

Avaliação da presença de anticorpos anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos leiteiros do Território do Sisal, BA

Avaliation of antibody anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats milking of Sisal area in Estate of Bahia

*Raiane de Jesus Martins*¹; *Josir Laine A. Veschi*²; *Filipe Borges Carmo*³; *Vasco Azevedo*⁴; *Nubia Seyffert*⁴; *Anderson Miyoshi*⁴; *Roberto Meyer*⁵; *Ricardo Portela*⁵; *Rodolfo M. Peixoto*⁶; *Mateus Matiuzi da Costa*⁷; *Luiz Francisco Zafalon*⁸; *Aurora M. Guimarães Gouveia*³

Resumo

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa, de ocorrência mundial, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que acomete, principalmente, caprinos e ovinos. É uma enfermidade crônica e debilitante, caracterizada pela formação de abscessos em linfonodos superficiais e profundos, de difícil controle. Visando avaliar a presença de anticorpos desta bactéria em caprinos, foram utilizados 305 animais, independente de raça, com idade superior a 6 meses, provenientes de 25 rebanhos leiteiros, localizados em diferentes municípios que fazem parte do Território do Sisal no Estado da Bahia. As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular

¹Bolsista PIBIC CNPq/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

² Pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. E-mail: josi.veschi@cpatsa.embrapa.br.

³ Doutorando Universidade Federal de Minas Gerais / Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.

⁴ Professor da Universidade Federal de Minas Gerais / ICB, Belo Horizonte, MG.

⁵ Professor da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

⁶ Professor do Instituto Federal do Sertão, IF, Floresta, PE.

⁷ Professor da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE.

⁸ Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

e o soro sanguíneo obtido permaneceu a -20 °C até a utilização no teste de ELISA Indireto. O ponto de corte previamente estabelecido com base de cálculo na curva operacional relativa (ROC) foi fixado em 0,35 e diante disso, 27,54% dos animais avaliados apresentaram resultado positivo, ou seja, do total de 305 animais, 84 apresentaram anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis*. Em 54% dos rebanhos avaliados, existe pelo menos um animal positivo para a linfadenite caseosa. Desta maneira, pode-se concluir que 27,54% dos caprinos dos rebanhos leiteiros do Território do Sisal, Bahia apresentam anticorpos anti-*C.pseudotuberculosis* quando avaliados pela técnica de ELISA-I.

Palavras-chave: linfadenite caseosa, ELISA Indireto; diagnóstico sorológico, epidemiologia.

Introdução

A região Nordeste possui o maior rebanho de caprinos e ovinos do Brasil. Cerca de 60% destes animais estão localizados em pequenas propriedades. O Território do Sisal é formado por 20 municípios do Semiárido baiano onde vivem cerca de 555 mil habitantes e, destes, 63% residem em áreas rurais (SAYAGO, 2007). O sisal é a principal atividade econômica da região, entretanto, a caprino e a ovinocultura estão em crescente expansão neste Território. Com um rebanho de 247,244 mil cabeças de caprinos e 532,849 mil de ovinos (IBGE, 2006) o cenário produtivo da região está mudando. Parte significativa do rebanho caprino está voltada para a produção de leite, tornando a região num importante polo produtor de leite de cabra no Semiárido baiano (SAYAGO, 2007).

Mesmo com os avanços tecnológicos obtidos nos últimos anos, ainda existem importantes problemas sanitários que interferem na produtividade dos rebanhos de caprinos criados no Território do Sisal. Dentre eles destaca-se a linfadenite caseosa, que é uma doença infecto-contagiosa, de ocorrência mundial, que acomete principalmente caprinos e ovinos, caracterizada pela formação de abscessos em linfonodos superficiais e profundos, podendo acometer também alguns órgãos viscerais. É uma enfermidade crônica e debilitante causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que é uma bactéria Gram-positiva, parasita intracelular facultativa, capaz de sobreviver por longos períodos no ambiente (DORELLA et al., 2006). Por sua característica de elevada persistência no meio ambiente, a transmissão entre os animais do rebanho é bastante facilitada (BAIRD; FONTAINE, 2007). Estes fatores

tornam a LC uma enfermidade de difícil controle e responsável por importantes problemas sanitários nos rebanhos de ovinos e caprinos (SMITH; SHERMAN 1994).

A transmissão da LC ocorre principalmente através da pele, pelo contato de animais sadios com animais portadores de abscessos supurados (ALVES et al., 2007). As perdas econômicas decorrentes da LC ou mal do caroço são evidentes, principalmente por causa da diminuição da produção de leite e de carne, da desvalorização da pele decorrente de lesões e cicatrizes e do custo com medicamentos e mão-de-obra para tratamento dos animais acometidos (ALVES; PINHEIRO, 1997). Perdas importantes também ocorrem após o abate em que partes ou em carcaças inteiras que podem ser condenadas em razão da presença de abscessos causados por *C. pseudotuberculosis* (PAULE, 2003).

Mesmo a LC sendo uma enfermidade de grande importância, poucos estudos de levantamento sorológico foram realizados no Brasil, provavelmente, por causa das dificuldades nas técnicas de imunodiagnóstico. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença de anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis* em caprinos leiteiros do Território do Sisal, Bahia.

Material e Métodos

Foram utilizados 305 caprinos, de ambos os sexos, sendo fêmeas em sua maioria, já que são animais provenientes de rebanhos leiteiros, com idade igual ou superior a 6 meses, oriundos de 25 propriedades rurais localizadas em diferentes municípios do Território do Sisal, Bahia.

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular com a utilização de agulhas descartáveis, estéreis, em tubos tipo Vacutainer®. Após a coleta, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente até a completa retração do coágulo e foram, então, centrifugados para a obtenção do soro sanguíneo. As amostras de soro sanguíneo foram mantidas a -20°C até a posterior utilização no teste sorológico. As amostras de soro foram submetidas, individualmente e em duplicata, à técnica de ELISA Indireto para a detecção de anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis*.

Para a realização dos testes de ELISA-I, utilizou-se a metodologia descrita por Carminati et al. (2003): as microplacas de poliestireno com 96 poços foram sensibilizadas com antígeno de *C. pseudotuberculosis*,

diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6, incubadas a 4 °C/12 horas. Após as lavagens com PBS-T, as placas foram bloqueadas com PBS-T 5% de leite desnatado. A seguir foram incubadas com as amostras de soros a serem testadas, previamente diluídos a 1:100 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado. Após sequência de lavagens em PBS-T, adicionou-se imunoglobulina de coelho anti-imunoglobulina de caprino, conjugada a peroxidase, diluída a 1:10.000 em PBS-T e incubada. Em seguida, as placas foram novamente lavadas com PBS-T e incubadas com solução reveladora. As placas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida acrescentando-se H_2SO_4 . A leitura da reação foi feita em leitora de ELISA, usando-se filtro 450nm de comprimento.

A definição do ponto de corte foi feita por meio de curva ROC (Curva Operacional Relativa) segundo a metodologia utilizada por Seyffert et al. (2010), em que o valor da densidade óptica (DO) utilizado para o ponto de corte no presente estudo foi de 0,350.

Resultados e Discussão

As amostras de soro dos caprinos foram avaliadas pelo teste de ELISA-I para verificar a presença de anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis*. Das 305 amostras testadas, 221 não apresentaram anticorpos detectáveis pelo teste de ELISA-I, ou seja, 72,46% dos animais avaliados apresentaram resultado negativo ao teste. Entretanto, 27,54% dos caprinos testados, ou seja, 84 dos 305 animais avaliados apresentaram resultado positivo frente ao teste de ELISA-I. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Carmo et al. (2009) em caprinos do Estado do Ceará.

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados obtidos em cada uma das propriedades do Território do Sisal, Bahia que tiveram seus caprinos avaliados pelo teste de ELISA-I. Das 25 propriedades que tiveram caprinos testados, 13 (56,0%) delas apresentaram pelo menos um animal positivo ao teste de ELISA-I. Estes resultados são bastante distintos dos 98% obtidos nos rebanhos de Minas Gerais por Seyffert et al. (2010) e dos 82,7% obtidos por Carmo et al. (2009) no Estado do Ceará, ambos em caprinos.

Dos 305 animais testados, somente 27,54% apresentaram resultado positivo, valores que diferem dos obtidos por Seyffert et al. (2010) para o Estado de Minas Gerais, em que 78,9% dos animais avaliados apresentam anticorpos anti-*C.pseudotuberculosis*.

Vale ressaltar que são poucos os trabalhos publicados com levantamentos sorológicos de presença de anticorpos de LC em caprinos nos rebanhos do Brasil. Isto se explica por ser uma técnica de imunodiagnóstico de padronização difícil, validação demorada e metodologia de execução cara, além de necessitar de mão-de-obra especializada e de equipamento específico. Por esses motivos, este tipo de trabalho, muitas vezes, torna-se inviável.

Tabela 1. Identificação das 25 propriedades, número de animais testados em cada uma delas, resultado positivo e negativo dos testes de ELISA-Indireto de caprinos com as respectivas percentagens de anticorpos anti-*Corynebacterium. pseudotuberculosis*, em cada um dos rebanhos do Território do Sisal, BA.

Propriedade	N	Resultado do teste de ELISA indireto			
		Negativo		Positivo	
		Número	%	Número	%
H1	27	27	100	0	0
B1	13	12	92,31	01	7,69
E1	13	13	100	0	0
19	45	10	22,22	35	77,78
J.D (48)	13	12	92,31	01	7,69
EL (49)	13	02	15,40	11	84,60
EN (50)	4	03	75	01	25
SA (22)	12	12	100	0	0
J.A (21)	13	13	100	0	0
J (18)	13	12	92,31	01	7,69
E.A	13	13	100	0	0
J.TA (14)	11	11	100	0	0
EZ (16)	3	03	100	0	0
ZÉ (51)	13	12	92,31	01	7,69
J.T	13	13	100	0	0
EL (52)	13	11	84,62	02	15,38
15	13	12	92,31	01	7,69
AL (53)	13	07	53,85	06	46,15
J.P	8	07	87,5	01	12,5
JO	11	06	54,55	05	45,45
ODI	8	04	50	04	50
MO	10	03	30	7	70
G.A	6	01	16,67	05	83,33
IDR	3	01	33,33	02	66,66
J.N	1	01	100	0	0
Total	305	221	72,46	84	27,54

Conclusões

Em consequência da presença de anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis* em 27,54% dos animais avaliados e 56% dos rebanhos, conclui-se que a linfadenite caseosa está disseminada pelos rebanhos de caprinos leiteiros do Território do Sisal, Bahia.

Agradecimentos

Ao CNPq, ao IDR Sisal e à Embrapa Semiárido pelo apoio.

Referências

- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite caseosa**: recomendações e medidas profiláticas. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional de Agricultura, 1997. Disponível em: <<http://snagricultura.org.br/artigos/arttec-caprino.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2010.
- ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite caseosa**: o estado da arte. Sobral: Embrapa Caprinos, 2007. 60 p. (Embrapa Caprinos. Documentos, 74). Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/doc74.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2010.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, [Bristol],137, 179-210, 2007.
- CARMINATI, R.; BAHIA, R.; COSTA, L. F. M.; 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 diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas Biológicas**, Salvador, v. 2, n. 1, p. 88-93, 2003.
- CARMO, F. B.; GOUVEIA, A. M. G.; GUIMARÃES, A. S.; PAULETTI, R. B.; LAGE, A. P.; FERREIRA, F.; PORTELA, R. W. D.; PINHEIRO, R. R.; AZEVEDO, V. A. C.; HEINEMANN, M. B. Soroprevalência da linfadenite caseosa em caprinos em propriedades do Estado do Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25., 2009, Porto de Galinhas. **Resumos...** [São Paulo]: SBM, 2009. 1 CD-ROM.
- DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, [Les Ulis],v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.
- IBGE. **Censo agropecuário**. 2006. Disponível em: <www.abad.ba.go.br>. Acesso em: 15 jun. 2010.

PAULE, B. J. A. **Estudos de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e de suas interações com o hospedeiro caprinos**. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador.

SAYAGO, D. **Diagnóstico do Território do Sisal, BA**: preliminar. Brasília, DF: Agrofuturo, 2007. Disponível em: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:1G_1USvyTMAJ:www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/item/18585/1/agrofuturo%2520SISAL%2520diagnosticodoris.pdf+bid+1595/OC-BR.2007+sisal&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br. Acesso em: 16 jun. 2010.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. N. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, [Amsterdam], v. 88, n. 1, p. 50-55, 2010.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D. M. Caseous lymphadenitis. In: GOAT Medicine. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1994.