

**TESTE INTRADÉRMICO DE HIPERSENSIBILIDADE PARA DIAGNÓSTICO DA
LINFADENITE CASEOSA SUBCLÍNICA EM CAPRINOS**
**SKIN TEST FOR DIAGNOSIS OF SUBCLINICAL CASEOUS LYMPHADENITIS IN
GOATS**

Camila Azevedo Antunes¹, Alessandro de Sá Guimarães², Dayana Ribeiro³, Fernanda Alves Dorella⁴, Aurora Maria Guimarães Gouveia⁵, Marcos Xavier Silva⁵, Vasco Azevedo⁶, Núbia Seyffert⁴

1. Mestranda. Depto. de Biologia Geral, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais. E-mail: azevedoantunes.camila@gmail.com
2. Pesquisador. Sanidade Animal e Qualidade do Leite, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais.
3. Doutoranda. Depto de Microbiologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.
4. Pós-Doutoranda, Depto. de Biologia Geral, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.
5. Professor(a), Depto. de Medicina Veterinária e Preventiva, EV, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.
6. Professor, Depto. de Biologia Geral, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

PALAVRAS - CHAVE: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, pequenos ruminantes, Técnica de fracionamento em três fases.

ABSTRACT

Caseous lymphadenitis (CLA) is a disease caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* that affects small ruminants, decreasing the production in infected animals. Several methods for detection of subclinical CLA have been developed but without success. The present study has developed a Skin Test using secreted proteins of *C. pseudotuberculosis* for subclinical CLA diagnostic in small ruminants. The tested animals were divided into two different groups: 10 positives (A) and 10 negative goats (B) for CLA. The fraction of secreted proteins was obtained through Three-Phase Partitioning (TPP), diluted in PBS solution and then inoculated in the left cervical region, via intra-dermal. Inoculation of PBS solution without proteins was performed in the same tested animals at the right side. Group A showed higher hypersensitivity compared to group B during 6 days of evaluation, with a peak response after 24 hours. The standardized Skin Test showed promising results and might improve CLA control in herds.

KEYWORDS: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, small ruminants, Three-Phase Partitioning.

INTRODUÇÃO

A Linfadenite caseosa (LC) é causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e acomete principalmente pequenos ruminantes. Essa doença de importante relevância econômica é caracterizada pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais e/ou órgãos internos, reduzindo a produtividade dos animais infectados (DORELLA *et al.*, 2006; SEYFFERT *et al.*, 2010). O tratamento com antibióticos é uma estratégia inviável, uma vez que eles não são capazes de penetrar na cápsula dos abscessos. Quanto à imunoprofilaxia, a elaboração de vacinas mais eficazes torna-se necessária (DORELLA *et al.*, 2006). Vários métodos diagnósticos subclínicos para a LC foram desenvolvidos, mas nenhum deles com resultados promissores e praticidade necessária. Recentemente, proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* foram identificadas e caracterizadas por espectrometria de massa e análises *in silico* (PACHECO *et al.*, 2011). Essas mesmas proteínas já haviam demonstrado reatividade com anticorpos de caprinos infectados com *C. pseudotuberculosis* através de ELISA e Western Blot, além de induzirem elevada produção de interferon-gama por células sanguíneas de caprinos com LC (REBOUÇAS *et al.*, 2011). Este trabalho tem por objetivo padronizar e avaliar um Teste Intradérmico de Hipersensibilidade (TIH) com proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* para o diagnóstico subclínico da LC em caprinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cento e vinte e oito cabras de leite da raça Saanen foram avaliadas através de exames clínicos e sorológicos, e selecionadas em dois grupos constituídos de 10 animais positivos (grupo A) e 10 negativos (grupo B) para a LC. Paralelamente, para a preparação do reagente do TIH, a linhagem de *C. pseudotuberculosis* MIC6 foi cultivada em meio Infusão de cérebro e coração (BHI), as proteínas secretadas foram extraídas através da Técnica de Fracionamento em Três Fases (TPP) e quantificadas pelo método de Bradford. Posteriormente, o TIH foi padronizado e aplicado nos caprinos por via intradérmica na dose de 0,1mL na região cervical esquerda em uma área tricotomizada de 4cm². Nos mesmos animais foi aplicado 0,1mL de Tris-HCl (pH 8) sem as proteínas secretadas, na região cervical direita para controle do experimento. As mensurações do TIH foram realizadas com cutímetro Hauptner, antes da inoculação e a cada 24h, nos seis dias subsequentes.

RESULTADOS

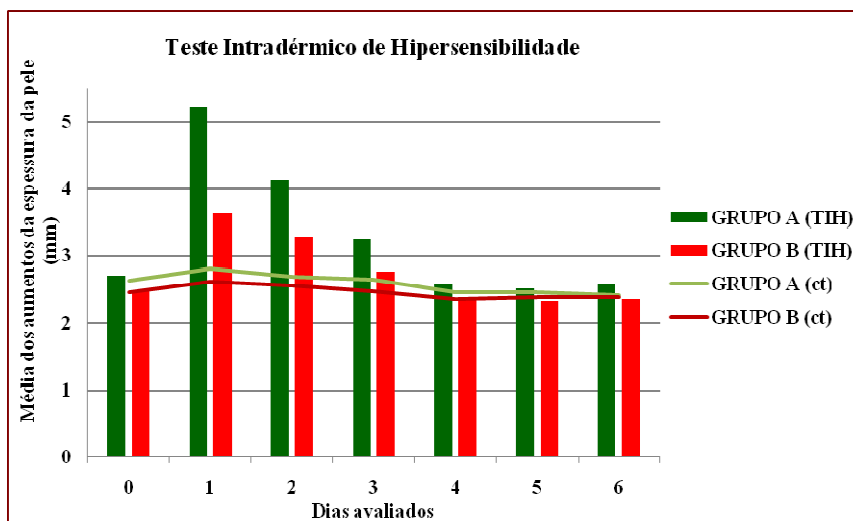


Gráfico 1 - Médias da espessura da dobra de pele antes (Dia 0) e após aplicação (Dias 1-6) do TIH nos Grupo A (ELISA positivo) e Grupo B (ELISA negativo), apresentado em barras verdes e vermelhas, respectivamente. As linhas verdes e vermelhas correspondem às médias do aumento da espessura da dobra de pele antes (Dia 0) e após aplicação (Dias 1-6) da solução controle nos dois grupos.

Os animais do grupo A apresentaram valores do TIH significativamente superiores aos do grupo B em todos os dias avaliados. Nas primeiras 24h houve um pico de reação, com maior evidência do grupo A, declinando até as 72h, com retorno à normalidade após 96h da aplicação do TIH. Todos os controles mantiveram seus valores semelhantes em ambos os grupos e ao decorrer dos dias avaliados.

DISCUSSÃO

O Teste Intradérmico de Hipersensibilidade (TIH) é um método de diagnóstico utilizado para verificar infecções causadas por microrganismos intracelulares facultativos com imunidade mediada por células. Esse teste tem vantagens relacionadas a facilidade de aplicação nos animais, a simplicidade de manuseio e um custo final relativamente reduzido comparando com o interferon gama (DE LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006). Neste trabalho padronizamos um TIH de proteínas secretadas antigênicas de *C. pseudotuberculosis* que obteve resultados significativos no grupo de animais positivos para a LC. Constatada a necessidade de purificação do antígeno de *C. pseudotuberculosis* para o TIH, com a remoção de componentes citoplasmáticos (BROWN *et al.*, 1986; ALVES & ORLANDER, 1999), a extração de proteínas secretadas para o TIH permitiu a obtenção de resultados mais eficientes. Além disso, todos os animais apresentaram exame clínico com estado geral e funções vitais normais antes e após a aplicação do teste. O THI estimula uma reação de hipersensibilidade

tardia (Tipo IV), geralmente sem manifestações sistêmicas, caracterizada por uma resposta inflamatória no local da aplicação do reagente (TIZARD, 2000). A reação do TIH medida pelo aumento da espessura da dobra de pele atingiu mensuração máxima em 24h após a inoculação, mostrando-se concordante com o indicado por Tizard (2000), caracterizado por uma resposta inflamatória que poderia atingir a sua maior intensidade entre 24 e 72 h. Em estudos anteriores, o menor tempo de mensuração máxima foi de 72h (ALVES & OLANDER, 1999). Assim, o presente estudo atingiu a mensuração significativa em apenas 1 dia. As mensurações referentes aos testes controles aplicados mantiveram seus valores semelhantes em ambos os grupos e no decorrer dos dias avaliados, apresentando somente uma reação à inoculação mecânica e ao tampão, as quais não foram significativas.

CONCLUSÃO

As proteínas secretadas e sua concentração para a utilização no TIH foram determinadas, bem como aplicação padronizada em caprinos. O TIH apresentou mensuração máxima em 24h, não apresentando reatividade significativa dos animais ao teste aplicado sem as proteínas secretadas. O TIH padronizado para diagnóstico subclínico da LC em caprinos, demonstrou resultados promissores e será aprimorado para utilização no controle da LC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. Uso de Vacina Toxóide no Controle da Linfadenite Caseosa em Caprinos. **Journal of Veterinary Sciencen**, v.5, n.1, p. 69-74, 1999.
- DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A. T.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; CHRISTIANSEN, K. H.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 81, p. 190-210, 2006.
- DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary. Research**, v. 37, p. 201–218, 2006.
- PACHECO, L.G.C.; SLADE, S.E.; SEYFFERT, N.; SANTOS, A.R.; CASTRO, T.L.P.; SILVA, W.M.; SANTOS, A.V, SANTOS, S.G.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.; PIMENTA, A.M.C.; MEYER, R.; SILVA, A.; SCRIVENS, J.H.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; DOWSON, C.G.; AZEVEDO, V. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Microbiology**, v. 1, p. 1-14, 2011.
- REBOUÇAS, M.F.; PORTELA, R.W.; LIMA, D.D.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B.L.; MOURA-COSTA, L.F.; VALE, V.L.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific interferon-gamma production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 1-6, 2011.
- 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. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, v. 88, 50–55, 2010.
- TIZARD, I.R. **Veterinary immunology**. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 2000. 482p.