPOS²

ABSTRACT.- Ribeiro O.C., Silva J.A.H., Maia P.C.C., Campos W.G. 1988. [Evaluation of an inactivated vaccine against caseous lymphadenitis of goats kept under extensive management.] Avaliação da vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 8(1/2):27-29. Lab. Bacteriologia, EPABA, Av. Ademar de Barros 967, Ondina, Salvador, Bahia 40000, Brazil.

The experiment was carried out during a 2-year period (Oct. 1981 to Oct. 1983), using 163 goats of both sexes with 6 to 12 months of age. The objective was to evaluate the immunogenicity of a vaccine against caseous lymphadenitis, in northeastern Bahia. The vaccine was developed, utilizing the local strain 1002 Curaçá of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from an abscess of a goat. For the preparation, tryptose broth, enriched with yeast extract and lactalbumin, was used. Inactivation was effected with 0.5% formaldehyde, and aluminum gel phosphate was used as an adjuvant. The cell volume varied from 0.65 to 0.7%. The experiment consisted of the following treatments: A₁ - animals vaccinated every 6 months; A₂ - animals vaccinated once a year; and A₃ - animals not vaccinated. The goats were vaccinated by subcutaneous inoculation of 3 ml vaccine into each axillar region, and post-mortem examination was made at the end of the experiment. The results showed that 72.1% of the control animals (A₃) had moderate to severe lesions in different lymphnodes, and in some cases in the internal organs. Of the vaccinated animals, only 25.9% and 18.9%, at 6 and 12 months interval respectively, showed discrete lesions which were restricted to no more than three lymphnodes per animal. There was a significant difference (P<0,05) between the vaccinated and the non-vaccinated animals, but no difference between treatment A₁ and A₂. It can be estimated that the vaccination gave a protection of 77% against the disease.

INDEX TERMS: Caseous lymphadenitis, vaccine, goat.

SINOPSE.- Foram utilizados 163 caprinos de ambos os sexos, de 6 a 12 meses de idade, com o objetivo de avaliar a imunogenicidade de uma vacina contra a linfadenite caseosa, no Nordeste do Estado da Bahia. A vacina foi elaborada com a cepa 1002 Curaçá de *C. pseudotuberculosis*, isolada de abscesso de caprino, cultivada em caldo tryptose, enriquecida com extrato de levedura mais lactalbumina e inativada com formaldeído a 0,5% durante 7 dias, utilizando-se como adjuvante o gel fosfato de alumínio. O volume celular variou de 0,65 a 0,70%. O experimento constituiu-se dos seguintes tratamentos: A₁ - animais vacinados semestralmente; A₂ - vacinados anualmente; A₃ - animais não vacinados. Os animais vacinados foram inoculados via subcutânea com 3 ml da vacina em cada região axilar e, ao final do experimento, foram necropsiados. Os resultados mostraram que 72,1% dos caprinos do grupo testemunha A₃ se infectaram naturalmente e apresentaram lesão moderada a severa em vários linfonodos e, em alguns casos, nos órgãos internos. Dos vacinados, apenas 25,9 e 18,9%, respectivamente, para os revacinados com 6 e 12 meses de intervalo, apresentaram lesões discretas que se restringiram a não mais de três linfonodos por animal. Houve diferença significativa (P<0,05) entre os animais vacinados e não vacinados mas não houve diferença entre os tratamentos A₁ e A₂. Pode-se estimar que a vacina proporcionou 77% de proteção contra a doença.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, vacina, linfadenite caseosa, caprinos.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura no nordeste do Brasil é uma das principais atividades econômicas do pequeno produtor, tendo na linfadenite caseosa (LAC) um cruciante problema de sanidade. A LAC expande-se da Bahia até o Piauí, sendo considerada como a enfermidade infecciosa de maior prevalência entre os caprinos. Os prejuízos provocados são grandes, comprometendo a pele, a carcaça e os órgãos internos. É doença crônica que atinge o rebanho caprino e ovino em muitas partes do mundo e caracteriza-se pela formação de abscessos nos linfonodos, tendendo à generalização, o que debilita o animal. Resultados promissores alcançados com o emprego de vacinas para o controle da linfadenite caseosa vêm estimulando este meio como medida profilática eficaz. Contudo a maioria dos experimentos estão voltados para a doença em ovinos.

Cameron et al. (1972) avaliaram a eficiência de uma vacina inativada para a imunização de ovinos contra a linfadenite caseosa. A vacina foi elaborada a partir da cultura de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caldo enriquecido com 0,5% de extrato de levedura e 1% de hidrolizado de lactalbumina, incubada a 37°C durante 72 horas. A cultura foi inativada com 0,5% de formol durante 7 dias e adsorvida em gel de fosfato de alumínio. A concentração final de massa bacteriana foi de 0,5% ou 0,025 ml por dose de 5 ml. Verificaram maior proteção quando os animais foram revacinados 6 semanas após. O

¹ Aceito para publicação em 21 de setembro de 1987.

Trabalho financiado pelo convênio BID/Sudene/CNPq/Embrapa.

² Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia (EPABA), Av. Ademar de Barros 967, Ondina, Salvador, Bahia 40000.

desafio foi feito através de infecção experimental, via intravenosa com 5×10^8 germes (dose subaguda), que a maioria dos ovinos vacinados resistiu e os testemunhos morreram.

Doze anos após, Cameron & Bester (1984) realizaram extensos experimentos em camundongos e confirmaram que a imunogenicidade de uma vacina contra a infecção por *C. pseudotuberculosis* não pode ser significativamente melhorada com o uso de vários adjuvantes. A imunidade não foi aumentada com a incorporação de imunostimulantes na vacina. Entretanto, a combinação de gel-hidróxido de alumínio e saponina como adjuvante teve um efeito benéfico. Esta vacina foi melhor tolerada, e uma dose, aparentemente, protegeu o ovino mais efetivamente que a vacina com precipitado de alumínio.

Nairn et al. (1982) julgam, baseado em seus experimentos, que a vacina constituída apenas de toxina inativada (toxóide) e adjuvante conferiu excelente proteção a ovinos em testes com desafio por *C. pseudotuberculosis* virulento. O mesmo parece acontecer nas condições a campo. Estudos preliminares com vacina a base de toxóide e adjuvante, aplicada em caprinos jovens não revelaram resultados tão satisfatórios como nos ovinos.

Brogden et al. (1984) observaram diminuição no número de abscessos desenvolvidos em ovinos submetidos a vacinação contra *C. pseudotuberculosis*, tanto quanto experimentaram uma preparação com células inteiras, como com uma outra, utilizando as paredes das células da bactéria. Após a vacinação, ambos os grupos foram submetidos ao desafio de *C. pseudotuberculosis* virulento. Foi comprovado que a imunidade induzida protegia significativamente os ovinos, quando comparados os resultados alcançados com os do grupo controle.

Brown et al. (1986) avaliaram a eficácia de uma exotoxina formolizada de *C. pseudotuberculosis* e com adjuvante incompleto de Freund. Após o desafio com *C. pseudotuberculosis* vivo, por via cutânea a proteção imunológica dos caprinos vacinados foi revelada pelo aumento de resposta em anticorpos humoral e celular e também pelo número reduzido de abscessos, restritos ao local da inoculação. No grupo controle (não vacinados e desafiados) foi observado, além da existência de abscessos disseminados, que os animais requeriam 21 dias para desenvolverem uma resposta sorológica positiva ao desafio.

Este trabalho foi realizado objetivando-se avaliar o comportamento de uma vacina morta contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda Lagoa da Vaca, município de Uauá, Bahia, no período de outubro de 1981 a outubro de 1983. Foram utilizados 163 caprinos de ambos os sexos com idade entre 6 e 12 meses, divididos em três grupos com os seguintes tratamentos:

- A₁ - 54 caprinos vacinados de 6 em 6 meses;
- A₂ - 48 caprinos vacinados de 12 em 12 meses;
- A₃ - 61 caprinos testemunha.

Todos os animais foram submetidos ao regime extensivo de criação da propriedade, sendo feita a inspeção dos gânglios externos, antes da vacinação, não se observando a existência de abscessos. Todos os animais dos grupos A₁ e A₂ receberam 6 ml da vacina pela via subcutânea, dividindo-se a dose e aplicando-se

3 ml em cada região axilar. O grupo A₁ recebeu 6 ml da vacina, repetindo-se a dose a cada 6 meses, e o grupo A₂ foi revacinado com intervalo de 12 meses. Os animais ficaram sob observação durante 2 anos. A vacina foi elaborada pelo Laboratório de Bacteriologia da EPABA, a partir da cepa 1002 Curaçá de *C. pseudotuberculosis* isolada de abscesso de caprino cultivada em caldo tryptose enriquecido com lactalbumina e extrato de levedura, incubado a 37°C por 48 horas segundo Cameron et al. (1972). A massa bacteriana foi suspensa em soro fisiológico, para a determinação do volume celular, utilizou-se de tubos de Hoppkins na concentração de 0,65 a 0,70% de massa bacteriana. A inativação foi feita adicionando-se 0,5% de formaldeído, sendo o preparado deixado em temperatura ambiente por 7 dias. Após esse período, adicionando-se partes iguais do imuno-adjuvante, gel fosfato de alumínio. De todas as partidas de vacina elaborada, realizaram-se testes de esterilidade em gelose sangue, caldo tryptose, caldo simples, tioglicolato e Saboraud, com incubação em estufa a 37°C por 48 horas. A prova de inocuidade constitui em inoculação de camundongos jovens e adultos, por via subcutânea, com 0,1 ml de vacina e inoculação de cobaias adultos pela mesma via, com 1,0 ml da suspensão inativada. Após 10 dias de observação, considerava-se inócua a vacina, quando os animais não apresentavam reação local.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do experimento, foram sacrificados e necropsiados todos os animais, visando-se a observação de lesões que caracterizassem a doença. A necropsia do grupo A₁ revelou que 14 animais apresentaram lesões discretas nos seguintes linfonodos: parotídeo (6 animais), pré-escapular esquerdo (3) e pré-escapular direito (5), e que 40 caprinos estavam sem lesões macroscópicas. No grupo A₂, nove animais apresentaram lesões comprometendo os seguintes linfonodos: parotídeo direito (2), parotídeo esquerdo (3), pré-escapulares (4) sendo que 39 caprinos não apresentaram lesões. O grupo testemunha (A₃) apresentou 44 animais com lesões acometendo os seguintes linfonodos: pré-escapular direito (13), parotídeos direito e esquerdo (13), mediastínicos (9), sub-maxilares (3), poplíteo (3), inguinais (1), retro-mamários. Deste grupo 17 animais não apresentaram lesões. Observou-se ainda que os animais do grupo testemunha (A₃) apresentaram lesões moderadas a severas e, em alguns casos, com comprometimento dos órgãos internos. Por outro lado, nos lotes de animais vacinados, estas lesões quando presentes eram discretas, restringindo-se a um máximo de três linfonodos. A análise estatística dos resultados macroscópicos permite afirmar que não houve diferença significativa entre tratamentos em que os animais foram vacinados com intervalo de 6 a 12 meses. No Quadro 1, encontram-se os resultados do efeito da vacina segundo o número de ocorrências de animais portadores (+) ou (-) da linfadenite caseosa, referentes aos três tratamentos. Os resultados foram submetidos à análise estatística não paramétrica.

Quadro 1. Tratamento e ocorrência da Linfadenite Caseosa em caprinos

| Tratamentos | Total de animais no tratamento | Positivo de animais | Negativo de animais |
|---|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| Vacinados de 6 em 6 meses (A ₁) | 54 | 14 (25,9%) | 40 (74,1%) |
| Vacinados de 12 em 12 meses (A ₂) | 48 | 09 (18,7%) | 39 (81,2%) |
| Não vacinados, testemunha (A ₃) | 61 | 44 (72,1%) | 17 (27,9%) |
| Total | 163 | 67 | 96 |

ca através do teste de quiquadrado e testes de estimativas para diferenças entre duas ou mais proporções.

Os limites de confiança das diferença entre proporções dos grupos vacinados, permitem afirmar com 95% de confiança, que a proteção determinada pela vacina contra a doença está experimentalmente compreendida entre 50 e 77%. Em conseqüência, pode-se admitir que a verdadeira eficácia da vacina não difere significativamente de 77%.

A percentagem de animais imunizados de 12 em 12 meses foi estimada em 81,25%, ligeiramente superior aos vacinados de 6 em 6 meses, que registrou proteção de 74,07%. Contudo, esta diferença não se tornou significativa pelo teste das proporções. Os limites de confiança das diferenças entre proporções dos grupos vacinados para não vacinados permitem afirmar com 95% de confiança, que a proteção determinada pela vacina contra a doença está experimentalmente compreendida entre 50 e 77%. A percentagem de casos positivos de linfadenite caseosa para o grupo de animais não vacinados ficou estimada de 60,88 a 83,38%. Cameron & Bester (1984) observaram que similarmente a administração de 3 doses de vacina em intervalo mensal em vez das costumeiras 2 doses, tem apenas uma pequena influência na resposta imunitária. Os títulos aglutinantes persistiam por um pequeno período no grupo que recebeu 3 injeções, mas em ambos os grupos os títulos estavam muito baixos até a 12ª semana e tinha retornado a níveis de pré-imunização na 16ª semana. A extensão do intervalo entre a primeira e segunda injeções de 4 a 6 semanas tinha um efeito benéfico nos títulos de aglutinação obtidos 2, 4 e 8 semanas, respectivamente, depois da segunda injeção. Mas apesar dos altos níveis obtidos, os títulos recuaram a níveis de pré-imunização na 16ª semana. A proteção determinada pela vacina contra a doença (69,34 – 85,56%), leva a admitir que existe resposta imunológica suficiente para proteger os caprinos. Cameron et al. (1972), estudando a resposta imune de ovinos a uma vacina contra *C. pseudotuberculosis*, concluíram que apesar de pequena proteção conferida, esta era suficiente para proteger animais contra os efeitos letais de infecção intravenosa. Cameron & Bester (1984), num experimento preliminar, avaliando comparativamente a imunogenicidade da vacina com precipitado de alumínio, da vacina contendo 0,15% de saponina de da vacina viva sem adjuvante, verificaram que a vacina viva foi superior às outras. Entretanto, a dosagem usada causou lesões nos locais de administração da vacina nos camundongos. Brogden et al. (1984) verificaram em condições experimentais, que vacinas contra a linfadenite caseosa, preparadas tanto com parede celular como com células inteiras, induzem resposta imunológica de considerável intensidade a julgar pelo menor número de abscessos pulmonares encontrados após desafio com bactérias vivas via endovenosa. É provável que o grau de proteção possa ser influenciado tanto pela dose de vacina

como pela adição de um adjuvante que estimule o sistema retículo-endotelial de caprinos contra *C. pseudotuberculosis*. Brown et al. (1986) determinaram, índices percentuais (80%) de animais com ausência de lesões bacterianas, nos grupos de caprinos vacinados-desafiados e no controle não vacinados, respectivamente. No mesmo estudo, verificaram que 90% dos animais vacinados desenvolveram altos títulos em anticorpos ($\geq 1:8$) uma semana após o desafio, enquanto 80% dos não vacinados eram soro-negativos aos 21 dias, nas mesmas condições. Apenas 2 de 10 dos caprinos vacinados desenvolveram abscessos quando desafiados com alta dose de *C. pseudotuberculosis*, e concluíram que a vacinação é capaz de estimular suficientemente a imunidade em situações naturais. Brown et al. (1986) revelaram que a vacina apresentou efeitos colaterais como depressão, manqueira, febre, reação no ponto de inoculação e diarreia em alguns caprinos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições em que se realizou este trabalho, permitem concluir que, o índice de proteção conferido pela vacina deve estar entre 50 e 77%. A vacina aplicada de 6 em 6 meses não determinou maior proteção imunológica à linfadenite caseosa do que quando aplicada anualmente. Animais não vacinados registraram aproximadamente 72% de casos positivos. Recomenda-se a vacinação de caprinos a partir de 4 meses de idade por via subcutânea, sendo 3 ml em cada região axilar em aplicações anuais.

Agradecimentos.- Os autores agradecem a valiosa colaboração do Prof. Moacyr Dunham de Moura Costa, da Dra. Maria Cristina Lima Freire e do Dr. Fernando Lopes Santiago Junior, bem como do D. João Albany Costa e da Auxiliar de Laboratório Joana Cardoso de Oliveira.

REFERÊNCIAS

- Brogden K.A., Cutlip R.C. & Lemkubl H.D. 1984. Comparison of protection induced in lambs by *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell and cell wall vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 45:2393-2395.
- Brown C.C., Olander H.J., Biberstein E.L. & Morse S.M. 1986. Use of a toxoid vaccine to protect against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 47:1116-1119.
- Cameron C.M., Minnar J.L., Engelbrech M.M. & Purson R. 1972. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 39(1):11-24.
- Cameron C.M. & Fuls W.J.P. 1973. Studies on the enhancement of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 40(3):105-113.
- Cameron C.M. & Bester F.J. 1984. An improved *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine for sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 51:263-267.
- Nairn M.E., Robertson J.P., Middleton H.D. & McQuada N.C. 1982. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. *Proc. Int. Conf. Goat Prod. Dis., Tucson, Arizona*, p. 455-457.