

Nº 21 ago/97 p.1-3

**TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMÓLISE SINÉRGICA (IHS) COMO INSTRUMENTO NO
CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA**

Francisco Selmo Fernandes Alves¹
Raymundo Rizaldo Pinheiro²
Patrícia Carneiro Pires³
Maria das Graças Marques⁴

O teste de IHS foi desenvolvido na Califórnia para detecção de infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cavalos (Knight 1978). No Nordeste do Brasil, Brown et al. (1986) utilizaram o teste de IHS em 272 animais, dos quais 196 eram caprinos e 76 ovinos. Os resultados demonstraram uma soropositividade de 98% em caprinos com abscessos, 28% de caprinos sem abscesso, 96% de ovinos com abscesso, e 10% em ovinos sem abscesso. O teste baseia-se na interação da exotoxina do *Corynebacterium pseudotuberculosis* (fosfolipase D) com a exotoxina do *Rhodococcus equi* (fosfolipase C), para a formação de hemólise em placas, contendo meio de cultura (ágar base) e hemáceas previamente sensibilizadas, desde que na ausência de anticorpos (anti-toxina *C. pseudotuberculosis*). Em presença do anticorpo a toxina o reconheceria não podendo assim, reagir com a exotoxina do *Rhodococcus equi*, conseqüentemente, não haveria halo de hemólise em placa, daí a indicação de que o animal tem a antitoxina produzida pelo *C. pseudotuberculosis*.

Esse é um dos muitos testes para a detecção de infecção por *C. pseudotuberculosis*. Entre outros, configuram o teste desenvolvido por Carne (1940), utilizando-se do mesmo princípio do teste de Schick (para pesquisa do *Corynebacterium diphtheriae*), sem obter resultados convincentes; o teste de AHI (Anti- β -Hemolysis Inhibition), com sensibilidade de 92% e especificidade de 96% (Zaki 1968); o teste de precipitação em gel; o ELISA, com sensibilidade comparável ao IHS; e o DOT BLOT (Vaseih, 1990) que se utiliza da reação antígeno-anticorpo em membrana de nitrocelulose.

Até o presente momento, foram pesquisados 154 animais caprinos no período de 7 de dezembro/95 a 15 de janeiro/96, provindos de quatro fazendas distintas com diferentes sistemas de manejo.

A Linfadenite Caseosa (LC), doença mundialmente endêmica entre rebanhos de caprinos e ovinos, representa grandes perdas econômicas, decorrentes de lesões na

¹Méd. Vet., Ph.D., Pesquisador da Embrapa -CNPQ

²Méd., Vet., M. Sc., Pesquisador da Embrapa -CNPQ

³Bolsista PIBIC/CNPq/ Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

⁴Bolsista Embrapa/CNPQ/ Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

pele e órgãos (devido a abscessos), queda na produção leiteira, problemas reprodutivos e emagrecimento crônico do animal. A LC é provocada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bactéria piogênica que provoca necrose tecidual, de alta virulência e patogenicidade.

O teste de IHS é prático, simples e sensível para a detecção de antitoxina da bactéria, tendo como base científica a hemólise provocada pela reação da exotoxina do *Corynebacterium pseudotuberculosis* com a exotoxina do *Rhodococcus equi*.

O desenvolvimento e a aplicação do teste IHS, em rebanhos caprinos e ovinos no Nordeste, oferecem aos técnicos e produtores a possibilidade de intervir no processo de proliferação da doença, bem como possibilitam que o produtor determine o destino dos animais soropositivos para LC. Esse exame laboratorial tem sido bem aceito por ser um teste de fácil manuseio, simples e, relativamente, barato. A especificidade do teste é questionada, pois o mesmo pode detectar anticorpos formados em infecções passadas. Em um experimento de campo, o teste de IHS foi aplicado em animais com a doença natural, mostrando uma sensibilidade de 98% para caprinos e 96% nos ovinos. Os títulos de anticorpos permaneceram até o estágio subclínico da doença, o que implica que o IHS pode ser usado para detectar portadores infectados (Brown et al., 1986). Em caprinos infectados experimentalmente, o teste foi positivo em todos os animais que desenvolveram lesões.

Esta pesquisa tem por objetivo verificar a presença de anticorpos circulantes através do IHS para a exotoxina do *C. pseudotuberculosis*, em rebanhos de caprinos e ovinos. Os resultados obtidos com o IHS serão comparados com outro teste sorológico denominado DOT BLOT.

O teste sorológico utilizado foi o IHS, para verificar anticorpos para a exotoxina do *C. pseudotuberculosis* no sêro sanguíneo de caprinos.

Foram coletados, entre dezembro/95 e janeiro/96, os sêros sanguíneos de 154 caprinos, dos quais 104 pertencem à Fazenda Iracema em Quixadá-CE, 20 do CNPCaprinos, 16 animais pertencem à Fazenda Lagoa do Mucambo (Amontada-CE) e 14 são parte do rebanho da Fazenda Missí em Amontada-CE.

O teste é feito com sêro sanguíneo do animal a ser testado; placa de ágar-sangue contendo hemáceas sensibilizadas com exotoxina do *Rhodococcus equi*; solução tampão formolizada (BFS), e exotoxina de *C. pseudotuberculosis*, previamente titulada.

Na realização do teste, é aplicada a seguinte metodologia: 100µl do sêro animal a ser pesquisado são diluídos de forma a se obterem concentrações finais de 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; etc. A solução é formada por 50µl de BFS em cada orifício, excluindo-se o 1º de cada série onde ficaram 100µl da amostra sorológica a ser diluída. Após a diluição em BFS, adiciona-se a exotoxina de *C. pseudotuberculosis* (50µl) em todos os orifícios e deixa-se em repouso por 30 minutos. A solução, em todas as suas diluições, é absorvida por discos de papel filtro estéreis que, posteriormente, são colocados em placas de ágar-sangue, contendo hemáceas de sangue ovino lavadas e sensibilizadas com a toxina de *Rhodococcus equi*. As placas são incubadas a 37°C por 24 horas e a leitura interpretada após incubação. O halo de hemólise ao redor do disco é um indicador da ausência de anticorpos para a exotoxina de *C. pseudotuberculosis*.

Os animais positivos tiveram consideráveis variações nos títulos de anticorpos (anti-toxina *C. pseudotuberculosis*), destacando-se a Fazenda Lagoa do Mucambo, pela baixa incidência de LC, (03 animais positivos, de uma amostragem de 16 animais do plantel que apresentaram títulos de 1:2). A Fazenda Missí foi representada por 14 animais de um plantel de aproximadamente, 110 animais. Dos animais testados, 12

foram soropositivos, (06 dos animais com títulos de 1:2; 02 de 1:4; 03 com títulos de 1:8 e um com título de 1:16). Na Fazenda Iracema, a percentagem de soropositivos também foi elevada. De um total de 104, escolhidos aleatoriamente, 86 foram soropositivos, e destes, 20 tinham títulos de 1:2; 29 de 1:4; 12 de 1:8 e 25 com títulos \geq 1:16.

A distribuição da soropositividade e soronegatividade entre raças se dá conforme a seguinte tabela:

TABELA 1 - Resultados/Raças

Reação	Raças Moxotó	Canindé	¼ Anglo Nubiana	½ Anglo Nubiana	Brithia	Saanen	Pardo Alpina	Srd
Soropositivo	18	28	08	07	05	01	01	24
Soronegativo	05	02	06	02	03	-	-	15
Total	23	30	14	09	08	01	01	39

TABELA 2 - Resultados/Presença de abscessos

Abscesso	Shi Soropositivo	Soronegativo
Presente	18	10
Ausente	78	25

O teste de IHS tem demonstrado eficácia para detectar anticorpos circulantes para a exotoxina do *C. pseudotuberculosis* em animais com ou sem a presença de abscessos, criados em diferentes sistemas de produção.

LITERATURA CITADA

- BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; ZOMETA, C.; ALVES, S.F. Serodjagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. **American Journal Veterinary Research**, n.47, v.5, p.1116-1119, 1986.
- CARNE, H.R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, n.51, v. 2, p. 199-212, 1940.
- KNIGHT, H.D. A serological method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses. **Cornell Veterinary**, n.68, v.2, p.220-237, 1978.
- VASEIH, F.P. **Development of a DOT-BLOT assay for sero-diagnosis of caseous lymphadenitis, using a purified exotoxin as antigen**. Davis: University of California, 1990. Tese Doutorado.
- ZAKI, M.M. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* ovis infection. **Research in Veterinary Science**, n.9, p.489-493, 1968.