

Nº 20 ago/97 p.1-2

## ENSAIO SOROLÓGICO "DOT BLOT" NO DIAGNÓSTICO DA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS

Francisco Selmo Fernandes Alves<sup>1</sup>

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença infecciosa crônica e debilitante de caprinos e ovinos, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

O diagnóstico clínico da LC é feito através da observação de abscessos nos linfonodos superficiais, dos exames bacteriológicos do material caseoso colhido dos abscessos e, também, através de testes sorológicos. Estes são aplicáveis principalmente aos animais que não apresentam linfonodos enfartados.

Vários testes sorológicos têm sido utilizados para o diagnóstico da linfadenite caseosa. Entretanto, a maioria avalia a imunidade humoral causada pela exotoxina da bactéria. Dentre eles, citam-se: aglutinação indireta, hemo-aglutinação, inibição de anti-hemolisina, neutralização em pele de coelho, imunodifusão, Inibição de Hemólise Sinérgica (IHS), e o "Enzyme Linked Immunosorbent Assay", mais conhecido por **ELISA**. Estes ensaios têm demonstrado diferentes graus de sensibilidade e especificidade. O IHS está sendo utilizado na Embrapa CNPC, em virtude do seu baixo custo, de sua fácil aplicabilidade e de ter elevadas sensibilidade e especificidade, quando utilizado em caprinos e ovinos.

O teste ELISA é mais sensível que o ensaio de Inibição de Hemólise Sinérgica, quando se utiliza a toxina bacteriana e não a parede celular da bactéria. Entretanto, para a realização daquele ensaio, é necessário o uso de equipamento laboratorial sofisticado, inviabilizando a sua aplicabilidade a campo. Por outro lado, o ensaio DOT BLOT vem demonstrando similaridade em termos de sensibilidade e especificidade com os testes de IHS e ELISA.

O princípio do DOT BLOT é similar ao do teste de ELISA, exceto que no DOT BLOT utiliza-se membrana de nitrocelulose ao invés de placas de polietileno.

O objetivo deste estudo é avaliar o ensaio sorológico de DOT BLOT em caprinos adultos, com histórico de abscessos superficiais, e explorados em sistema semi-extensivo. Estão sendo utilizados 84 caprinos entre machos e fêmeas, mestiços (tricross), com idade entre dois e três anos, pertencentes ao rebanho da Embrapa CNPC.

As amostras de sangue são coletadas por venipuntura em tubos de vacutainer e processadas para obtenção de soro. A exotoxina é obtida em caldo de infusão de cérebro e coração, após 72 horas em cultura de *C. pseudotuberculosis*, incubada a

<sup>1</sup> Méd. Vet., PhD em Patologia Comparada, Pesquisador da Embrapa.CNPC

37°C em constante agitação. O meio de cultura é centrifugado e o caldo tóxico filtrado através de membrana de nitrocelulose, com 0,45 µm e 0,20 µm/poros.

O título da exotoxina é verificado utilizando o teste de IHS. O procedimento do teste baseou-se no corte da membrana (papel) de nitrocelulose em fitas medindo 0,5cm de largura por 2,0cm de comprimento. Aplica-se 2µl da toxina do *C. pseudotuberculosis* nas extremidades de cada fita, deixando secar à temperatura ambiente, e incuba-se por 30 minutos em solução a 5% de leite desnatado. A diluição de 1:8 de cada soro caprino em solução tamponada (Tris Buffer Saline) adicionada é incubada por 60 minutos. As fitas são lavadas duas vezes em (TBS-Tween20), a cada cinco minutos, e uma terceira vez em TBS. O conjugado peroxidase/anticorpo caprino IgG, feito em coelhos, é diluído a 1:500 em TBS, adicionado e incubado por 60 minutos. Ao final do período de incubação, as fitas são lavadas de acordo com o procedimento anterior. Para o desenvolvimento da reação antígeno-anticorpo-enzima, utilizou-se o reagente horseradish peroxidase contendo 4-cloro-1-naftol da Bio-Rad. O desenvolvimento da cor roxa no local onde a toxina é impregnada indica a presença de anticorpo, o que é considerado indicativo de infecção.

Observou-se um halo de hemólise com um título de 1:4, confirmando a produção da toxina. Foram testados 84 caprinos, sendo que 25 (29,8%), apresentaram reação positiva para o *C. pseudotuberculosis*.

O ensaio DOT BLOT demonstrou reação anticorpo específica com a exotoxina do *C. pseudotuberculosis* em membrana de nitrocelulose, indicando, provavelmente, a inexistência de reação cruzada. A prevalência aparente da infecção é indicada, mesmo não havendo isolamento do agente etiológico. Em função do teste de DOT BLOT ter sido realizado em animais naturalmente infectados, a identificação sorológica da infecção pelo *C. pseudotuberculosis*, neste caso, pode ser ou não a representação do *status* da doença no rebanho. Os animais sorologicamente positivos podem ter sido infectados previamente, ocorrendo persistência de anticorpos ou, também, terem sido infectados recentemente e, ainda, não desenvolveram clinicamente a doença.

A partir dos resultados, conclui-se que o ensaio DOT BLOT pode ser utilizado para identificar rebanhos infectados. Uma vez que os reagentes para o teste sejam preparados. Um grande número de amostras de soro podem ser avaliadas sem o uso de laboratório sofisticado. O procedimento é simples, rápido (tempo de 3-4 horas), de baixo custo e fácil aplicação em condições ambientais.