



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**ROBSON BAHIA CERQUEIRA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL DE CAPRINOS  
INFECTADOS COM DUAS LINHAGENS DE  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* ATRAVÉS DE  
DIFERENTES TESTES ELISA INDIRETOS**

Salvador – Bahia

2006

**ROBSON BAHIA CERQUEIRA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL DE CAPRINOS  
INFECTADOS COM DUAS LINHAGENS DE  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* ATRAVÉS DE  
DIFERENTES TESTES ELISA INDIRETOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer

Salvador – Bahia

2006

## Ficha catalográfica

**ATA**

Dedico esse trabalho a José Almeida Cerqueira e Celeste Bahia Cerqueira pais amorosos e zelosos que identificaram na educação o maior legado para os filhos. Dedico também a Adelina Oliveira Bahia (*in memoriam*), avó amorosa que sempre acreditou nos netos.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Professor Roberto Meyer pelo estímulo e incentivo à pesquisa e a docência, contribuindo para formação de profissionais comprometidos com a educação e extensão.

## **AGRADECIMENTOS HONROSOS**

Ao amigo irmão Renato Carminati pela amizade, apoio, incentivo e companheirismo sempre.

A professora Lília Moura-Costa pelo carinho, apoio, incentivo, colaboração e co-orientação na concretização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS SINCEROS

A Deus pela presença constante em minha vida e por sempre demonstrar o caminho da fé e do respeito ao próximo.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio, incentivo e por estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida.

A professora Thereza Conceição Nunes Martinez que com seu profissionalismo, carinho e amizade mostrou-me o caminho da pesquisa e da ética. Expresso aqui meu reconhecimento e profunda gratidão.

Aos professores Edgar Aquino Viegas (*In memoriam*) e Simone Viegas pelo estímulo à pesquisa e à docência. Agradeço todo carinho e confiança demonstrados ao longo de minha formação.

A professora Darcy Pinheiro pelo incentivo a docência, pela colaboração, apoio e conselhos.

À Dra. Songeli Menezes Freire, Dra. Silvia Sardi e ao Dr. Gúbio Soares, por ter me orientado no início da minha caminhada no Laboratório de Imunologia.

Aos professores do Laboratório de Imunologia

A meus colegas do Labimuno (pesquisa), pela compreensão, incentivo e carinho, Vera Vale, Marcos Ribeiro, Lia Regis, Milene Salomão, Adriano Alcântara

A meus colegas do PPGIm, pela amizade e agradáveis instantes que estivemos juntos nesta caminhada.

A Dilcéia Reis Santana S. de Oliveira, Secretária do PPGIm, pela atenção, compreensão e apoio nos momentos que necessitei de seu auxílio.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia pelo apoio, colaboração e por tornar a execução deste projeto viável.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para que essa dissertação fosse concluída, meus sinceros agradecimentos.



O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

## RESUMO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. Esta doença, de curso crônico, caracteriza-se pela formação de granulomas nos linfonodos e em órgãos internos, como forma de resposta do sistema imune do hospedeiro à penetração deste agente que resiste à ação bactericida das células fagocíticas. Apesar da resposta imune envolver todos os componentes das imunidades inata e adquirida, a natureza dos antígenos protetores ainda é desconhecida. O presente estudo avaliou a resposta imune humoral a partir do soro caprino coletado de grupos de animais infectados com a linhagem atenuada T1, a linhagem virulenta VD 57 e um grupo controle inoculado com PBS-T. Esses grupos foram acompanhados durante 12 semanas e os níveis de anticorpos específicos foram avaliados por cinco diferentes ensaios imunoenzimáticos indiretos utilizando os antígenos MQD, TPP, BHI e as frações Q5 e Q6. A sensibilidade e especificidade do teste ELISA indireto Q5 foram de 97,8% e, 95,6% respectivamente e a sensibilidade e especificidade do teste ELISA indireto Q6 foi de 91,1% e 95,6%. Os testes ELISA indireto MQD, Q5 e Q6 apresentam uma capacidade de discriminação maior entre os animais infectados com uma linhagem selvagem VD 57 comparados aos animais infectados com uma linhagem atenuada T1.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ELISA, linfadenite caseosa, caprinos

## ABSTRACT

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiologic agent of caseous lymphadenitis in sheep and goats. This chronic disease is characterized by the formation of granulomas in lymph nodes and internal organs, as a response of the host's immune system against this bacterium who resists to the bactericidal action of fagocytic cells. Although the immune response involves both innate and acquired immunities, the nature of protection inducing antigens still is unknown. The present study evaluated the humoral immune response from samples of goat sera obtained from a group of animals infected from the lineage attenuated T1, the lineage virulent VD 57 the group control inoculated from PBS-T. These groups had been followed during 12 weeks and the levels of specific antibodies had been evaluated by five different indirect immunoenzymatic assays using antigens MQD, TPP, BHI and the fractions Q5 and Q6. The sensitivity and specificity of indirect test ELISA Q5 had been of 97,8% and 95,6% respectively and the sensitivity and specificity of indirect test ELISA Q6 were of 91,1% and 95,6%. The indirect tests ELISA MQD, Q5 and Q6 present a capacity of bigger discrimination between the animals infected with a wild lineage VD 57 compared with the animals infected with an attenuated lineage T1.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caseous lymphadenitis, goat, antigens, immune response.

## **LISTA DE TABELA**

Tabela 1: Valores da sensibilidade e especificidade para os testes ELISA

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 2: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 3: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 4: Média dos grupos ao longo do tempo após infecção

FIGURA 5: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 6: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 7: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 8: Média dos grupos ao longo do tempo após infecção

FIGURA 9: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 10: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 11: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 12: Média dos grupos ao longo do tempo após infecção

FIGURA 13: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 14: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 15: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 16: Média dos grupos ao longo do tempo após infecção

FIGURA 17: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 18: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 19: Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção

FIGURA 20: Média dos grupos ao longo do tempo após infecção

FIGURA 21: Curva Roc dos testes ELISA

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CLA	<u>C</u> aseous <u>L</u> ymph <u>A</u> denitis (Linfadenite Caseosa)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i> (Meio Mínimo Essencial)
MQD	Meio Quimicamente definido
NK cells	Células <i>“atural Killer</i>
OD/DO	<i>Optical Density</i> /Densidade ótica
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato com salina
PBS-T	Tampão fosfato com salina e Tween 80 (detergente)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLD	Fosfolipase D
RT-PCR	Reação em cadeia da Polimerase com <i>“ranscriptase Reverse</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (detergente)
T CD 4	Linfócito T apresentando a molécula CD 4 na superfície
T CD 8	Linfócito T apresentando a molécula CD 8 na superfície
T $\gamma\delta$	Linfócito T apresentando receptor heterodimérico $\gamma\delta$
Th1	Células T auxiliaadoras do tipo 1

Th2	Células T auxiliaadoras do tipo 2
TPP	<i>Three Phase Partitioning</i> (Técnica de Separação em três Fases)
Tween20	Detergente

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>20</b>
2.1	Etiologia	20
2.1.1	Evolução do agente etiológico	20
2.1.2	Aspectos bacteriológicos	21
2.1.3	Cultivo, isolamento e identificação	22
2.1.4	Interação com o hospedeiro	23
2.1.4.1	Lipídios de parede	23
2.1.4.2	Exotoxina – Fosfolipase D	24
2.1.4.3	Antígenos de <i>C. pseudotuberculosis</i>	26
2.2	Aspectos epidemiológicos	27
2.2.1	Prevalência e importância econômica	27
2.2.2	Transmissão	29
2.3	Aspectos clínicos e patológicos	30
2.3.1	Mecanismo da patogenia	30
2.3.2	linfadenite caseosa – doença clínica	31
2.4	Imunidade contra <i>C. pseudotuberculosis</i>	33
2.4.1	Imunidade inata	33
2.4.2	Imunidade adquirida	35
2.4.3	Indução da imunoproteção	36
2.5	Diagnóstico	38
2.6	Caráter ocupacional	40
<b>3.0</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1	Objetivo geral	41
3.2	Objetivos específicos	41
<b>4.0</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>42</b>
4.1	Amostras	42



4.2	Coleta das amostras	43
4.3	Antígenos	43
4.3.1	Produção do antígeno TPP em meio BHI	43
4.3.2	Produção do antígeno BHI	44
4.3.3	Produção do antígeno Q5 e Q6	44
4.3.4	Produção do antígeno MQD	45
4.4	Ensaio imunoenzimático indireto	46
4.4.1	ELISA indireto c/ ag secretado (BHI)	46
4.4.2	ELISA indireto c/ ag TPP	47
4.4.3	ELISA indireto C/ ag. Q5	48
4.4.4	ELISA indireto c/ ag Q6	49
4.5	Definição do ponto de corte	50
4.6	Estudo estatístico	51
<b>5.0</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>52</b>
5.1	Definição do ponto de corte Elisa	63
5.2	Comparação entre os testes ELISA	64
<b>6.0</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>7.0</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>72</b>
<b>8.0</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>73</b>
<b>9.0</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LAC) é uma enfermidade infecto-contagiosa dos pequenos ruminantes, equinos e ocasionalmente outras espécies, incluindo bovinos e humanos, de curso crônico, enzoótica e cujo agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Trata-se de um bacilo Gram positivo, intracelular facultativo, cujo principal fator de virulência é uma exotoxina, que é uma Fosfolipase D (HODGSON, 1999). Após penetrar no hospedeiro, o microrganismo é carregado pelas vias linfáticas aferentes aos linfonodos regionais, onde os granulomas característicos são formados. Os granulomas apresentam-se situados externamente, nos linfonodos periféricos, ou internamente, nos linfonodos profundos e órgãos. Os linfonodos mais acometidos são pré-escapular, parotídeo, submandibular, supramamário e poplíteo. O agente também está associado a mastite e pneumonia em caprinos e ovinos (UNANIAN e outros 1985; BROWN e OLANDER, 1987). A linfadenite caseosa está presente em países com grande atividade em ovino e caprinocultura, tais como Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos e Brasil. No Nordeste do Brasil, existe uma alta prevalência da doença nos rebanhos de caprinos, o que resulta em graves prejuízos econômicos para esta região (MOURA-COSTA e outros, 1973; UNANIAN e outros, 1985; BROWN, OLANDER E ALVES, 1987). A enfermidade evidencia significativa diminuição na produção de carne e leite, desvalorização da pele e aumento do custo de mão-de-obra destinados ao tratamento dos granulomas superficiais (ALVES e OLANDER, 1999). O controle

deve ser feito principalmente através do diagnóstico precoce e pela utilização de vacinas. A vacinação utilizando a exotoxina como antígeno tem demonstrado ser de grande utilidade para prevenir a infecção inicial da bactéria em ovinos (EGGLETON, 1991). No homem, tem caráter ocupacional acometendo médicos veterinários, criadores, tratadores e açougueiros (LOPEZ e outros 1966; PEEL e outros; 1997; MILLS e outros, 1997, BREGENZER e outros, 1997).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Etiologia

#### 2.1.1. Evolução do agente etiológico

*Corynebacterium pseudotuberculosis* foi isolado de um caso de linfangite bovina pelo veterinário francês Edmond Nocard, em 1888. Preisz e Guinard isolaram um germe similar de um granuloma renal de ovino e inicialmente o denominaram de bacilo de Preisz-Nocard, 1891. Dois anos depois, Nocard, ao estudar um caso de mormo eqüino, isolou uma segunda linhagem, com as mesmas características. Preisz em 1894 relatou melhor esse agente, comparando-o ao bacilo diftérico, denominando-o de *Bacillus pseudotuberculosis ovis*. Ebersson o classificou como differóide, passando a adotar o nome de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, em 1918 (MERCHANT e PACKER, 1980; CORRÊA e CORRÊA, 1992).

A sociedade Americana de Bacteriologia, no ano de 1923, passou a adotar a expressão *Corynebacterium* como nome do gênero, sendo o microrganismo então renomeado *Corynebacterium ovis*. A partir da sexta edição do manual Berguey em 1948, passou-se adotar a denominação atual de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (BENHAM, SEAMAN e WOOBIDINE, 1962; MERCHANT e PACKER, 1975; CORRÊA e CORRÊA, 1992).

O termo “pseudotuberculosis” tem origem no prefixo pseudo que significa falso e “tubérculo” que exprime a idéia de granuloma, manifestação patológica de infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis*. Desta forma *C. pseudotuberculosis* é um pequeno bacilo que produz lesões semelhantes às da tuberculose (BROWN e OLANDER, 1987).

O gênero *Corynebacterium* pertence à família *Actinomycetae*, assim como os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Os resultados de hibridização DNA-DNA, assim como o estudo da seqüência do RNA ribossômico, mostram que *Corynebacterium pseudotuberculosis* pertence ao mesmo grupo que *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (TAKAHASHI e outros, 1997).

### **2.1.2. Aspectos bacteriológicos**

*C. pseudotuberculosis* é caracterizado como um bacilo Gram positivo, mesofílico, imóvel, não esporulado, anaeróbico facultativo, com dimensões que variam entre 0,5-0,6 µm de diâmetro e 1-3 µm de comprimento. Apresentam-se individualmente, em pares ou paliçadas e sob as formas cocoides, bacilares e filamentosas. Algumas espécies possuem grânulos metacromáticos que são reservas de fosfatos de elevada energia (BIBERSTEIN, 1971).

O microrganismo é identificado por provas bioquímicas como: fermentação de carboidratos sem produção de gás, como glicose, ribose, trealose, produção de catalase, produção de urease, redução de nitrato a nitrito e apresentam-se variáveis quanto a fermentação da maltose e lactose (MUKLE e GYLES, 1982; SONGER e outros, 1988). Não hidrolisam a gelatina nem digerem a caseína por não ter atividade proteolítica (MERCHANT e PACKER, 1975; QUINN e outros, 1994). As diferenças entre os resultados em algumas provas bioquímicas, principalmente naquelas de fermentação de carboidratos é atribuída aos diferentes métodos usados por diversos pesquisadores, bem como, a existência de pequenas variações entre as linhagens existente (SONGER e outros, 1988). Trabalhos sugerem a existência de dois biovares isolados em diferentes espécies. Uma linhagem isolada em eqüinos

que reduzem nitrato a nitrito e linhagens isoladas de caprinos e ovinos que não possuem esta característica.

### **2.1.3. Cultivo, Isolamento e identificação**

São microrganismos exigentes do ponto de vista nutricional, apresentando bom crescimento em meios enriquecidos como Agar sangue, Agar ou caldo BHI (Infusão de coração e cérebro) ou meios enriquecidos com soro animal ou proteínas vegetais (CAMEROM e SWART, 1965).

O crescimento da bactéria em meio líquido apresenta uma película na superfície, enquanto o resto do meio fica transparente (MERCHAM e PACKER, 1975; MUCKLE e GYLES, 1982). Esta película é atribuída aos lipídeos de superfície e quanto mais densa, maior a virulência da linhagem (JOLLY, 1966). Por se tratar de uma bactéria mesofílica apresenta como temperatura ideal de crescimento 37<sup>0</sup>C por 48 horas em uma atmosfera de 5% de gás carbônico (BENHAM, SEAMAN e WOOBIDINE, 1962; MUKLE e GYLES, 1982; SELIM, 2001).

No Agar sangue são formadas colônias pequenas, de coloração branco acinzentadas, opacas e friáveis. Após vários dias de incubação, as colônias podem alcançar 3mm de diâmetro amarelo esbranquiçadas. Produzem hemólise do tipo beta, que aparece após 48 a 72 horas de incubação e o pH ideal para o crescimento em torno de 7,0 a 7,2 (BENHAM, SEAMAN e WOOBIDINE, 1962; MERCHAM e PACKER, 1975; QUINN e OUTROS, 1994).

A microscopia eletrônica caracteriza o *C. pseudotuberculosis* como uma estrutura similar a outras espécies do gênero na aparência da parede celular,

membrana plasmática, material genético, matriz citoplasmática e complexidade dos sistemas de membrana intracitoplasmática (HARD, 1969).

Algumas características bioquímicas foram propostas para identificar *C. pseudotuberculosis* dentro do grupo das corynebactérias: a atividade pirazinamidase negativa, própria de *C. pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, as atividades urease e fosfolipase D positivas, próprias de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* e a atividade de fermentação do amido (ROGOSA e outros, 1974; MUCKLE E GYLES, 1982).

#### **2.1.4. Interação com o hospedeiro**

Apesar do processo patogênico provocado pelo *C. pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos não estar completamente definido, pelo menos dois determinantes principais de virulência foram identificados. Um deles é exotoxina fosfolipase D e o outro é a parede lipídica tóxica ( WALKER e outros, 1994; PEPIN e outros, 1999).

##### **2.1.4.1. Lipídios de Parede**

Em *C. pseudotuberculosis*, a presença de lipídios na parede representa cerca de 5 a 8 % do peso da célula bacteriana e é responsável por propriedades culturais como a formação de colônias circulares e crescimento em meio líquido (HARD, 1969).

Uma relação entre virulência e quantidade de lipídeos na parede de *C. pseudotuberculosis* foi demonstrado em infecções experimentais, tanto em camundongos como em ovinos (BURREL, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983). Nos dois casos, houve alta relação entre conteúdo lipídico das linhagens testadas e sua

capacidade de formar granuloma. Os lipídeos celulares das bactérias tem características piogênicas e este fator de virulência está associado à formação de granulomas (WILLIANSO, 2001).

*C. pseudotuberculosis* possui lipídios integrados á parede celular, a semelhança do ácido micólico presente em *Mycobacterium tuberculosis*, muito embora *C. pseudotuberculosis* não seja álcool-ácido resistente. À presença destes lipídios, é atribuído ao crescimento padrão em meio líquido, sob a forma de flocos característicos (JOLLY, 1966). A presença desta camada dificulta a fagocitose da bactéria, aumentando sua virulência, bem como, estão relacionados à citotoxicidade (BATEY, 1986; SONGER e outros, 1990).

A ação deletéria destes lipídios pode ocorrer de duas formas diferentes e se aproxima das descritas para os lipídios de parede do *Mycobacterium* : ação tóxica direta sobre as células fagocitárias e resistência à ação bactericida de células fagocitárias (MUCKLE e GYLES, 1983<sup>a</sup> e 1983b).

#### **2.1.4.2. A Exotoxina**

A fosfolipase D (PLD) de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bactéria intracelular facultativa, é uma proteína catiônica de 31 kDa capaz de hidrolisar a esfingomielina, um componente importante de membrana citoplasmática, em colina e fosfato de ceramida (JOLLY, 1965b; CARNE e ONON, 1978;). A colina é liberada, enquanto o fosfato de ceramida fica associado à membrana (CARNE e ONON, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983).



Essa proteína é capaz de lisar eritrócitos de carneiro em sinergismo com as enzimas colesterol oxidase e a fosfolipase C produzidas por *Rhodococcus equi*. Esta ação sinérgica decorre da ação da fosfolipase D sobre a esfingomielina produzindo colina e fosfato de ceramida. Este, por sua vez, sofre ação da fosfolipase C de *Rhodococcus equi*, produzindo ceramida. A degradação de esfingomielina a ceramida resulta em lise celular (BROWN e OLANDER, 1987).

No ágar sangue a ação da PLD leva a formação de uma zona de hemólise. A PLD é capaz de inibir a hemólise causada pela toxina b de *Staphylococcus aureus* e de aumentar a hemólise causada pelo *Rhodococcus equi*, o agente causal de piogranulomas em pulmões de eqüinos (SONGER, 1997).

Várias atividades biológicas são atribuídas a fosfolipase D. As propriedades de hemólise em sinergia com a colesterol-oxidase e a fosfolipase C de *Rhodococcus equi* e a capacidade de resistência à hemólise pela toxina beta estafilocócica (BURREL, 1979; SONGER, 1997; SONGER, 1988), permitiram o surgimento de dois testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-exotoxina (teste da inibição da ação anti-hemolisina e teste da inibição da hemólise sinérgica), além do teste para dosagem da exotoxina no sobrenadante de cultura (ZAKI, 1968; KNIGHT, 1978). Estas atividades enzimáticas foram relacionadas com a toxicidade da fosfolipase D em camundongos (SUTHERLAND e outros, 1989). Outras atividades biológicas da fosfolipase D foram associadas à formação de necrose após injeção intradérmicas (GOEL e SINGH, 1972; MUCKLE e GYLES, 1983), assim como à aderência a eritrócitos (BROGDEN e outros, 1990).

### **2.1.4.3. Antígenos de *C. pseudotuberculosis***

As pesquisas de antígenos de *C. pseudotuberculosis* que induzem resposta humoral vem sendo realizado através de técnicas como ELISA e “Western blotting”. Os antígenos pesquisados geralmente são produzidos a partir da lise da bactéria através da sonicação, inativação de células inteiras ou utilização direta do sobrenadante da cultura (VALE, 2000).

ELLIS e outros (1991a) em estudos de proteínas ligadas à bactéria através da técnica de “western blotting”, verificaram que 40 soros de ovinos naturalmente infectados, submetidos a proteínas extraídas da cultura sonicada, obtiveram uma predominância de proteínas com pesos moleculares 20KDa, 22KDa, 4KDa, 31,6KDa, 35,5KDa, 36,3KDa, 39,8KDa, 45,7KDa, 56,2KDa, 63,1KDa, 79,4KDa e 100KDa reconhecidas por anticorpos presentes no soro.

ELLIS e outros, 1991b, em trabalhos posteriores observaram que soros de ovinos imunizados reconheciam pelo menos oito antígenos celulares através do “Western blotting”, incluindo as bandas de 12KDa, 25,1KDa, 31,6KDa, 36,3KDa, 39,8KDa, 63,1KDa, 70KDa, 75KDa, 79,4KDa.

MUCKLE e outros, 1992, verificaram uma expressiva resposta humoral contra diversas frações protéicas (120KDa, 68KDa e 31,5KDa) de antígeno produzido a partir da lise da parede celular, contra células inteiras mortas e contra sobrenadante de cultura.

O principal antígeno reconhecido por anticorpos presentes no soro de animais infectados é a fosfolipase D, correspondente à fração protéica de 31,5KDa (ELLIS e outros, 1990; COSTA, 1998)

Trabalhos realizados no laboratório de Imunologia-UFBA confirmaram a presença de proteínas somáticas que reconheçam anticorpos de cabras naturalmente infectadas (PAULE e outros, 2003b).

## **2.2. Aspectos epidemiológicos**

### **2.2.1. Prevalência e importância econômica**

O *C. pseudotuberculosis* está muito difundido pelo mundo, principalmente em alguns países como Austrália, Argentina, Nova Zelândia, África do Sul e regiões ocidentais dos Estados Unidos, onde existe uma grande criação de ovinos (MERCHANT e PACKER, 1980). Foi descrita também em países que possuem significativa população de caprinos e ovinos como: Grã-Bretanha, Noruega, Holanda e Brasil (ANDERSON e NAIRN, 1984), Egito, Índia, Turquia, Sudão, França e Canadá (BATEY, 1986b).

No Paquistão, relatou-se o *C. pseudotuberculosis* como agente etiológico da linfadenite caseosa em camelos (AFZAL e SAKIR, 1996). Contudo, o caráter insidioso da manifestação clínica da doença, associado à forma essencialmente crônica da patogenia e à sintomatologia pouco específica, a presença de outros agentes etiológicos, responsáveis também pela formação de piogranulomas, como *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp* tem contribuído para disseminação da enfermidade (UNANIAN e outros, 1985; ARSENAULT e outros, 2003).

Deve ser levado em conta que, na maioria dos inquéritos epidemiológicos, os dados baseiam-se em animais provenientes de abatedouros, o que pode ocasionar

uma redução na apresentação dos animais clinicamente doentes (BROWN e outros, 1987, UNANIAN e outros, 1985).

A infecção por *C. pseudotuberculosis* proporciona uma comprovada redução da produção de leite em rebanhos caprinos, devido à alta prevalência de granulomas mamários (BURRELL, 1981). Estudos australianos mostraram que esta infecção também reduz significativamente a produção quantitativa e qualitativa de lã, provocando perdas avaliadas em US\$15 milhões por ano (PATON e outros, 1988).

As perdas econômicas mais importantes são registradas no abate, quando parte ou até carcaças inteiras podem ser condenadas, havendo a necessidade de eliminar as partes comprometidas, o que gera atrasos nas linhas de abate e, conseqüentemente, perda de produtividade dos abatedouros. Tais perdas foram estimadas em aproximadamente US\$30 milhões por ano para a indústria de carne da Austrália (PATON, 1997).

Nas condições do Nordeste brasileiro, onde a venda da pele é um elemento de renda importante para o pequeno produtor local, estimou-se que a presença de defeitos superficiais reduziria o valor mercadológico das peles em até 40% (FIGUEIREDO e outros, 1982).

No Brasil, a doença é particularmente freqüente no Nordeste. Estima-se que a maioria dos rebanhos estão infectados e que a prevalência clínica atinge até 30% dos animais (COSTA e outros, 1974). O Nordeste brasileiro concentra aproximadamente 90% do rebanho caprino e 40% do rebanho ovino nacional. UNANIAN e outros, 1985, através de levantamento realizado em rebanho caprino no Ceará relataram que a linfadenite caseosa era responsável por 27,7 % dos granulomas encontrados em 41, 65% dos animais.

Moura-Costa e outros (1973), estudaram a distribuição geográfica da linfadenite caseosa nos rebanhos caprinos no estado da Bahia e relataram que a doença estava presente particularmente no norte do estado. Recentemente, em um estudo sorológico também na Bahia, demonstrou-se a presença de anticorpos séricos contra *C. pseudotuberculosis* em 46,6% dos caprinos estudados (MEYER, 2004).

### **2.2.2 Transmissão**

O modo de transmissão da linfadenite caseosa é bastante discutido. A inoculação mecânica através da pele foi associada à forma superficial da doença. Essa inoculação pode ocorrer pelo contato direto do material drenado de um granuloma com outro animal (SIMMONS et al, 1998).

Experimentalmente, demonstrou-se que esta bactéria é capaz de sobreviver até oito semanas no meio ambiente sem, no entanto, se multiplicar (AUGUSTINE E RENSHAW, 1986). Portanto, a alta persistência deste microorganismo no ambiente parece ser o principal fator responsável pela sua transmissão dentro de um rebanho.

A contaminação de cochos de alimentação e canziz de contenção foi relacionada à incidência de granulomas na cabeça e pescoço. Em ovinos criados para produção de lã a disseminação da bactéria nos plantéis pode ocorrer devido à contaminação do equipamento de tosquia (ELLIS e outros, 1987; PÉPIN e outros, 1999). O contato do animal com elementos contaminados do ambiente, como instrumentos ou soluções de banho ectoparasiticidas contaminados, o solo, a vegetação ou as fezes de animais infectados (CARNE, 1932; NAIRN E ROBERTSON, 1974).

Pesquisas mostraram a transmissão por aerossóis, de animais com infecções pulmonares para a pele lesada de animais recentemente tosados (PATON e outros, 1995). Outra possibilidade é a invasão de órgãos internos por liberação do agente

dentro da corrente sangüínea ou através da passagem pelo muco digestivo ou vaginal (BROGDEN e outros, 1984a; CAMERON, 1972a; NAGY, 1976). Por fim, a penetração do agente pela pele pode acontecer mesmo na ausência de lesões aparentes (PATON, 1997a).

Os artrópodes e as moscas também podem ser considerados como vetores passivos deste microrganismo ( ADDO, 1983; BRAVERMAN e outros, 1999).

Nos caprinos e ovinos criados nas condições extensivas do Nordeste brasileiro, supõe-se que grande parte da transmissão deve ocorrer pelo contato ou consumo da vegetação nativa contaminada e cuja característica espinhosa é altamente traumática para a mucosa oral e a pele. Ashfaq e Campbell (1979), realizaram trabalho sobre indução experimental da linfadenite caseosa em cabras e demonstraram que 100% dos animais infectados por inoculação subgengival apresentaram granulomas mandibulares.

UNANIAN e outros (1985), observaram a presença de granulomas superficiais nas regiões da cabeça e pescoço em cerca de 70% das 656 cabras acompanhadas durante dois anos no semi-árido brasileiro.

## **2. 3. Aspectos clínicos e patológicos**

### **2.3.1. Mecanismos de patogenia**

A patogenia da linfadenite caseosa não é completamente definida, mas dois fatores foram descritos como sendo responsáveis pela virulência de *C. pseudotuberculosis*. A camada lipídica, localizada na face externa da parede, cuja composição assemelha-se ao ácido micólico encontrado no gênero *Mycobacterium*. Estes lipídeos teriam uma ação letal sobre os macrófagos (HARD, 1975) e estudos

de microscopia eletrônica, utilizando macrófagos de caprinos, estabeleceram que, apesar de haver fusão entre lisossomas e fagossomas, *C. pseudotuberculosis* sobrevive dentro do macrófago (TASHJIAN E CAMPBELL, 1983).

Uma relação entre virulência e quantidade de lipídeos na parede de *C. pseudotuberculosis* foi evidenciada por infecções experimentais tanto em camundongos como em ovinos (BURRELL, 1978a; MUCKLE E GYLES, 1983). Nos dois casos, houve alta correlação entre o conteúdo lipídico das linhagens testadas e suas capacidades de formar granulomas.

O segundo fator reconhecido como importante para os mecanismos de patogenia de *C. pseudotuberculosis* é constituído por uma exotoxina descrita inicialmente por CARNE (1940). Trata-se de uma fosfatidilcolina fosfatidohidrolase, chamada de fosfolipase D que compromete as células do epitélio vascular, aumentando a permeabilidade capilar e favorece a disseminação do germe a partir do local inicial da infecção (CARNE E ONON, 1978, MUCKLE E GYLES, 1983).

A Fosfolipase D é um fator crítico de virulência do *Corynebacterium pseudotuberculosis* que atua na disseminação bacteriana e na sobrevivência no hospedeiro. A capacidade da antitoxina em abolir o aumento da permeabilidade vascular induzida pela PLD e reduzir a transferência da bactéria para os linfonodos e órgãos internos foi demonstrada primeiramente por JOLLY, 1965a; McNAMARA e outros, 1994).

Em conclusão, a contribuição relativa dos dois fatores de patogenia, descritos anteriormente, foi confirmada em experimentos realizados com camundongos por ZAKI (1976), que demonstrou que a exotoxina não era o fator piogênico e que anticorpos anti-toxina não impediam a formação de granulomas,

mas sim a disseminação do agente infeccioso no hospedeiro. Ele associou o fator piogênico a uma substância estável ao calor e associado à parede da bactéria.

### **2.3.2. Linfadenite caseosa – aspectos clínicos**

*C. pseudotuberculosis* é responsável pela formação de granuloma contendo material caseoso tanto nos linfonodos superficiais (mandibulares, parotídeos, retrofaríngeos, pré-escapulares, poplíteos e retromamários), como em vísceras (pulmões, fígado) e em linfonodos internos (mediastinais, lombares). Outros sítios menos comuns, como úbere, bolsa escrotal e articulações, foram descritos (MENZIES, 1998).

A localização dos granulomas depende, principalmente, da via de entrada do microrganismo, esta última dependendo, principalmente, do sistema de manejo utilizado. Por exemplo, em sistemas confinados, a transmissão pelas vias aéreas é predominante e proporciona um alto índice de granulomas internos torácicos (ARSENAULT e outros, 2003).

Alguns autores defendem a idéia que existem diferenças na localização dos granulomas entre caprinos e ovinos. Nos caprinos, os granulomas são encontrados, habitualmente, nos linfonodos externos da região da cabeça e do pescoço e, raramente, na metade posterior do corpo (AYERS, 1977). Nos ovinos, as lesões da cabeça e pescoço são raras e esta espécie seria mais susceptível à forma visceral da doença (PATON, 1997b).

As lesões granulomatosas são formadas por um centro necrótico contendo um pus de cor verde claro a amarelo, cercado por camadas concêntricas de células do sistema imunitário (macrófagos e, principalmente, linfócitos), e delimitadas por uma cápsula de tecido conjuntivo. A consistência do pus evolui de líquida, no início



da formação do granuloma, a pastosa, chegando até caseosa nas lesões antigas (PEPIN e outros, 1994).

## **2.4. Imunidade contra *Corynebacterium pseudotuberculosis***

A imunidade contra *C. pseudotuberculosis* parece ser complexa e tem sido o envolvimento dos dois mecanismos básicos, o mediado por células e o humoral (ELLIS e outros, 1991; LAN e outros, 1999).

### **2.4.1. Imunidade inata**

A principal reposta imune protetora contra as bactérias intracelulares é a imunidade mediada por células. Esta consiste de dois tipos principais de reações: morte dos microrganismos fagocitados em decorrência da ativação dos macrófagos pelas citocinas derivadas dos linfócitos, principalmente o IFN- $\gamma$  e a lise das células infectadas que é efetuada pelas células T citolítica (CD8<sup>+</sup>). As bactérias intracelulares são potentes indutores da diferenciação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> para o fenótipo Th1, pelo perfil de citocinas secretadas. Assim, observa-se a produção da IL-12 pelos macrófagos e o IFN- $\gamma$  pelas células NK e IL-2 pelos linfócitos T (ROITT e outros, 1999).

Nos primeiros estágios pós-infecção, os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas na resposta contra *C. pseudotuberculosis* (JOLLY, 1965a, HARD, 1969). A presença destes tipos celulares foi demonstrada como crítica no estabelecimento de uma resposta protetora à infecção primária e também secundária (LAN e outros, 1999).

Os macrófagos dos animais infectados apresentavam número maior de lisossomas e são capazes de resistir à ação necrosante da bactéria. Observou-se em estudos, que bactérias viáveis foram encontradas no interior dos macrófagos após 10 horas da infecção. Esta sobrevivência dentro do macrófago pode ser atribuída à capacidade de inibir a fusão do fagossoma ao lisossomo ou à inibição da ação de enzimas lisossomais.

A aparente incapacidade dos macrófagos em eliminar o agente patogênico pode ser atribuída à ausência de produção de óxido nítrico quando submetidos à estimulação com os componentes antigênicos de *C. pseudotuberculosis*, como sugeriram os estudos de Bogden e outros (1990), com macrófagos pulmonares ovinos. Sendo o óxido nítrico um potente agente efetor na eliminação de patógenos intracelulares (GREEN e outros, 1991), o fato de não haver produção deste agente em resposta aos componentes desta bactéria explicaria o desenvolvimento de infecções exclusivamente crônicas observadas em pequenos ruminantes.

Lan e outros, (1999), investigaram o papel do receptor de complemento do tipo 3 (CR3), na defesa primária e secundária do hospedeiro contra *C. pseudotuberculosis*. Este receptor é expresso por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B e desempenham papel chave na adesão, extravasamento, migração e fagocitose. O tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-CR3, resultou em multiplicação irrestrita da bactéria nos órgãos e levou ao aumento da mortalidade em camundongos infectados.

### 2.4.2. Imunidade adquirida

A resposta imune adquirida é iniciada quando a infecção supera os mecanismos de defesa inata. Esta resposta se torna efetiva somente após vários dias do início da infecção e envolve mecanismos humorais e celulares de proteção (JANEWAY e TAVARES, 2000).

Estudos imuno-histoquímicos demonstraram a composição e a dinâmica celular do granuloma na patogenia da linfadenite caseosa. Os granulomas são formados internamente de um centro necrótico cercado até a periferia, por uma zona de macrófagos e uma zona de linfócitos, limitado externamente por uma cápsula fibrótica. A zona de linfócitos é rica em linfócitos T CD4 e CD8, do lado adjacente à zona de macrófagos, e rica em linfócitos  $T\gamma\delta$  e B, do lado da cápsula fibrótica ( WALKER e outros, 1991; PÉPIN e outros, 1994).

A organização e composição celular dos granulomas provocados pela infecção por *C. pseudotuberculosis* são similares àqueles observados nas infecções por bactérias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (FLYNN e outros, 1993) ou *Listeria monocytogenes* (NAKANE e outros, 1989). Dentre os pontos comuns encontrados, destacam-se a predominância dos linfócitos T CD8 (MODLIN e outros, 1983), que atuam diretamente ou como células citotóxicas, ou como ativadoras de macrófagos via  $IFN-\gamma$  (KAUFMANN, 1988), ou ainda, indiretamente, podendo apresentar um fenótipo supressor (MODLIN e outros, 1983).

### 2.4.3. Indução da imunoproteção

A imunidade mediada por células é a principal resposta protetora do hospedeiro contra bactérias intracelulares. A atuação ocorre pela liberação de citocinas capazes de ativar os macrófagos levando à destruição dos microrganismos fagocitados e através da lise de células infectadas.

Estudos observaram que a imunidade passiva em camundongos, quando feita por transferência de soros hiperimunes de coelhos, era altamente protetora (CAMERON E ENGELBRECHT, 1971a), porém a proteção não era a mesma quando feita a partir de soros de ovinos vacinados com bacterina (CAMERON E BESTER, 1984).

Os primeiros ensaios que destacaram a importância da resposta celular na proteção contra infecções por *C. pseudotuberculosis* foram feitos por JOLLY (1965b). Ele mostrou que, no modelo murino, a resolução da infecção estava associada à presença de macrófagos ativados dentro da lesão.

Estudos mais recentes confirmaram o envolvimento da resposta celular e, mais especificamente, da indução de uma resposta Th1, que já foi demonstrada como sendo importante na resistência contra bactérias intracelulares facultativas (KAUFMANN, 1993).

Hogdson e outros (1992) registraram alta produção de Interferon- $\gamma$  por ovinos desafiados com cepas de *C. pseudotuberculosis* virulentas e REGIS (2001), obteve resultados idênticos com caprinos naturalmente infectados.

Numerosos testes de vacinação em ovinos e caprinos, utilizando diversas frações de *C. pseudotuberculosis*, foram publicados. Vacinas elaboradas a partir de fragmentos purificados de parede bacteriana ( BRODGEN e outros, 1984), de

sobrenadante de cultura detoxificado (JOLLY, 1965a; ANDERSON E NAIRN, 1984; BROWN e outros, 1986; ELLIS e outros, 1991b; ALVES E OLANDER, 1999), de bactérias inteiras mortas (BRODGEN e outros, 1984; CAMERON, 1972b e 1984) ou vivas (RIBEIRO e outros, 1991) e de misturas dos componentes celulares e do sobrenadante detoxificado (BURRELL, 1978b), foram desenvolvidas e testadas. Em todos os casos, níveis variáveis, porém significantes, de proteção foram alcançados. No entanto, a observação detalhada dos dados publicados mostraria que os experimentos com vacinas incluindo a fração secretada, proporcionaram resultados mais promissores.

Testes realizados com a fração toxóide, tanto em caprinos (ANDERSON E NAIRN, 1984; BROWN e outros, 1986; ALVES E OLANDER, 1999) como em ovinos (PATON e outros, 1995), mostraram níveis de proteção próximos ou acima de 80%. Por outro lado, estudos comparando a eficácia de vacinas incorporando as frações secretadas, celulares ou as duas, mostraram que a incorporação da fração celular não modificava o índice de proteção já induzido pela fração toxóide (BURRELL, 1978b).

Outros estudos, utilizando apenas a fração celular como imunógeno, também não foram capazes de induzir respostas imunes protetoras significativas (BRODGEN e outros, 1984b, 1996; MENZIES e outros, 1991).

Estudos pioneiros de Hodgson e outros (1992), confirmados em seguida por Simmons e outros (1998), com uma cepa tornada não virulenta pela deleção do gene da fosfolipase D, e responsável por uma resposta imunológica importante contra a linfadenite caseosa em ovinos, comprovaram a existência de outras estruturas antigênicas, além da PLD, envolvidos numa resposta imune protetora.

## 2.5. Diagnóstico

Em rebanhos endêmicos para linfadenite caseosa, a presença de granuloma superficiais é sugestivo para enfermidade. Por se tratar de uma doença crônica, o animal que não apresenta sinais clínicos evidentes, pode comportar-se como disseminador do *C. pseudotuberculosis*. O diagnóstico se torna, contudo, muito mais difícil no caso de animais portadores de lesões internas, o que conduziu ao desenvolvimento de numerosos testes sorológico para o diagnóstico desta enfermidade (WILLIAMSON, 2001).

A maior parte destes testes visa quantificar a resposta imune humoral, pela detecção quase que exclusiva de anticorpos anti-exotoxina. Teste como fixação do complemento (SHIGIDI, 1979), na capacidade de inibição de soros contra as atividades hemolíticas como teste de inibição da  $\beta$ -hemolisina estafilocócica (ZAKI, 1965) e teste de inibição da hemólise sinérgica (KNIGHT, 1978), na capacidade dermonecrótica, teste de inoculação intradérmica (CARNE, 1932) e teste de neutralização dérmica em coelho (DOTY e outros, 1964) e de letalidade em camundongos como teste de proteção em camundongo (ABDEL HAMID, 1975) atribuídas à fosfolipase D.

Numerosos testes foram desenvolvidos, como ELISA utilizando antígenos somáticos ou extracelulares obtidos por vários procedimentos (MAKI e outros, 1985; SUTHERLAND e outros, 1987; TER LAAK e outros, 1992; STING e outros, 1998; DERCKSEN e outros, 2000; KABA e outros, 2001). Resultados de SUTHERLAND e outros (1987) e STING e outros (1998) mostraram que ELISA à base de antígenos somáticos seriam mais sensíveis, porém menos específicos que ELISA utilizando a fração exotoxina.

No entanto, a utilidade destes testes para o diagnóstico ou como ferramenta para o descarte de animais positivos é um ponto permanente de discordância entre cientistas, técnicos e produtores. Os limites dos métodos sorológicos decorrem da escassez de informação sobre os mecanismos imunitários e da natureza dos antígenos envolvidos durante a infecção por *C. pseudotuberculosis* (PEPIN e outros, 1999). Portanto, os testes sorológicos até hoje oferecidos não permitem uma correta distinção entre animais portadores e curados, nem podem detectar animais com infecção subclínica, pois não existe relação entre títulos de anticorpos e intensidade da infecção (ELLIS e outros, 1991).

Medidas profiláticas foram adotadas com sucesso, depois de um monitoramento sorológico através do ELISA realizado na Holanda, país em que a prevalência era inicialmente baixa e sem vacinas comercialmente disponíveis (TER LAAK e outros, 1992; SCHREUDER e outros, 1994; DERCKSEN e outros, 1996).

De maneira similar ao que já foi implantado para diagnóstico de outras doenças envolvendo parasitas intracelulares facultativos (*Mycobactéria*, *Leishmania*), foram desenvolvidos testes laboratoriais para identificar animais com linfadenite caseosa, baseados na medição da resposta imune mediada por células.

Testes de pele com injeção intradérmica de “linfadenina” constituída de antígenos particulados (BROWN e outros, 1986) mostraram-se muito específicos e correlacionados à severidade da doença, ao passo que a utilização de “linfadenina”, com antígenos somáticos solúveis, mostrou baixa reatividade (RENSHAW e outros, 1979).

A utilização da dosagem de IFN- $\gamma$  como teste de detecção para infecção por *C. pseudotuberculosis* foi descrita (REGIS, 2001, PRESCOTT e outros, 2002, PAULE e outros, 2003) com resultados muito promissores, sendo um excelente marcador de

doença ativa (PAULE e outros, 2003), permitindo diferenciar animais vacinados de animais infectados (PRESCOTT e outros, 2002).

Estudo de prevalência para linfadenite caseosa em ovinos e caprinos na Turquia, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), com iniciadores específicos para *C. pseudotuberculosis* (ÇETINKAYA e outros, 2002), apresentaram alta especificidade e concordância com amostras onde o agente foi isolado.

## **2.6. Caráter ocupacional**

A linfadenite caseosa é uma doença presente nos rebanhos ovinos e caprinos dos cinco continentes. A sua prevalência é variável e suas conseqüências econômicas, apesar de reais, dificilmente são avaliadas devido ao fato de ser uma doença que não proporciona significativa mortalidade. Os mecanismos imunitários e a natureza dos antígenos envolvidos durante a infecção por *C. pseudotuberculosis* ainda são pouco conhecidos. Mais esforços de pesquisa são necessários para o aprimoramento de testes laboratoriais mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da linfadenite caseosa, e sobretudo, para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes, visando a erradicação da linfadenite caseosa, doença considerada uma zoonose profissional.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliação da resposta imunológica humoral de caprinos infectados com uma linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis* e caprinos infectados com uma linhagem atenuada da mesma bactéria, através de testes de ELISA indiretos, utilizando diferentes antígenos (BHI, TPP, MQD e frações Q5 e Q6).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a cinética da produção de anticorpos específicos contra *C. pseudotuberculosis* produzidos por caprinos infectados com a linhagem selvagem VD57 e a linhagem atenuada T1, ao longo de três meses;
  
- Avaliar a performance de ensaios imunoenzimáticos indiretos no monitoramento da infecção experimental de caprinos com *C. pseudotuberculosis* utilizando cinco diferentes antígenos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amostras

Foram utilizadas amostras de soros de caprinos da raça Canindé, mantidos no aprisco do Laboratório de Imunologia do ICS-UFBA e divididos em três grupos, conforme descrição abaixo:

Grupo 1: Animais inoculados com a linhagem atenuada T1 (9 animais);

Grupo 2: Animais inoculados com uma linhagem selvagem VD57 (7 animais);

Grupo 3: Animais inoculados com PBS (7 animais)

A linhagem T1 foi obtida após cultivo em caldo BHI. por 72 horas a 37<sup>0</sup>C de incubação, na qual a massa bacteriana foi centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos, após este tempo descartado o sobrenadante e a massa bacteriana ressuspensa em PBS estéril, onde este procedimento foi repetido duas vezes. A massa obtida foi suspensa em 2 ml de soro fisiológico para o procedimento de infecção experimental. A linhagem VD57, coletada de animal naturalmente infectado foi obtida seguindo o mesmo protocolo da linhagem T1.

Estas duas linhagens foram isoladas no interior do estado da Bahia, em caprinos infectados e criados a campo. O grupo infectado (G1) pela linhagem T1 foi composto de 9 animais (três fêmeas e seis machos), enquanto que os grupo 2 (G2, infectado pela linhagem VD 57) e o grupo 3 (G3 – controle, inoculado com PBS), foram compostos de 7 animais (uma fêmea e seis machos). Estes animais foram acompanhados ao longo de doze semanas, quanto à sua resposta imune humoral, através de cinco testes de ELISA indiretos.

A infecção dos grupos foi feita seguindo protocolo do Laboratório de Imunologia , sendo inoculado  $10^5$  UFC do lado esquerdo da região inguinal através de escarificação, e na região inguinal à direita foi feita injeção intradérmica de  $10^5$  UFC.

## **4.2. Coleta das amostras**

As amostras foram coletadas no dia zero e posteriormente de sete em sete dias, durante 12 semanas. O sangue foi coletado por punção da veia jugular e retirado aproximadamente de 5ml para produção do soro. Após formação do soro e separação por centrifugação, o mesmo foi congelado para posterior realização das provas sorológicas.

## **4.3. Antígenos**

### **4.3.1. Produção do Antígeno TPP em meio BHI**

A linhagem T1 foi obtida do antígeno secretado em caldo BHI. A bactéria foi cultivada em caldo BHI por 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação, a massa bacteriana foi eliminada por centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos e filtração do sobrenadante a vácuo em membrana Millipore  $0,45\ \mu\text{m}$ . A seguir realizou-se o fracionamento do sobrenadante em três fases, conforme técnica descrita por Paule e outros 2003. A dosagem protéica foi feita através do método de Lowry (Kit Bio-Rad), tendo sido usada soro albumina bovina como padrão. Foi obtida, de acordo com este método, uma concentração protéica de 1,02 mg/ml. O antígeno foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3.2. Produção do Antígeno BHI**

O antígeno foi obtido de uma linhagem isolada de um animal infectado naturalmente. O animal oriundo da região de Santa Luz, localizada no interior da Bahia. Vale ressaltar que esta cepa vem sendo mantida na coleção do Instituto de Ciências da Saúde e foi chamada T1.

A bactéria foi cultivada em caldo BHI por 48 h a 37<sup>0</sup>C. Após o período de incubação, a massa bacteriana foi eliminada por centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos, seguida pela filtração do sobrenadante a vácuo em membrana Millipore 0,45 m. A dosagem de proteína foi feita através do método Lowry (Kit Bio-Rad), sendo usada soro albumina bovina como padrão. Foi obtida, de acordo com este método, uma concentração protéica de 6,2 mg/ml. O antígeno mantido estocado a -20<sup>0</sup>C.

### **4.3.3. Produção do Antígeno Q5 e Q6**

Para obtenção das frações do antígeno secretado foi realizado o fracionamento em três etapas (Paule et al., 2003), o sobrenadante da cultura foi saturado com 30% de sulfato de amônia á temperatura ambiente, sob leve agitação. Depois que o pH 4.0 foi ajustado para o nível adequado pela adição de HCl concentrado, n-butanol na mesma proporção de volume de meio de cultura foi adicionado. Após agitação em vortex por 1 minuto e repouso por 1h, o anel protéico foi coletado e centrifugado a 1350 g durante 10 min e a interface precipitada foi coletada e dissolvida em volumes pequenos de tampão tris 20 mM, pH 7,4 (500 microlitros de extrato para 5 mL tampão).

O fracionamento do antígeno secretado foi feito por duas cromatografias de troca iônica. O primeiro fracionamento foi em uma coluna de troca aniônica (Mono Q HR 5\5), sendo o primeiro eluato (moléculas que não se ligaram à coluna) passado na coluna de troca catiônica (Mono S HR 5\5). A coluna de troca aniônica (Mono Q HR 5\5) foi eluída com tampão fosfato 0,5 mM, pH 7,4, fazendo-se após o primeiro pico um gradiente de eluição com solução de NaCl 1 M. O antígeno a ser aplicado na coluna foi dialisado por 48h a 5<sup>o</sup>C em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4. Uma vez a coluna equilibrada foi feita a aplicação do antígeno. O primeiro pico foi composto por proteínas que não se ligaram na coluna. Foi em seguida adicionada a solução de tampão com NaCl 1 M, ocorrendo mistura dos dois tampões, com 10% do tampão com NaCl e 90% do tampão sem NaCl. Assim obteve-se o segundo pico. No total, obteve-se sete picos, sendo o primeiro Q1 e os subsequentes Q2 a Q7, onde identificou-se as frações Q5 e Q6. Estas frações (Q) foram dialisadas contra tampão PBS 10 mM e liofilizadas.

#### **4.3.4. Produção do Antígeno MQD**

A produção do antígeno foi realizada conforme técnica descrita por Moura Costa e outros 2002. A bactéria foi ativada em caldo BHI por 48h até apresentar crescimento satisfatório. Em seguida foi feita a centrifugação a 3000g durante 15 minutos e o sedimento ressuspenso em PBS e adicionado a 200 ml do meio quimicamente definido contendo:  $\text{NA}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  4,22g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,14g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,25 g/L,  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  5 mg/L,  $\text{MgSO}_4$  50 mg/L, glicose 12g/L Tween 80 0,1% MEM Aminoacids Solution\* 2%, MEM Non Essential Aminoacids Solution\* 2%, MEM Vitamins Solution\* 2 % (\* Invitrogen, USA). A cultura foi mantida a 37<sup>o</sup>C por 48h.

Após o período de incubação, a massa bacteriana foi eliminada por centrifugação por 10 minutos a 3000g e filtração do sobrenadante a vácuo em membrana Millipore 0,22 µm. A dosagem protéica foi feita através do método de Lowry (Kit Bio-Rad), tendo sido usada soro albumina bovina como padrão. Foi obtida, de acordo com este método, uma concentração protéica de 1,02 mg/ml. O antígeno foi estocado a – 20°C.

#### **4.4. Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)**

Foram realizados testes ELISA indireto com amostras de soro dos grupos infectados, usando diferentes antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. As técnicas foram padronizadas e descritas seguindo protocolos do Labimuno.

##### **4.4.1. Elisa indireto com antígeno secretado (BHI)**

Foi realizado um teste ELISA indireto. Foram usadas, como fase sólida, placas de poliestireno de fundo chato (COSTAR 3590). A placa foi sensibilizada com 50:1 por poço do antígeno, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH9,6 para uma concentração final de 1:100 e incubado a 4°C por 12 horas em câmara úmida. A solução de sensibilização foi descartada e a placa lavada duas vezes com tampão de lavagem (PBS 0,05% Tween 20). Em seguida realizou-se o bloqueio com solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em PBS 0,05% de Tween 20 e incubado por 2 horas a 37°C. Após a incubação a solução de bloqueio foi descartada e a placa lavada 1 vez com tampão de lavagem (PBS-T 20). A seguir adicionou-se 50 µl do soro diluído 1:100 em PBS 0,05% Tween 20 Leite Molico 1% e

incubados por 1 hora a 37<sup>0</sup>C. Em cada placa foram usados como controle positivo um *pool* de soros positivos e como controle negativo soro de caprino recém nascido. Foi usado um branco contendo apenas o tampão de diluição. Cada soro e cada controle foram testados em duplicata. Após o tempo de incubação, os soros foram descartados e a placa lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS-T 20). Após a lavagem foram adicionados 50 µl/poço do conjugado imunoglobulina total de coelho anti-imunoglobulina de caprino (DAKO code no. P0160 Lot 038) marcado com peroxidase (HRP) diluído 1:10.000 e incubado por 45 minutos a 37<sup>0</sup>C. Após o tempo de incubação, descartou-se o conjugado e a placa lavada por cinco vezes com PBS-T 20. Foi usado como cromógeno a orto-fenilenodiamina (OPD- MERCK), adicionado 50:1/poço de solução reveladora (20 ml de tampão cítrico-fosfato pH 5,1 + 10 mg OPD + 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%). A placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida acrescentando 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. Em seguida realizou-se a leitura em leitor de ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) usando filtro de 490 nm de comprimento de luz.

#### **4.4.2. Elisa indireto com antígeno TPP**

Foram usadas, como fase sólida, placas de poliestireno de fundo chato, (COSTAR 3590). A placa foi sensibilizada com 50 µl por poço do antígeno, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH9,6 para uma concentração final de 0,5 µg/poço e incubado a 4<sup>0</sup>C por 12 horas em câmara úmida. A solução de sensibilização foi descartada e a placa lavada duas vezes com tampão de lavagem (PBS 0,05% Tween 20). Em seguida realizou-se o bloqueio com solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em PBS 0,05% de Tween 20 e incubado por 2

horas a 37<sup>0</sup>C. Após a incubação a solução de bloqueio foi descartada e a placa lavada 1 vez com tampão de lavagem (PBS-T 20). A seguir adicionou-se 50 µl do soro diluído 1:100 em PBS 0,05% Tween 20 Leite Mólico 1% e incubados por 1 hora a 37<sup>0</sup>C. Em cada placa foram usados como controle positivo um *pool* de soros positivos e como controle negativo soro de caprino recém nascido. Foi usado um branco contendo apenas o tampão de diluição. Cada soro e cada controle foram testados em duplicata. Após o tempo de incubação, os soros foram descartados e a placa lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS-T 20). Após a lavagem foram adicionados 50:1/poço do conjugado imunoglobulina total de coelho anti-imunoglobulina de caprino (DAKO code no. P0160 Lot 038) marcado com peroxidase (HRP) diluído 1:10.000 e incubado por 45 minutos a 37<sup>0</sup>C. Após o tempo de incubação, descartou-se o conjugado e a placa lavada por cinco vezes com PBS-T 20. Foi usado como cromógeno a orto-fenilenodiamina (OPD - MERCK), adicionado 50 µl/poço de solução reveladora (20 ml de tampão cítrico-fosfato pH 5,1 + 10 mg OPD + 10:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%). A placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida acrescentando 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. Em seguida realizou-se a leitura em leitor de ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) usando filtro de 490 nm de comprimento de luz.

#### **4.4.3. Elisa indireto com antígeno Q5**

Foram usadas, como fase sólida, placas de poliestireno de fundo chato, (COSTAR 3590). A placa foi sensibilizada com 50 µl por poço do antígeno, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH9,6 para uma concentração final de 0,5 µg/poço e incubado a 4<sup>0</sup>C por 12 horas em câmara úmida. A solução de



sensibilização foi descartada e a placa lavada duas vezes com tampão de lavagem (PBS 0,05% Tween 20). Em seguida realizou-se o bloqueio com solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em PBS 0,05% de Tween 20 e incubado por 2 horas a 37<sup>o</sup>C. Após a incubação a solução de bloqueio foi descartada e a placa lavada 1 vez com tampão de lavagem (PBS-T 20). A seguir adicionou-se 50 µl do soro diluído 1:100 em PBS 0,05% Tween 20 Leite Molico 1% e incubados por 1 hora a 37<sup>o</sup>C. Em cada placa foram usados como controle positivo um *pool* de soros positivos e como controle negativo soro de caprino recém nascido. Foi usado um branco contendo apenas o tampão de diluição. Cada soro e cada controle foram testados em duplicata. Após o tempo de incubação, os soros foram descartados e a placa lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS-T 20). Após a lavagem foram adicionados 50µl/poço do conjugado imunoglobulina total de coelho anti-imunoglobulina de caprino (DAKO code no. P0160 Lot 038) marcado com peroxidase (HRP) diluído 1:10.000 e incubado por 45 minutos a 37<sup>o</sup>C. Após o tempo de incubação, descartou-se o conjugado e a placa lavada por cinco vezes com PBS-T 20. Foi usado como cromógeno a orto-fenilenodiamina (OPD - MERCK), adicionado 50 µl/poço de solução reveladora (20 ml de tampão cítrico-fosfato pH 5,1 + 10 mg OPD + 10:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%). A placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida acrescentando 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. Em seguida realizou-se a leitura em leitor de ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) usando filtro de 490 nm de comprimento de luz.

#### **4.4.4. Elisa indireto com antígeno Q6**

Foram usadas, como fase sólida, placas de poliestireno de fundo chato, (COSTAR 3590). A placa foi sensibilizada com 50 µl por poço do antígeno, diluído

em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH9,6 para uma concentração final de 0,5 µg/poço e incubado a 4<sup>o</sup>C por 12 horas em câmara úmida. A solução de sensibilização foi descartada e a placa lavada duas vezes com tampão de lavagem (PBS 0,05% Tween 20). Em seguida realizou-se o bloqueio com solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em PBS 0,05% de Tween 20 e incubado por 2 horas a 37<sup>o</sup>C. Após a incubação a solução de bloqueio foi descartada e a placa lavada 1 vez com tampão de lavagem (PBS-T 20). A seguir adicionou-se 50 µl do soro diluído 1:100 em PBS 0,05% Tween 20 Leite Molico 1% e incubados por 1 hora a 37<sup>o</sup>C. Em cada placa foram usados como controle positivo um *pool* de soros positivos e como controle negativo soro de caprino recém nascido. Foi usado um branco contendo apenas o tampão de diluição. Cada soro e cada controle foram testados em duplicata. Após o tempo de incubação, os soros foram descartados e a placa lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS-T 20). Após a lavagem foram adicionados 50:1/poço do conjugado imunoglobulina total de coelho anti-imunoglobulina de caprino (DAKO code no. P0160 Lot 038) marcado com peroxidase (HRP) diluído 1:10.000 e incubado por 45 minutos a 37<sup>o</sup>C. Após o tempo de incubação, descartou-se o conjugado e a placa lavada por cinco vezes com PBS-T 20. Foi usado como cromógeno a orto-fenilenodiamina (OPD - MERCK), adicionado 50 µl/poço de solução reveladora (20 ml de tampão cítrico-fosfato pH 5,1 + 10 mg OPD + 10:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%). A placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida acrescentando 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. Em seguida realizou-se a leitura em leitor de ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) usando filtro de 490 nm de comprimento de luz.

#### **4.5 Definição do Ponto de Corte**

O ponto de corte foi feito através da curva ROC (Receiver Operator Characteristic) ou curva operacional relativa. Esta análise tem como base uma curva onde são colocados os valores de corte que tem no eixo das ordenadas a sensibilidade e no eixo das abscissas a taxa de falso positivo (1 - especificidade). O ponto de corte considerado ideal é aquele que permite uma maior especificidade sem perda da sensibilidade. De acordo com Greiner e outros (1995), esta análise deve ser utilizada para testes ELISA. Kaba e outros (2001), utilizaram esta análise para desenvolvimento de um teste ELISA para diagnóstico da linfadenite caseosa.

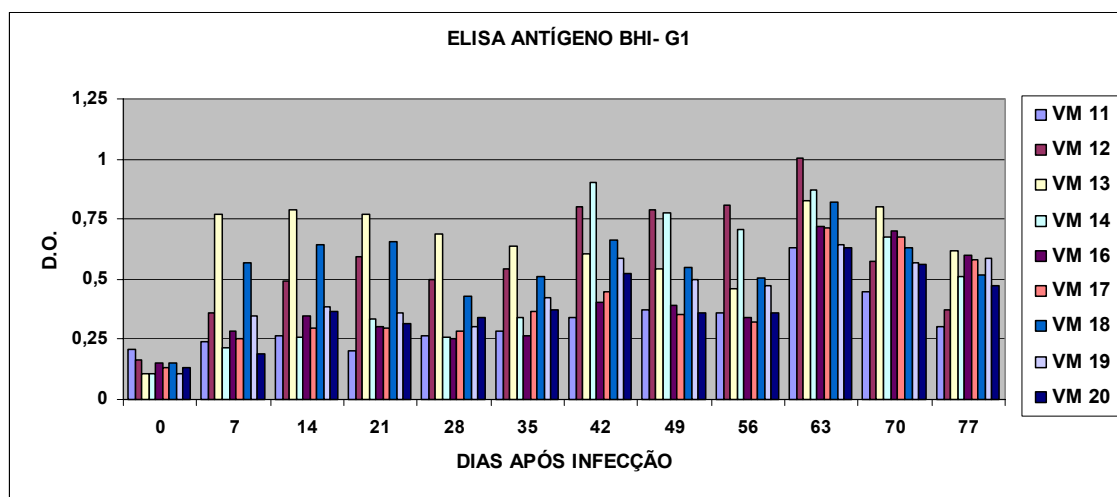
#### **4.6 - Estudo estatístico**

Os testes ELISA Q5 e Q6 foram comparados por determinação do índice concordância Kappa. A curva ROC foi construída para os dois testes ELISA. Os diferentes antígenos BHI, TPP, MQD, Q5 e Q6 e os grupos foram comparados por análise de variância (Anova). O programa utilizado para esta análise estatística foi o SPSS 12.0.

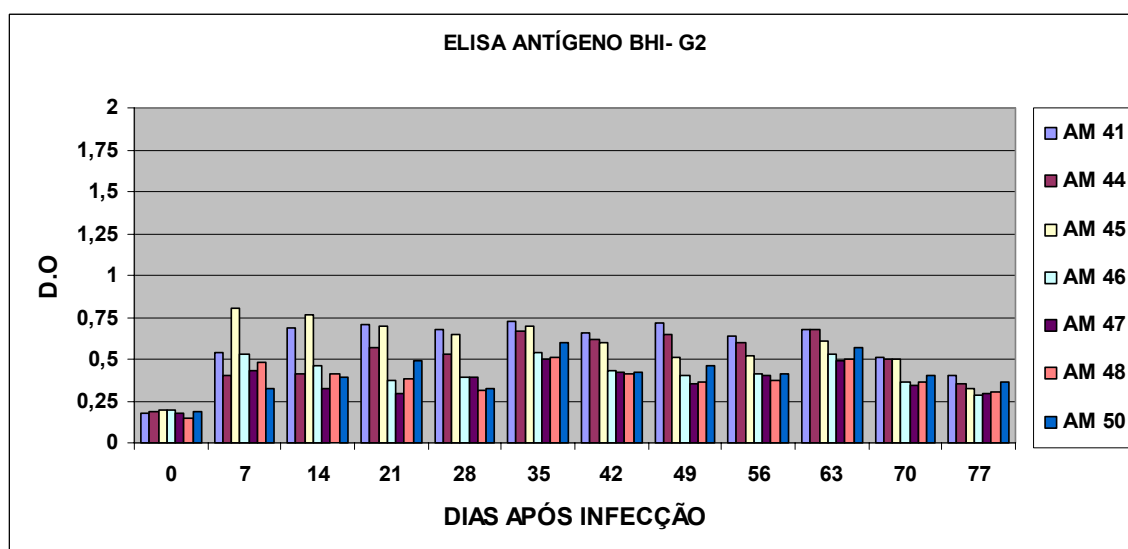
## 5. RESULTADOS

Neste trabalho foi feito o acompanhamento de dois grupos experimentais e um grupo controle de caprinos, sendo dois deles infectados com diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis*: a linhagem T1, naturalmente atenuada (Vale e outros, dados não publicados) e a linhagem selvagem VD 57. Nos dois grupos infectados deste experimento, constatou-se através de todos os ensaios imunoenzimáticos indiretos utilizados, ao longo das 12 semanas dos experimentos, valores de D.O. maiores nos grupos infectados que no grupo controle.

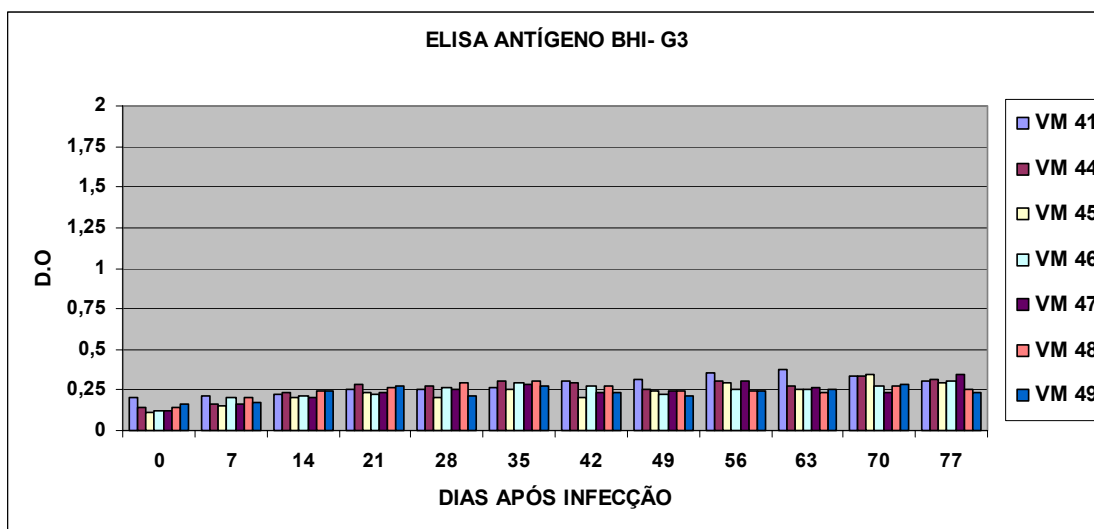
Observou-se que o G1 e G2 no ELISA BHI apresentaram níveis distintos de resposta anticórpica, sendo tais diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ), conforme figuras 1 e 2, onde se observa maiores valores de D.O. nos animais do que no G3 (figura 3). Verifica-se que o G1 passou a apresentar níveis detectáveis de anticorpos a partir do sétimo dia após infecção, tendo um novo aumento no dia 63, começando a declinar no dia 70. O G2 apresentou resposta por anticorpos detectável também a partir de sete dias após infecção, mantendo valores de D.O. entre 0,300 e 0,750 até o dia 63, iniciando o declínio a partir do dia 70. O G3, como esperado por se tratar do grupo controle, apresentou valores de D.O. constantes durante as 12 semanas (figura 3). A figura 4 demonstra a média dos grupos ao longo do experimento, analisando os dados sem a oscilação individual.



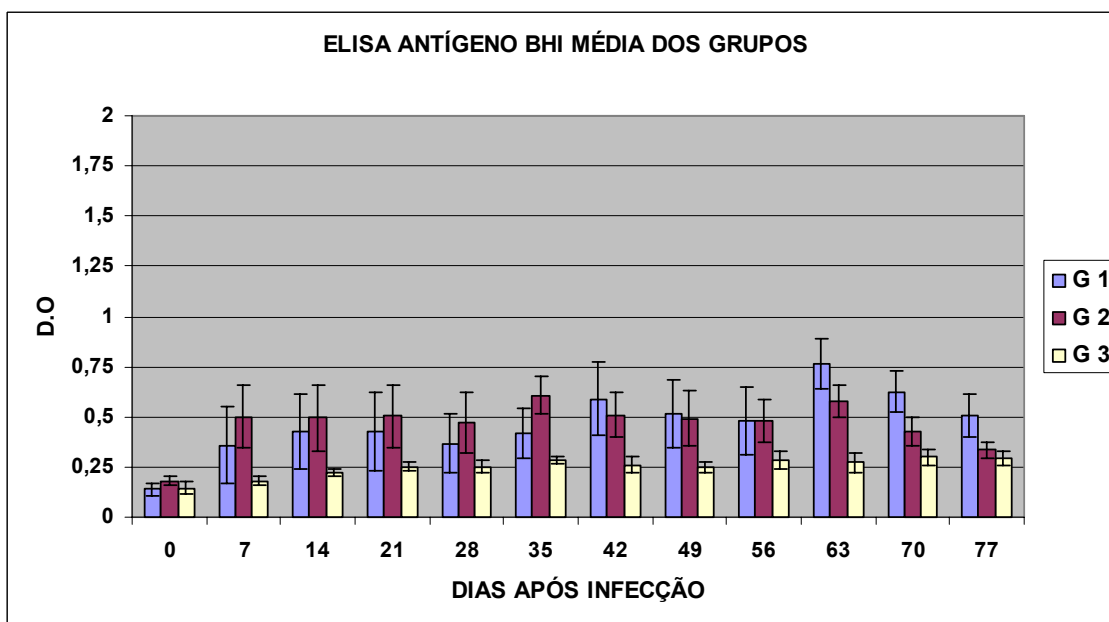
**FIGURA 1- Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**



**FIGURA 2 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**

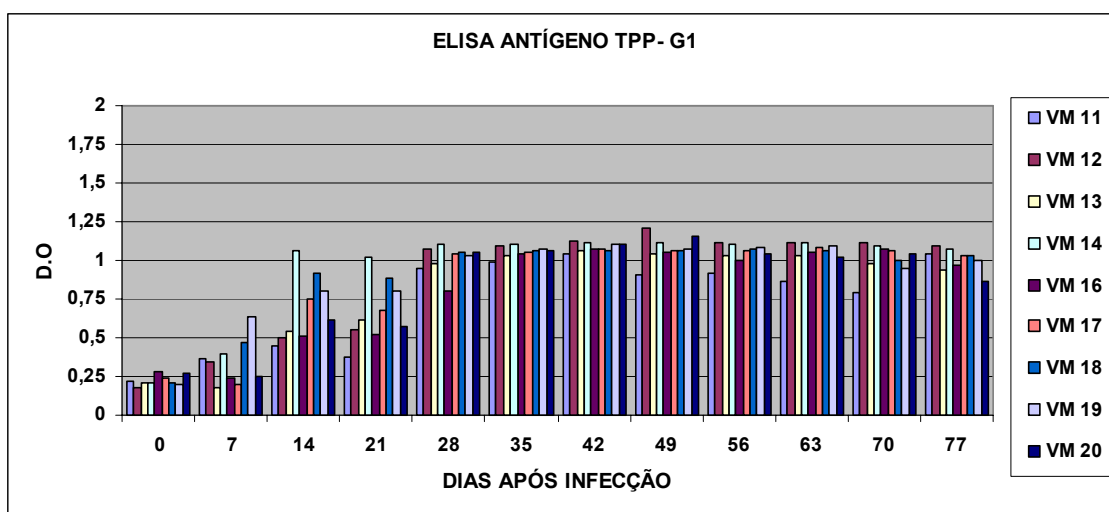


**FIGURA 3 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**

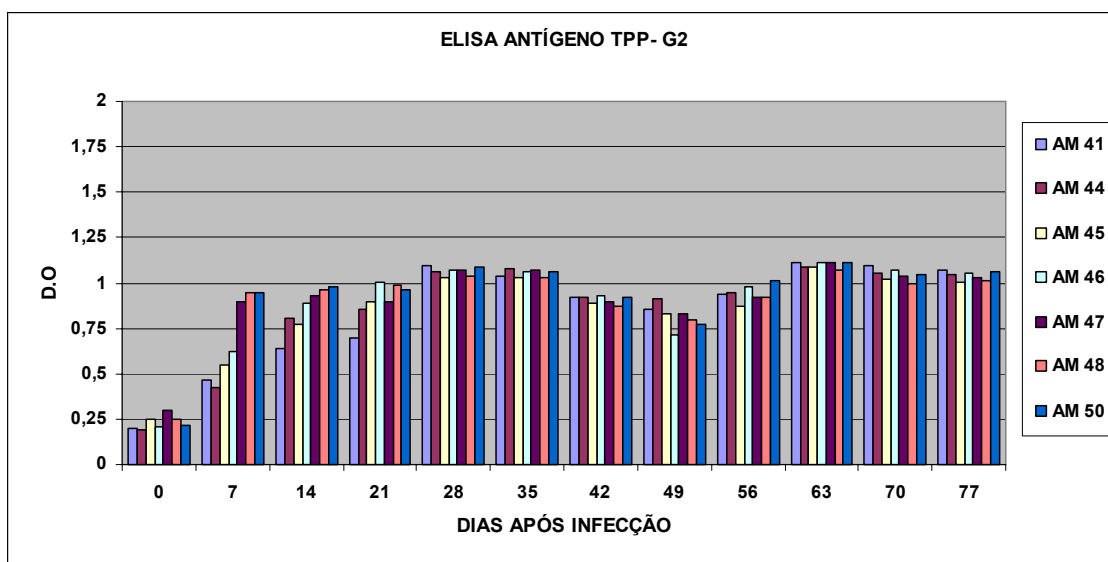


**FIGURA 4 – Média dos grupos ao longo do tempo após infecção**

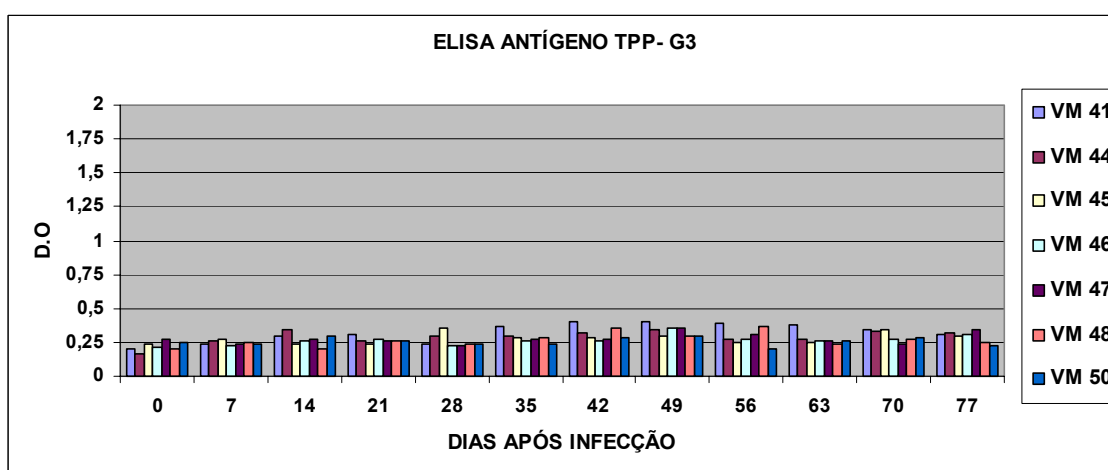
A avaliação da resposta humoral dos animais dos grupos G1 e G2 quando avaliada pelo ELISA TPP demonstrou um aumento da variação de D.O. entre os caprinos de cada grupo e em cada tempo, com diferenças após a infecção, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), como pode ser observado nas figuras 5 e 6. Um expressivo aumento é notado quando se compara os resultados destes referidos grupos com aqueles registrados nos animais do G3 (figura 7). Os caprinos de G1 iniciaram uma resposta humoral a partir de sete dias após infecção com valores de D.O. ascendentes até o dia 28, mantendo-se praticamente constante até o fim do experimento. No G2 identificou-se uma resposta também a partir do sétimo dia após a infecção com um declínio no dia 42 e um aumento no dia 56, permanecendo constante até o dia 77. Todavia, o G3 apresentou valores de D.O. constantes durante as 12 semanas (figura 7). A figura 8 evidencia a variação da resposta pela média dos grupos ao longo do experimento.



**FIGURA 5 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**

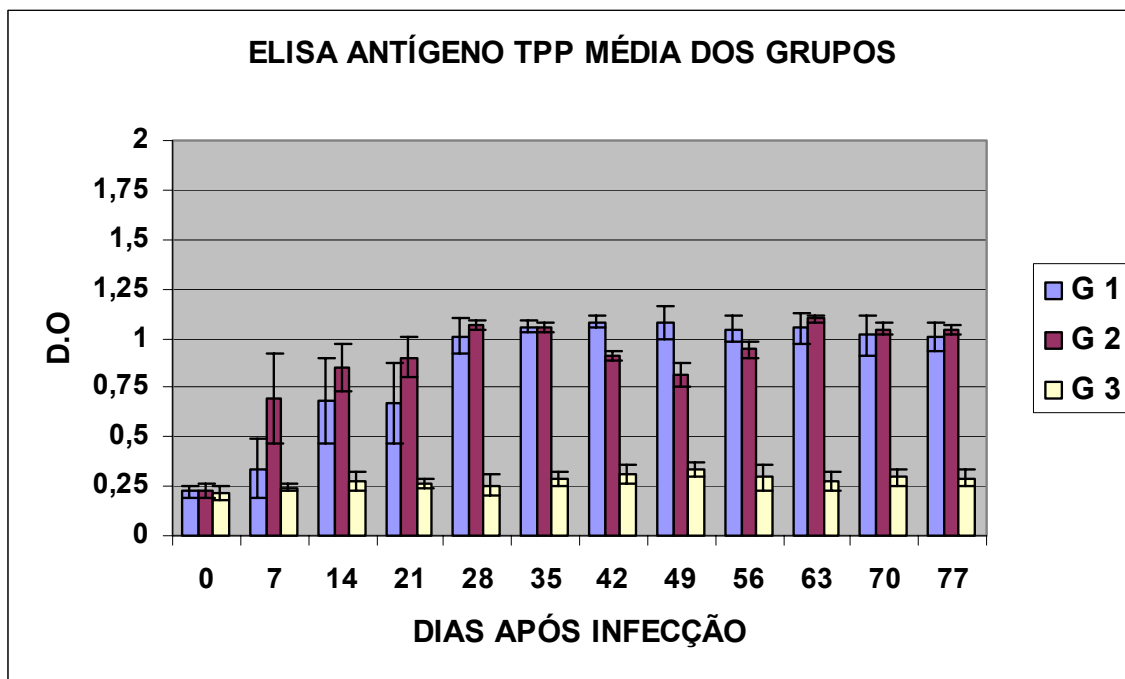


**FIGURA 6 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**



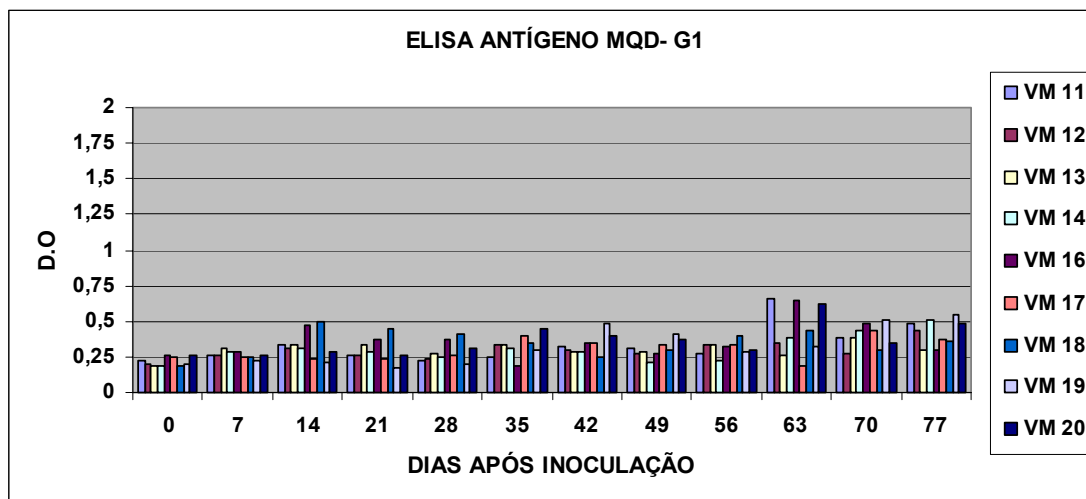
**FIGURA 7 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**



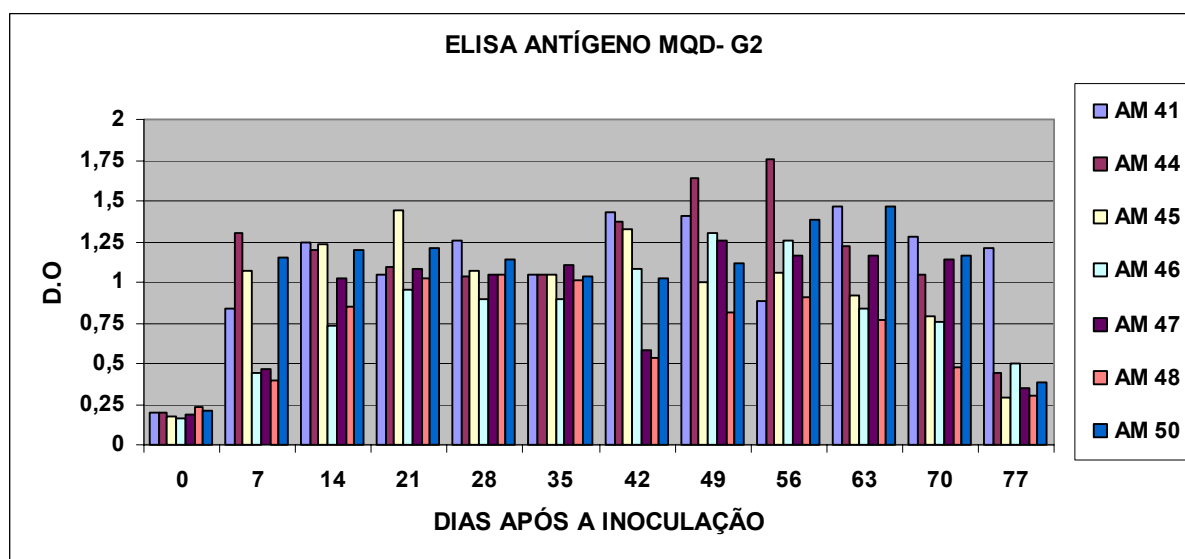


**FIGURA 8 – Média dos grupos ao longo do tempo após infecção**

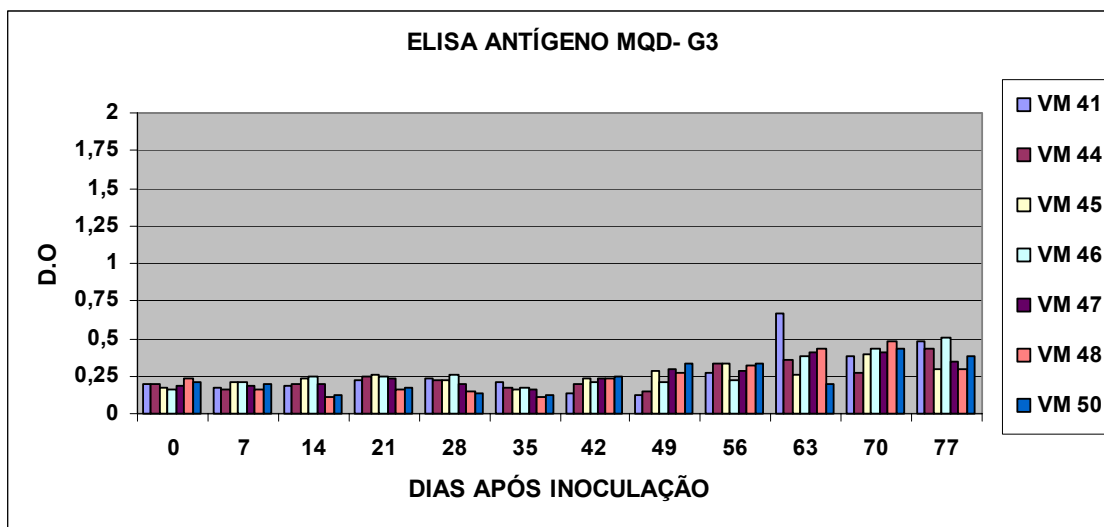
Observando-se as figuras 9 e 10, constata-se que no ELISA MQD os animais do G1 apresentaram uma resposta humoral expressivamente menor que os do G2, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) e, uma pequena diferença com relação ao G3, também estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), como pode ser visto na figura 11. Notou-se que os caprinos de G1 apresentaram valores D.O. com um pequenos aumentos no dia 14, permanecendo constantes até o dia 63, quando passa a se verificar novos aumentos, e finalmente a estabilidade destes valores até o dia 77. Em contrapartida, o G2 desenvolveu uma resposta humoral elevada a partir do sétimo dia após infecção, com valores de D.O. oscilando de 0,300 a 1,750 até o dia 70, com posterior declínio. Notou-se também para este ELISA que o G3 apresentou valores de D.O. constantes durante as 12 semanas. A figura 12 evidencia a variação da resposta pela média dos grupos ao longo do experimento.



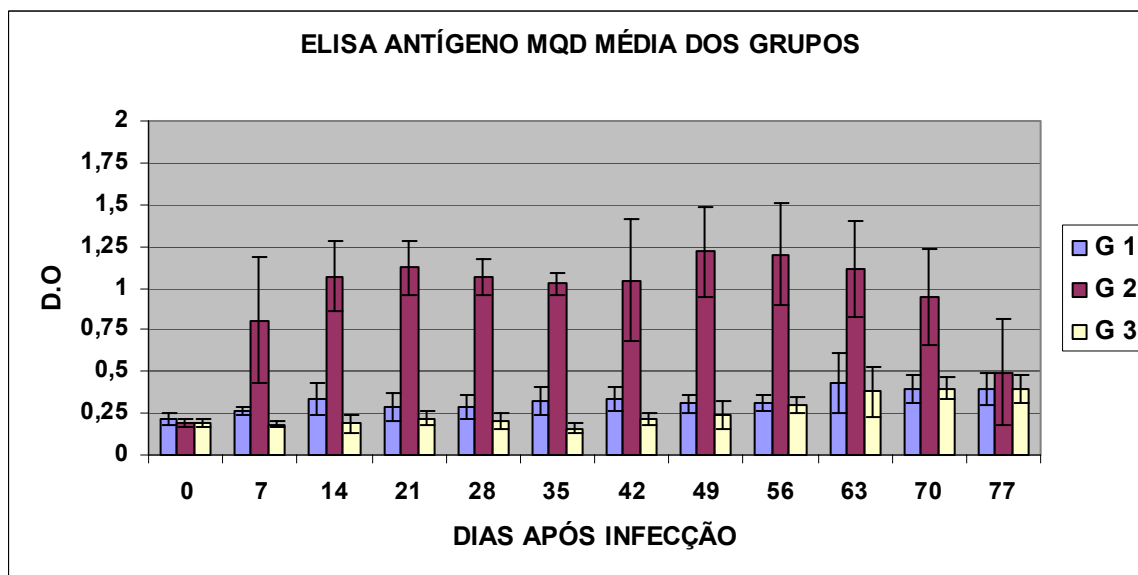
**FIGURA 9 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**



**FIGURA 10 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**

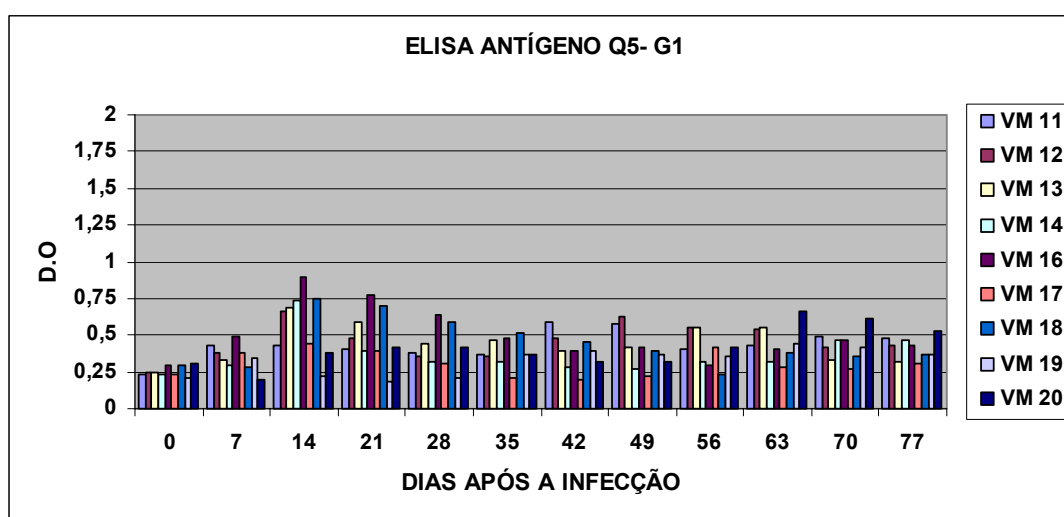


**FIGURA 11 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**

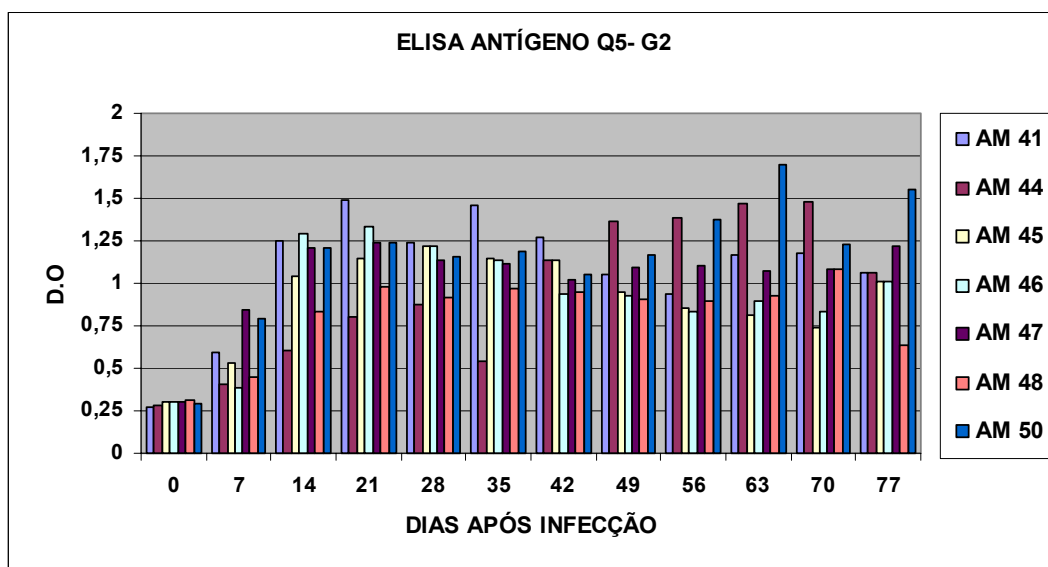


**FIGURA 12 – Média dos grupos ao longo do tempo após infecção**

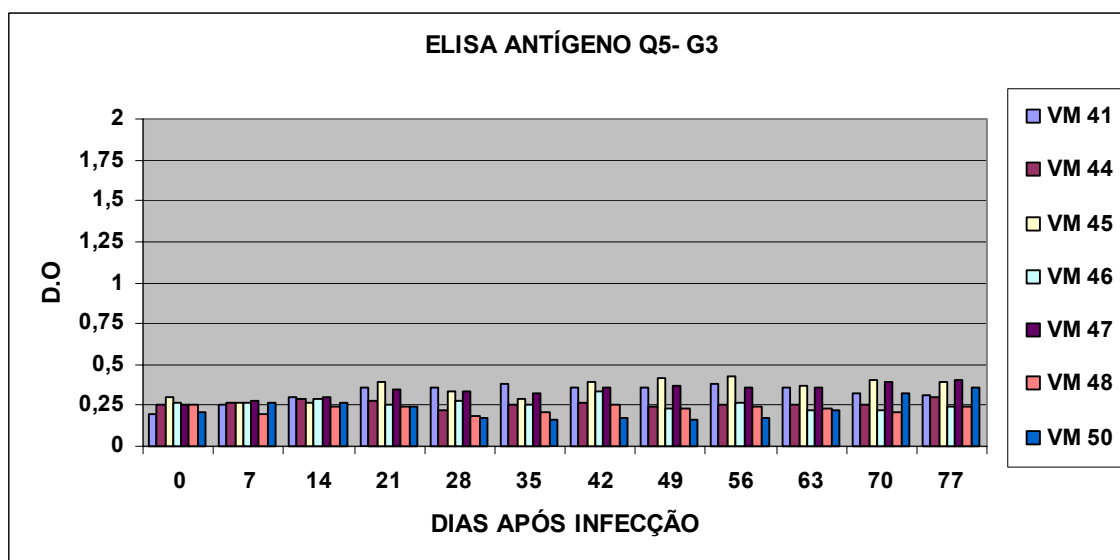
Através do ELISA Q5 verifica-se que o G1 apresentou uma produção de anticorpos específicos expressivamente menor que o G2, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), como se observa figuras 13 e 14, além de uma diferença com relação ao G3 também estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), conforme o ilustrado na figura 15. Nos resultados obtidos com o G1 constata-se uma curva ascendente a partir do dia 14 com oscilação de D.O. entre 0,250 até 0,800 ao longo do tempo. O G2 inicia uma resposta no sétimo dia após a infecção com um crescimento até o dia 14, depois do qual permaneceu constante até o dia 77. Constatou-se, como nos outros ensaios imunoenzimáticos, que o G3 apresentou uma resposta constante durante as 12 semanas. A figura 16 evidencia a variação da resposta pela média dos grupos ao longo do estudo.



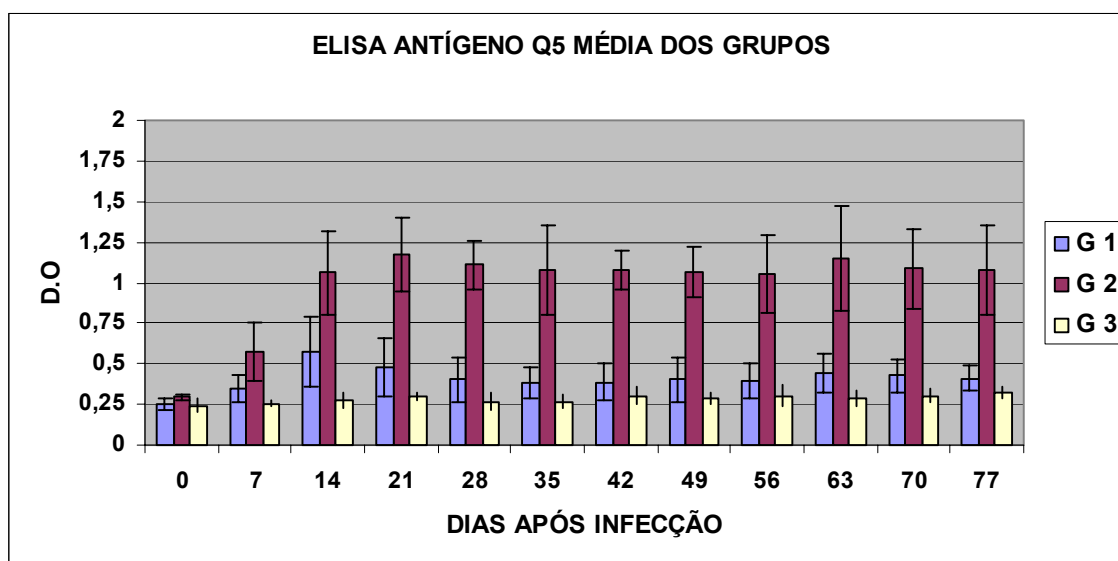
**FIGURA 13 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**



**FIGURA 14 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**

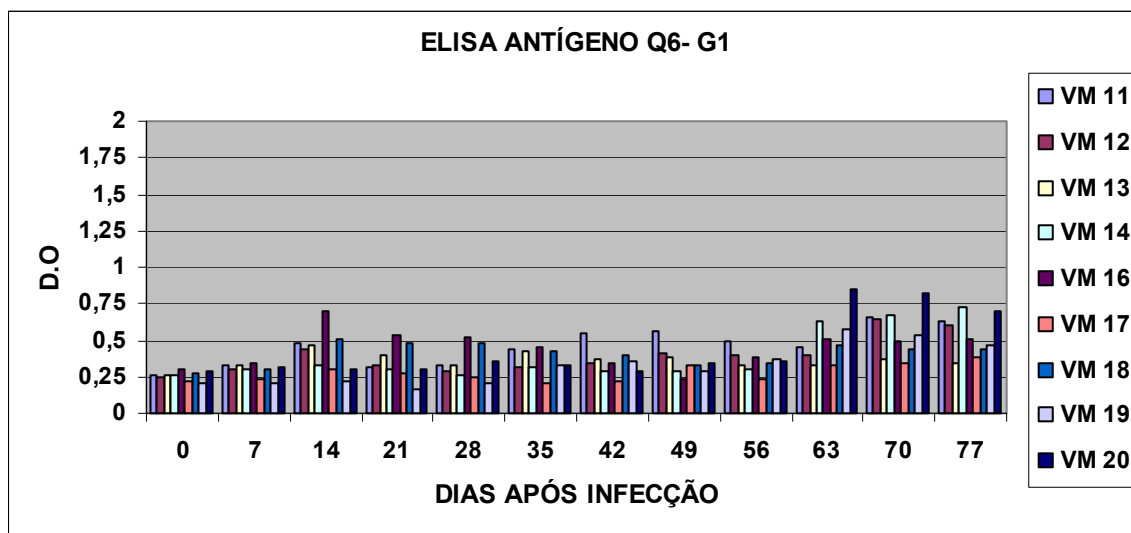


**FIGURA 15 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**

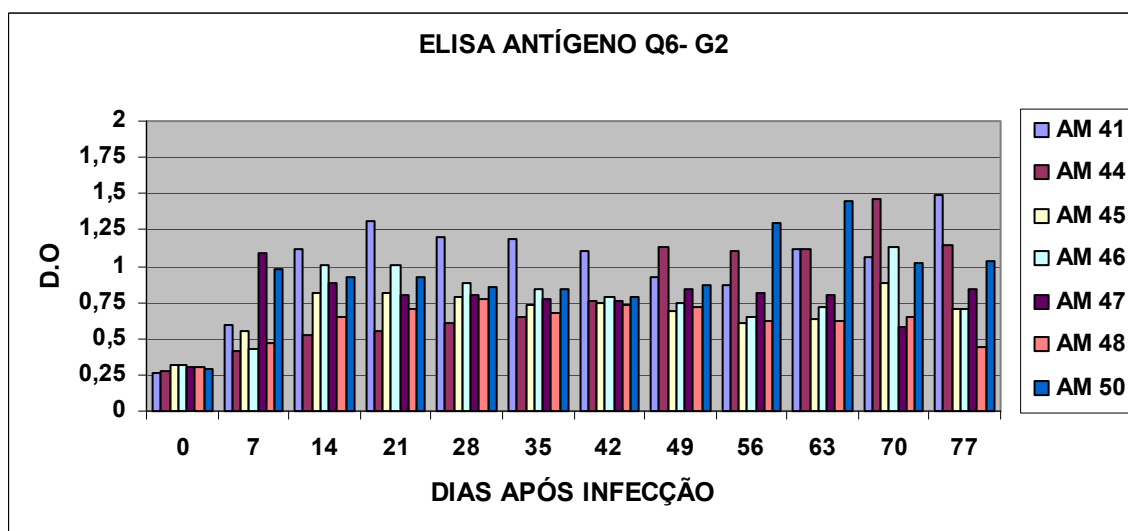


**FIGURA 16 – Média dos grupos ao longo do tempo após infecção**

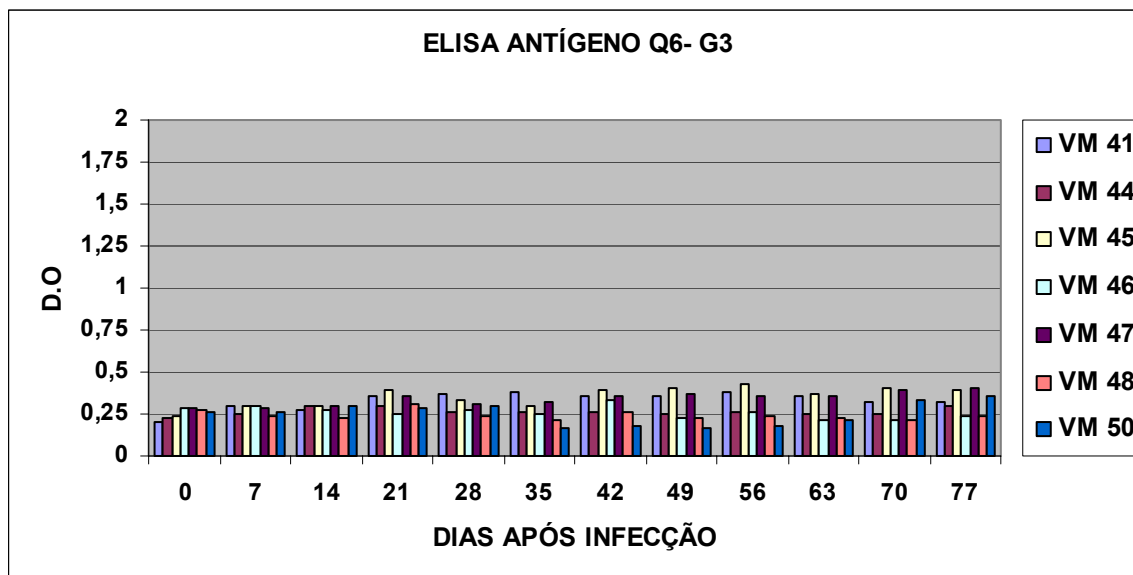
Os resultados obtidos com o ELISA Q6 neste experimento demonstram que os animais de G1 apresentaram uma produção de anticorpos específicos expressivamente menor que o G2, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), como se observa figuras 17 e 18, além de uma diferença com relação ao G3 também estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), como ilustrado na figura 19. O G1 demonstrou um aumento de resposta a partir do dia 14 após a infecção, a qual manteve-se constante até o dia 63, quando ocorreu um acréscimo, tornando-se finalmente constante até o último dia do experimento. No G2 a resposta foi mais intensa e se percebe o aumento na cinética da produção de anticorpos a partir do sétimo dia pós-infecção, com variação de D.O. entre 0,300 até 1,500 durante todo ensaio. O G3 apresentou o mesmo padrão de resposta, quando comparado aos diferentes testes ELISA durante o experimento (figura 20).



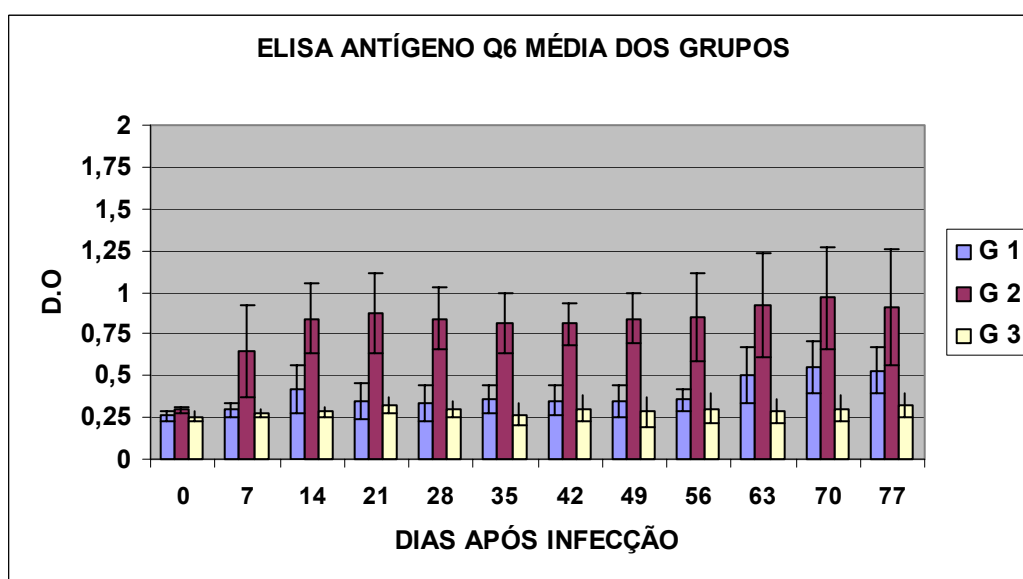
**FIGURA 17 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**



**FIGURA 18 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**



**FIGURA 19 - Variação de D.O. ao longo do tempo após infecção**

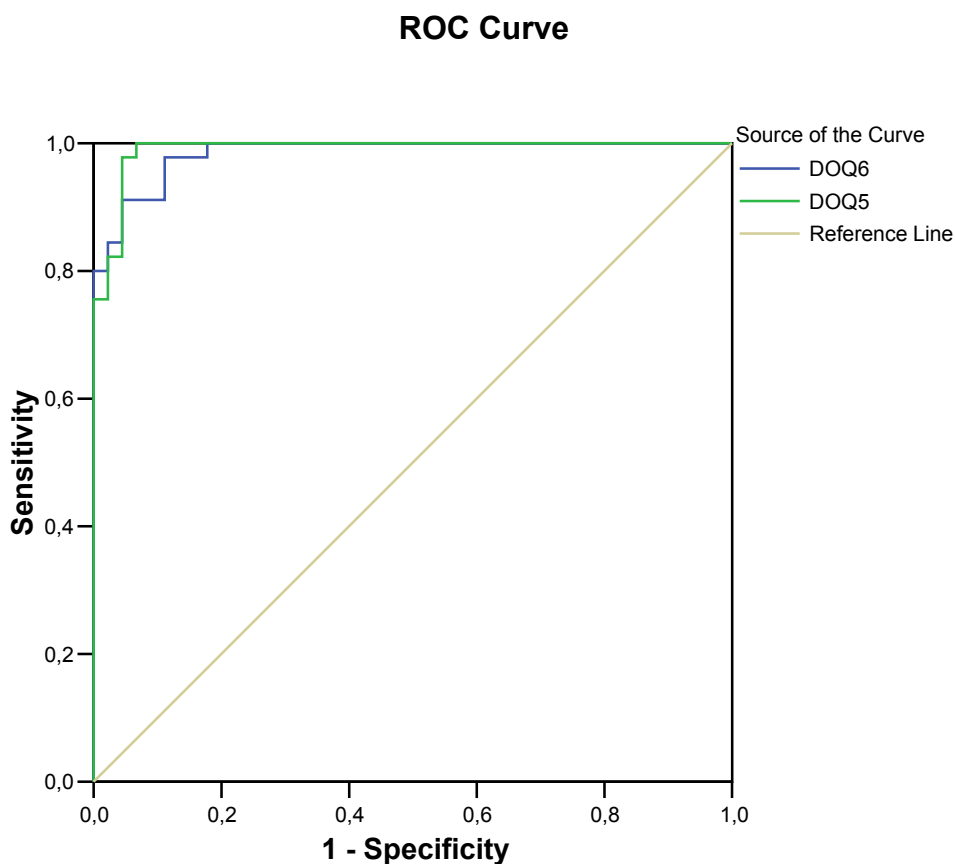


**FIGURA 20 – Média dos grupos ao longo do tempo após infecção**



### 5.1 DEFINIÇÃO DOS PONTOS DE CORTE DOS TESTES ELISA

Os pontos de corte foram definidos através da curva ROC. Esta curva avalia a sensibilidade em função da especificidade. Vale ressaltar que a área delimitada pela curva do teste ELISA indireto Q5 foi maior que o ELISA Q6. As curvas ROC dos testes ELISA estão demonstradas pela figura 17



**FIGURA 21- Curva ROC dos testes ELISA**

A tabela 1 demonstra os valores de sensibilidade e especificidade dos testes ELISA de acordo com os seus respectivos pontos de corte.

**TABELA 1**

Valores da sensibilidade e especificidade para os testes ELISA

	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Cut-off</i>
ELISA indireto Q5	97,8%	95,6%	0,310
ELISA indireto Q6	91,1%	95,6%	0,360

## 5.2- COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES ELISA

O índice Kappa calculado entre o ELISA indireto Q5 e o ELISA indireto Q6, demonstra uma concordância com o valor de 0,98.

## 6. DISCUSSÃO

De acordo com diversos autores, as proteínas encontradas no sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI e reconhecidas através de *western blotting*, têm peso molecular abaixo de 68 KDa (ELLIS e outros, 1991a; MUCKLE e outros, 1992; BRAITHWAITE e outros, 1993). Muckle e outros (1992), extraíndo proteínas ligadas à superfície da célula bacteriana, através da lavagem com NaCl, identificaram uma banda de 120 KDa, reconhecida por todos os soros de caprinos e ovinos infectados. Braithwaite e outros (1993), observaram que a extração de antígenos ligados à superfície da célula através do uso do detergente SDS, revelou bandas protéicas de 20 a 119kDa, reconhecidas pelo soro de caprinos infectados. Estes antígenos extraídos da superfície da bactéria foram considerados como antígenos somáticos.

Um dos antígenos usados em um dos testes ELISA propostos neste trabalho foi o TPP. Esta mistura antigênica foi obtida por Paule e outros (2003), a partir do fracionamento em três fases do sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI, com butanol e sulfato de amônio. Demonstrou-se que caprinos naturalmente infectados reconheceram bandas de 16 KDa, 20 KDa, 27 KDa, 30 KDa, 36 KDa, 40 KDa, 43 KDa, 58 KDa, 64 KDa, 68 KDa e 125 KDa. Apesar da banda de 125 KDa não ter sido relatada em outros experimentos com antígeno secretado, estudos de Muckle e outros (1992) e Braithwaite e outros (1993), demonstraram a presença de uma proteína de superfície de 120 KDa e 119 KDa, respectivamente.

A análise das frações Q5 e Q6 por “Western blotting” com soro de camundongos, demonstrou que há reconhecimento de frações protéicas de pesos moleculares entre 18 a 75 KDa. As bandas mais imunorreativas apresentaram peso molecular de 30, 52, e 54 KDa na fração Q5 e de 18, 26, 39, 52, 59 e 75 KDa, na fração Q6. Este resultado mostra a importância destas frações na indução resposta imune do hospedeiro uma vez que elas são capazes de induzir tanto a resposta imune humoral quanto a celular (VALE, 2005).

Em um estudo realizado com caprinos, o fracionamento eletroforético, seguido da avaliação da imunoreatividade dos antígenos produzidos por *C. pseudotuberculosis* em meio quimicamente definido, revelou que o soro de 95,8% dos animais infectados foi capaz de reconhecer bandas de 108 KDa, 78 KDa, 73 KDa, 67 KDa, e 39 KDa. Bandas de 112 KDa e 85 KDa foram reconhecidas por 91,6% dos animais, enquanto que as bandas de 62 KDa e 31 KDa foram reconhecidas por 87,5% destes animais. A banda de 125 KDa foi reconhecida por todos animais infectados (MOURA-COSTA, 2002).

Segundo Andersen e outros (1991), o crescimento de *M. tuberculosis* resulta em liberação de proteínas excretadas no meio, ativamente liberadas, nos primeiros dias da cultura. Posteriormente são liberadas proteínas secretadas que atravessam a membrana citoplasmática e se localizam externamente à parede celular, sendo liberadas gradualmente durante o crescimento bacteriano. Kaufmann e Hess (1999), sugeriram que antígenos secretados de *M. tuberculosis* seriam mais eficazes que os antígenos somáticos para compor uma vacina e para utilização em testes diagnósticos para estas bactérias.

Os antígenos usados nestes testes foram obtidos a partir da linhagem T1, atualmente utilizada pelo Laboratório de Imunologia (ICS-UFBA) nos experimentos

de imunoproteção. Os resultados de sensibilidade e especificidade dos testes ELISA BHI e TPP foram descritos por Carminati, (2005), sendo a sensibilidade de 98% e 100% e a especificidade de 98% e 100% respectivamente. Moura-costa (2002) padronizando um ELISA MQD obteve sensibilidade de 96,7% e especificidade de 98,2%. No presente estudo, utilizando fração Q5 e Q6 para dois testes ELISA indireto verificou-se uma sensibilidade de 97,8 % e 91,1% e especificidade de 95,6% em ambos os testes. Observa-se que o ELISA Q5 apresentou uma sensibilidade semelhante ao ELISA BHI e maior que o ELISA MQD e uma especificidade menor que os teste ELISA BHI, TPP e MQD. Quanto ao ELISA Q6 verificou-se uma sensibilidade e especificidade menor do que todos os testes ELISA relatado.

A sensibilidade e a especificidade são parâmetros fundamentais para a definição de um teste diagnóstico. Assim, quanto maior a sensibilidade do teste, maior a capacidade do teste negativo afastar a doença, pois ocorre uma diminuição da probabilidade de falso negativo. Quanto maior a especificidade de um teste, maior a capacidade de o teste positivo indicar a doença, pois diminui a probabilidade de falso positivo (LOPES, 2000). A sensibilidade pode ser definida como a probabilidade do teste ser positivo caso o animal esteja doente, enquanto especificidade seria a probabilidade do teste ser negativo no animal não doente (XU, LOHR e GREINER, 1997).

A resposta imune de caprinos, ovinos e murinos contra *C. pseudotuberculosis* envolve tanto mecanismos da imunidade inata (JOLLY, 1965a) quanto da imunidade adquirida (PÉPPIN e outros, 1991; PÉPIN e outros, 1997). A resposta imune humoral é uma resposta intensa e presente em animais imunizados e naturalmente infectados. Vale e outros, 2003, mostraram que o reconhecimento de proteínas por animais imunizados vai aumentando de acordo com o tempo de

imunização e que frações protéicas de baixo peso molecular são reconhecidas mais tardiamente, entretanto, a exotoxina conhecida por fosfolipase D é reconhecida no primeiro mês de imunização. Do conjunto de proteínas secretadas por este microrganismo apenas esta é bem caracterizada com um papel definido na patogenia da doença (McNAMARA e outros, 1994, SONGER e outros, 1997), porém induz baixo nível de proteção quando animais são desafiados (HODGSON e outros 1999). Os achados deste experimento demonstram que a linhagem atenuada e a linhagem selvagem apresentaram uma resposta humoral elevada quando comparadas pelo ELISA BHI e ELISA TPP, em contra partida quando comparadas pelos testes ELISA MQD, ELISA Q5 e ELISA Q6 a linhagem selvagem desenvolveu um perfil de resposta bem superior, talvez por se tratar de antígenos mais puros comparados com os Antígenos BHI e TPP.

No presente trabalho, constatou-se que o ELISA com antígeno TPP possui uma capacidade maior de discriminar os grupos infectados do grupo não infectado, corroborando com os resultados obtidos por Carminati, (2005). Contudo, se observa também uma diferença no teste ELISA BHI entre os grupos infectados e não infectado. Ao passo que nos testes ELISA Q5 e Q6 esse poder de discriminação foi verificado, onde a linhagem VD 57 apresenta uma maior diferença na produção de anticorpos comparados aos demais grupos.

Holstad, Teige e Larsen (1989), estudando uma vacina morta e toxóide contra *C. pseudotuberculosis* verificaram que os animais só respondiam ao estímulo após o reforço com quatro semanas. Entretanto, neste experimento detecta-se produção de anticorpos a partir do sétimo dia nos grupos infectados. Resultados semelhantes, foram obtidos por Cameron e Fuls (1973), Eggleton e outros (1991), utilizando o toxóide contra *C. psedotuberculosis* .

Ribeiro e outros (1991) avaliando uma linhagem viva atenuada, denominada 1002, utilizando cinco doses diferentes inoculadas em caprinos, constataram aumento dos níveis de anticorpos quando comparado com o grupo controle. Resultados estes encontrados no presente experimento, utilizando uma linhagem selvagem e uma linhagem atenuada.

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Imunologia do ICS/UFBA, em caprinos infectados com  $10^7$ CFU da linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*, Paule e outros (2003) demonstraram níveis elevados de IgG após seis dias de infecção, concordando com os achados deste estudo. Vale (2005) também utilizando a linhagem T1 verificou aumento na cinética de produção de anticorpos em camundongos infectados com a referida linhagem.

## 7. CONCLUSÕES

- A linhagem atenuada T1 e selvagem VD 57 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* contém estruturas antigênicas responsáveis pela ativação de componentes da resposta humoral em modelo caprino
  
- Na resposta imune humoral se observa aumento na produção de anticorpos ao longo do tempo de infecção.
  
- A fração secretada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* contém estruturas antigênicas responsáveis pelo reconhecimento e ativação do componente humoral
  
- A fração secretada contém as estruturas antigênicas que podem ser utilizadas em testes diagnósticos para o acompanhamento preciso dos mecanismos implicados na resposta imune humoral
  
- Constatou-se que os testes ELISA indireto MQD, Q5 e Q6 apresentam uma capacidade de discriminação maior entre os animais infectados com uma linhagem selvagem VD 57 comparados aos animais infectados com uma linhagem atenuada T1.
  
- Concluiu-se que o teste ELISA indireto TPP apresenta uma maior capacidade de diferenciar animais infectados de animais não infectados.
  
- A sensibilidade e especificidade do teste ELISA indireto Q5 foram de 97,8% e, 95,6% respectivamente e a sensibilidade e especificidade do teste ELISA indireto Q6 foi de 91,1% e 95,6%.



## **8.0- PERSPECTIVAS**

- Estudar a linhagem T1, avaliando o potencial desta cepa de induzirem uma resposta imunológica protetora.
- Estudar as frações Q5 e Q6 para produção de antígenos que poderão ser utilizados em testes de diagnósticos diferenciando animais imunizados de animais naturalmente infectados.

## 9. Referências bibliográficas

- ABDEL HAMID, Y.M. The use of mouse protection tests in the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep. **Res. Vet. Sci.**, v. 18, p. 223-224, 1975.
- ADDO, P.B. Role of common house fly (*Musca domestica*) in the spread of ulcerative lymphangitis. **Vet. Rec.**, v. 113, p. 496-497, 1983.
- AFZAL, M., SAKIR, M., HUSSAIN, M. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection and lymphadenitis caseous in the camel. **Trop. Anim. Health Prod.** n.2, v.28, p.158-162, 1996.
- ALVES, F. S. F., OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Veterinária Notícias**, Uberlândia n. 5, p. 69-75, 1999.
- ANDERSEN, P. *et al.*, Proteins Released from *Mycobacterium tuberculosis* during Growth. **Infect. Immun.**, n. 59, p. 1905-1910, 1991.
- ANDERSON, M.; NAIRN, M.E. Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. **Colloques de L'INRA** , v. 28, p. 605-609, 1984.
- ARSENAULT, J. *et al.* Prevalence of and carcass condemnation from maedi–visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Prev. Vet. Med.**, v. 59: p. 67-81, 2003.
- ASHFAQ, M. K., CAMPBELL, S. G A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States, **Veterinary Medicine/Small Animal Clinician**. August, p. 1161-1165, 1979.
- AUGUSTINE, J.L.; RENSHAW, H.W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47: p. 713-715, 1986.
- AYERS, J. L., Caseous lymphadenitis in goats and sheep: A review of diagnosis, pathogenesis and immunity. **J.A.V.M.A.**, v. 171, p. 1251-1254, 1977.
- BATEY, R. G.,SPEED, C.M.; KOBES, C.J. Prevalence and distribution of caseous lymphadenitis in feral goats. **Austr. Vet. J.**, v. 63, p. 33-36, 1986.
- BENHAM, C. L., SEAMAN, A., WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. **Commonwealth Bureau of Animal Health.**, v.32 p.645-657, 1962.

BIBERSTEIN, E. L., KNIGHT, H. D., JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Record**, n. 89, p. 691-692, 1971.

BRAITHWAITE, C. E., SMITH, E. E., SONGER, J. G., REINE, A. H. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet. Microbiol.**, n. 38 p. 59-70, 1993.

BRAVERMAN, Y. *et al.* The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. **Rev. Sci. Tech.**, v. 18, p. 681-690, 1999.

BREGENZER, T. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in bucher. **Clin. Microbiol. and Infec.** N.6 v. 3, p.696-698. 1997.

BROGDEN, K.A.; CUTLIP, R.C.; LEHMKULH, H.D. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 45, p. 1532-1534, 1984a

BROGDEN, K.A. *et al.* Changes in ovine erythrocyte morphology due to sphingomyelin degradation by *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Microbial. Pathogenesis**, v. 8, p. 157-162, 1990.

BROWN,C.C., OLANDER, H. J., ZOMETTA, C., ALVES, S. F. Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. **Am. J. Vet. Res.**, n. 47 p. 1461-1463, 1986.

BROWN,C.C., OLANDER, H. J. Caseous Lymphadenitis of Goats and Sheep: A Review. **Veterinary Bulletin**, n. 57, v.1, 1987.

BROWN, C. C., OLANDER, H.J.; ALVES, F.C. Synergistic Hemolysis-Inhibition Titers Associated with Caseous Lymphadenitis in a Slaughterhouse Survey of Goats and Sheep in Northeastern Brazil. **Can. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 46-49, 1987.

BURRELL, D.H. Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. **Res. Vet. Sci.**, v. 24, p. 269-276, 1978.

BURRELL, D.H. Conditions for in vitro haemolytic activity by *Corynebacterium ovis* exotoxin. **Res. Vet. Sci.**, v. 26, p. 333-338, 1979.

BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. **Aust. Vet. J.**, n.57 p. 105-110, 1981.

CAMERON, C. M., SWART, C. F. A new liquid medium for the cultivation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **J. S. Afr. Vet. Med. Ass.**, n. 36 v.2 p. 185-188, 1965.

CAMERON, C. M., ENGELBRECHT, M.M. Mechanism of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Buchanan, 1911) in mice using inactivated vaccine. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 38, p. 73-82, 1971a.

- CAMERON, C. M. Immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **J. S Afr. Vet Ass.**, v. 43, p. 345-349, 1972a.
- CAMERON, C. M., FULS, J.P. Study on the enhancement of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 40 (3), p. 105-114, 1973.
- CAMERON, C. M., BESTER, F.J. An improved *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine for sheep. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 51, p. 263-267, 1984.
- CARMINATI, R., *et al.* Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Rev. Ci. Méd. Biol.* n.1 v.2 p. 88-93, 2003.
- CARMINATI, R., Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. 2005. Dissertação- (Mestrado em Imunologia)- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- CARNE, H.R. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents. **Austr. Vet. J.**, v. 4, p. 42-47, 1932.
- CARNE, H. R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. **J. Pathol. Bacteriol.**, n. 51 p. 199-212, 1940.
- CARNE, H. R., ONON, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. **Nature**, v. 271, p. 246-248, 1978.
- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Linfadenite caseosa**. In: CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domesticos*. Cap. 21, p. 147-149, 1992.
- COSTA FILHO, G. A. Particularidades da Linfadenite Caseosa dos caprinos em Pernambuco e no Nordeste. **Anais da ESV – Univ. Fed. Rural de Pernambuco**, n.1 p. 9-23, 1974.
- COSTA, L. R. R., SPIER, S. J., HIRSH, D. C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. **Vet. Microbiol.** n.62 p. 135-143, 1998.
- DERCKSEN, D. P., *et al.*, A comparison of four serological teste for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Vet Microbiol.**, n. 75 p. 167-175, 2000.
- DOTY, R.B. *et al.* A comparison of toxins produced by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the development of a diagnostic skin test for caseous lymphadenitis of sheep and goats. **Am. J. Vet. Res.**, v. 25, p. 1679-1685, 1964.

EGGLETON, D. G., MIDDLETON, H. D., DOIDGE, C. V., MINTY, D. W. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Aust. Vet. J.**, n. 68 p.317-319, 1991.

ELLIS, T.M. *et al.* The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. **Austr. Vet. J.**, v. 64, p. 261-263, 1987.

ELLIS, *et al.* Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. **J.A.V.M.A.**, v. 196, p. 1609-1613, 1990.

ELLIS, J. A., *et al.*, Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, n. 28 p. 289-301, 1991a.

ELLIS, J. A., *et al.*, Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, n. 28, p. 303-316, 1991b.

ELLIS, J.A., *et al.*, Differential induction of Tumor Necrosis Factor Alpha in ovine pulmonary alveolar macrophages following infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella haemolytica*, or Lentiviruses. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 3254-3260, 1991c.

FERREIRA, A. W., ÁVILA S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-ímmunes**. Editora Guanabara-Koogan, p.1-6, 1996.

FIGUEIREDO, E.A.P.; SHELTON, M.; PANT, K.P. Goat skins. **Proceedings 3<sup>rd</sup> International Conference on Goat Production and Disease**. Tucson, Arizona, p. 488-490, 1982.

FLYNN, J.L. *et al.* An essential role for Interferon  $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 2249-2254, 1993.

GOEL, M.C.; SINGH, I.P. Purification and characterization of *Corynebacterium ovis* exotoxin. **J. Comp. Path.**, v. 82, p. 345-353, 1972.

GREEN, S.J.; NACY, C.A.; MELTZER, M.S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. **J. Leuk. Biol.**, v. 50, p. 93-103, 1991.

HARD, G.C. Immunity to experimental infection with *Corynebacterium ovis* in the mouse peritoneal cavity. **Res. Vet. Sci.**, v. 10, p. 547-554, 1969

HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infect. Immun.** n. 12 v. 6, p. 1439-1449, 1975.

HODGSON, A.L.M. *et al.* Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2900-2905, 1992.

HODGSON, *et al.* Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Vaccine**, v. 17, p. 802-808, 1999.

HOLstad, G., TEIGE, J., LARSEN J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats VIII. The effect of vaccination against Experimental infection. **Acta Vet. Scand.**, v. 30, p. 275-283, 1989.

JANEWAY, C.A.; TAVARES, P., WALPORT, M.J. **Defesa do hospedeiro contra infecção.** In: JANEWAY, C.A.; TAVARES, P., WALPORT, M.J. **IMUNOBIOLOGIA: O sistema imunológico na saúde e na doença.** Cap. 10, p. 363-398, 2000.

JOLLY, R.D. The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. **J. Comp. Path.**, 75, 417-431, 1965a.

JOLLY, R. D., Experimental infection of convalescent mice with *Corynebacterium ovis*. **New Zealand Vet. J.**, v. 13, p. 148-153, 1965b.

JOLLY, R. D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **J. Appl. Bact.** n. 29 v. 1, p. 189-196, 1966.

KABA, J., KUTSCHKE, L., GERLACH, G-F. Development of na ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. **Vet. Microbiol.**, n. 78, p. 155-163, 2001.

KAUFMANN, S.H. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in intracellular microbial infections. **Immunol. Today**, v. 9, p. 168-189, 1988.

KAUFMANN, S.H. Immunity to intracellular bacteria. **Ann. Ver. Immunol.**, v. 11, p. 129-163, 1993.

KAUFMANN, S. H. E., HESS, J. Impact of intracellular of and antigen display by intracellular bacteria: implication for vaccine development. **Immunology**. v. 65, p.81-84. 1999.

KNIGHT, H.D. A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horse. **Cornell Vet.**, v. 68, p. 220-237, 1978.

LAN, D. T. B., *et al.* Complement receptor type 3 plays na important role in development of protective immunity to primary and secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 43, p. 1103-1106, 1999.

LOPEZ, J. F., WONG, F. M., QUESADA, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* first case of human infection. **Am. J. Clin. Pathol.**, n. 46, v.5 p. 562-567, 1966.

MAKI, L. R., *et al.*, Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep, using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Vet. Res.**, n. 46, p. 212-214, 1985.

MCNAMARA, P. J., BRADLEY, G. A., SONGER, J. G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Mol. Microbiol.** n. 12, p. 921-930, 1994.

MENZIES, P.I. *et al.* A field trial to evaluate a whole cell vaccine for the prevention of caseous lymphadenitis in sheep and goat flocks. **Can. J. Vet. Res.**, v. 55, p. 362-366, 1991.

MENZIES P. I., *et al.*, **Caseous lymphadenitis of sheep and goats**. In Aiello S., Mays A.. (eds): The Merck Veterinary Manual, ed 8. Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., p. 55-56, 1998.

MERCHANT, I. A., PACKER, R. A. **Bacteriologia y Virologia Veterinarias**, Editora Acribia, Zaragoza- España , 3<sup>a</sup> Edição Espanhola - 2<sup>a</sup> Reimpressão, p. 437-452, 1975.

MILLS, A. E., MITCHELL, R. D., LIM E. K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotizing granulomatous lymphadenitis. **Pathology**. v. 29, p. 231-233, 1997.

MODLIN, R.L. *et al.* In situ characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 53, p. 17-28, 1983.

MOURA COSTA, M. D., *et al.*, Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia - Distribuição geográfica da doença. Boletim do **Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, n.12, v.1, p. 1-7, 1973.

MOURA COSTA, L.F. **Desenvolvimento de um Teste de ELISA Indireto para o Diagnóstico de Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em Caprinos**. 2002. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MUCKLE, C. A., GYLES, C. L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Can. J. Comp. Med.** n. 46, p. 206-208, 1982.

MUCKLE, C.A., GYLES, C.L. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 1149-1153, 1983.

MUCKLE, C. A., MENZIES, P. I., Li, Y., Hwang, T., van Wesenbeeck, M. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet. Microbiol.**, n. 30, p. 47-58, 1992.

NAGY, G. Caseous lymphadenitis in sheep: Methods of infection. **J. S. Afr. Vet. Ass.**, v. 47, p. 197-199, 1976.

NAIRN, M. E., ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. **Aust. Vet. J.**, n. 50, p. 537-542, 1974.

NAKANE, A. *et al.* Interactions between endogenous gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor in host resistance against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3439-3445, 1989.

PATON, M.W. *et al.* The effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep. **Austr. Vet. J.**, v. 65, p. 117-119, 1988.

PATON, M. W., *et al.*, The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Aust. Vet. J.**, n. 72 p. 266-269, 1995.

PATON, M. W. Caseous lymphadenitis. **Proceedings of the Fourth International Congress for Sheep Veterinarians**, Armidale, NSW, Australia. p. 121-, Feb. 1997a. The epidemiology of caseous lymphadenitis in Australia and observations on other production systems. **Proceeding, U. S. Animal Health Assoc.**, p. 1997.

PAULE, B.J.A. *et al.* Three phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Prot. Express. Purif.**, (*in press*), 2003.

PEEL, M. M., *et al.*, Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clin. Infect. Dis.**, n. 24 v. 2, p. 185-191, 1997.

PEPIN, M., *et al.* Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **J. Leukocyte Biol.**, v. 56, p. 666-670, 1994.

PEPIN M., *et al.*, Citokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet. Res.** n. 28, p. 149-163, 1997.

PEPIN, M., SANCHIS, R. ; PATON, M. La lymphadénite caséuse des ovins et des caprins. **Point Vet.**, v. 30, p. 33-40, 1999.

PRESCOTT, J.F.; MENZIES, P.I.; HWANG, Y-T. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Vet. Microbiol.**, v. 88, p. 287-297, 2002.

QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B., CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe Publishing, p.137-143. 1994.

REGIS, L. **Aspectos da resposta celular de caprinos a antígeno somático e antígeno secretado de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2001. 85 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências da saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RENSHAW, H.W.; GRAFF, V.P.; GATES, N.L. Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: Isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, and *Moraxella* spp



from internal abscesses in emaciated ewes. **Am. J. Vet. Res.**, v. 40, p. 1110-1114, 1979.

RIBEIRO, O.C. *et al.* Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 26, p. 461-465, 1991

ROGOSA, M. *et al.* **Coryneform group of bacteria.** In: Buchanan R.E., Gibbons, N.E., eds. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: William & Wilkins Co, p. 599-632, 1974.

ROITT, I. , BROSTOF, J., MALE, D. 1999. *Immunology*. Mosby. 5rd. ed.

SELIN, S. A. Oedematous Skin Disease of Buffalo in Egypt. **Vet. Med.** N. 48, p.241-258, 2001.

SHIGIDI, T.A. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. **Br. Vet. J.**, v. 135, p. 172-177, 1979.

SIMMONS, C.P. *et al.* Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 474-479, 1998.

SONGER, J. G., *et al.*, Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Am. J. Vet. Res.**, n. 49, v.2, p. 223-226, 1988.

SONGER, J. G., *et al.*, Cloning and expression of the phospholipase D gene of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, n. 58 v.1 p. 131-136, 1990.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in Microbiology**, n. 5, v. 4, p. 156-160, 1997.

STING, R., STENG, G., SPENGLER D., Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using Enzyme-linked Immunosorbent Assay. **J. Vet. Med.** n. 45, p. 209-216, 1998.

SUTHERLAND, S.S. *et al.* Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Austr. Vet. J.**, v. 64, p. 263-266, 1987.

SUTHERLAND, S. S., SPEIJERS, E. J., ANDRES, B. Comparison of the exotoxins of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Research in Veterinary Science** n. 47 p. 190-194, 1989.

TAKAHASHI T., *et al.*, Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine corynebacterial isolates based on the 16S rDNA sequence. **Microbiol. Immunol.**, n. 41, v.9, p. 649-655, 1997.

TASHJIAN, J.J.; CAMPBELL, S.G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: An electron microscopic study. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 690-693, 1983.

TER LAAK, E. A., BOSCH, J., BIJL, G. C., SCHREUDER, B. E. C. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **Am. J. Vet. Res.**, n53, p. 1125-1132, 1992.

UNANIAN, M. M., SILVA, F., A. E. D., PANT, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid North-east Brazil. **Trop. Amm. Hlth. Prod.**, n. 17, p. 57-62, 1985.

VALE, V., Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2000. Dissertação- (Mestrado em Imunologia)- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

VALE, V., Avaliação de aspectos da resposta imune de camundongos balb/c contra a linhagem T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2005. Tese (Doutorado em Imunologia)- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

WALKER, J. *et al.* Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 86, p. 13-18, 1991.

WALKER, J., *et al.*, Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infect. Immun.** n. 62 p. 2562-2567, 1994.

WILLIAMSON, L. H., Caseous Lymphadenitis in Small Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** n.2 v.17, p. 359-371, 2001.

XU, H., LOHR, J., GREINER, M. The selection of ELISA cut-off points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis. **J. Immunol. Methods**, n. 208, p. 61-64, 1997.

ZAKI, M.M., The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. **Res. Vet. Sci.**, v. 9, p. 489-493, 1968.

ZAKI, M. M. Relation between the toxogenicity and pyogenicity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infected mice. **Res. Vet. Science**, n. 20, p. 197-200, 1976.