



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

**RENATO CARMINATI**

**ESTUDO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE QUATRO  
TESTES ELISA E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA O  
DIAGNÓSTICO DE LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS**

Salvador – Bahia

2005

**RENATO CARMINATI**

**ESTUDO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE QUATRO  
TESTES ELISA E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA O  
DIAGNÓSTICO DE LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS**

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**

**Co-orientador: Dr. Anderson Miyoshi**

Salvador – Bahia

2005

**Biblioteca da Escola de Medicina Veterinária - UFBA**

C 287 Carminati, Renato  
**Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos / Renato Carminati – Salvador, 2005.**  
79f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Co-orientador: Dr. Anderson Miyoshi

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Imunologia, 2005.

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2. Linfadenite caseosa. 3. Caprinos. 4. Diagnóstico. 5. ELISA. 6. PCR. 7. Resposta imune. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. II. Título.

C.D.U.: 57.083.;577.27



Esta dissertação é dedicada a meu irmão, Anselmo Carminati Junior (*in memoriam*), que sempre apoiou e incentivou as minhas conquistas

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**Ao professor Roberto Meyer, agradeço todo apoio e incentivo durante minha formação acadêmica e profissional. Deixo aqui registrado o meu reconhecimento pelo grande pesquisador e educador que o senhor tem sido ao longo destes anos, acreditando nesta linha de pesquisa e estimulando a formação de novos pesquisadores.**

## SINCEROS AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, fé, orientação e proteção.

Aos meus pais e irmã 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.

Ao amigo irmão Robson Bahia Cerqueira pela amizade, apoio, incentivo e contribuição para minha formação.

À professora Lilia Moura-Costa pelo incentivo a pesquisa, a docência, pela colaboração, apoio e conselhos nas horas difíceis.

Às professoras Darcy Pinheiro e Simone Viegas pelo estímulo à pesquisa e à docência

Ao Dr. Bruno Jean Adrien Paule pelo incentivo e estímulo durante a realização desta dissertação

Ao Dr. Vasco Azevedo e Dr. Anderson Miyoshi, pela oportunidade de realizar parte de minha dissertação em seu laboratório, e sobretudo pelo seu incentivo a este trabalho

À Dra. Songeli Menezes Freire, por ter me orientado no início da minha caminhada no Laboratório de Imunologia.

Aos professores do Laboratório de Imunologia

A meus colegas do laboratório de 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.

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte."

**Albert Einstein**

"Aquilo que guia e arrasta o mundo não são as máquinas, mas as idéias".

**Victor Hugo**



## RESUMO

A linfadenite caseosa é uma doença crônica que acomete principalmente caprinos e ovinos. O agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a doença caracteriza-se pela formação de granulomas nos linfonodos internos ou superficiais e em outros órgãos. A avaliação da resposta imune humoral é uma importante ferramenta para localização de animais possivelmente infectados, dificultando desta forma a disseminação do agente. O presente estudo avaliou a sensibilidade e especificidade de quatro ensaios imunoenzimáticos (ELISA), tendo como padrão ouro o isolamento microbiológico, confirmado por PCR. Foram utilizados dois antígenos sendo o primeiro o sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI e o outro obtido a partir do fracionamento em três fases (TPP) do sobrenadante de cultura de *C. pseudotuberculosis*, no mesmo meio. Foram usadas 49 amostras de soro de caprinos que apresentavam granulomas superficiais, dos quais isolou-se *C. pseudotuberculosis*, as bactérias isoladas e identificadas por provas bioquímicas foram submetidas a reação de polimerase em cadeia. Foram usadas 50 amostras de soro de caprinos clinicamente saudáveis. A sensibilidade e especificidade do ELISA indireto BHI foi de 98% e 98%. Para o ELISA indireto TPP obteve-se uma sensibilidade e especificidade de 100% e 100%. Para o ELISA sanduíche BHI a sensibilidade e especificidade foram, de respectivamente 86% e 84%. A sensibilidade e especificidade para o ELISA sanduíche TPP, foram 74% e 72%. A banda de 815 bp para do fragmento 16S RNA de *C. pseudotuberculosis* foi amplificada para todas as 49 amostras isoladas.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Linfadenite caseosa, caprinos, diagnóstico, ELISA, resposta imune, PCR.

## ABSTRACT

Caseous lymphadenitis is a chronic disease that mainly affects goats and sheeps. Its etiological agent is a bacteria, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, and the disease is characterized by the development of granulomas in both external and superficial lymphonodes and also in some other organs. The evaluation of the humoral immune response is an important tool to identify possible infected animals, in this way, preventing the dissemination of the disease. The present study evaluated the sensitivity and specificity of four different types of Immuno-enzymatic essays (ELISA), using as gold pattern the microbiological isolation/cultivation/identification followed by confirmation by polymerase chain reaction (PCR). Two different antigens were used. The first one was prepared from the supernatant from *C. pseudotuberculosis* culture in brain heart infusion (BHI) and the second one was obtained by three stages fractioning (TPP) from culture supernatant also grown in BHI. We used 49 samples of caprine sera from animals which presented superficial granulomas, from which *C. pseudotuberculosis* was isolated, identified by biochemical tests and submitted to PCR. We also used 50 samples from clinically healthy goats. The sensitivity and specificity using BHI indirect ELISA were both 98%. For TPP indirect ELISA both the sensitivity and specificity were 100%. For the BHI sandwich ELISA, sensitivity and specificity were 86% and 84% respectively. Sensitivity and specificity for TPP sandwich ELISA were 74% and 72%. The 815 specific bp band from the 16S RNA fragment for *C. pseudotuberculosis* was amplified in all 49 samples tested.

**Key-words:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Caseous lymphadenitis, goats, diagnostic, ELISA, immune response, PCR

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores da média e desvio padrão dos animais infectados e não infectados para os testes ELISA

Tabela 2: Valores da sensibilidade e especificidade para os testes ELISA

Tabela 3: Valores Preditivo Positivo e Valores Preditivo Negativo dos testes ELISA

Tabela 4: Correlação entre os testes ELISA através do coeficiente de Pearson

Tabela 5: Concordância entre os testes ELISA através do índice Kappa

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Valores de DO no teste ELISA indireto BHI

FIGURA 2: Valores de DO no teste ELISA indireto TPP

FIGURA 3: Valores de DO no teste ELISA Sanduíche BHI

FIGURA 4: Valores de DO no teste ELISA Sanduíche TPP

FIGURA 5: Curva ROC dos testes ELISA

FIGURA 6: Resultado da amplificação de bandas das amostras de *C. pseudotuberculosis*. Linha 1 até linha 20, corresponde as respectivas amostras.

FIGURA 7: Resultado da amplificação de bandas das amostras de *C. pseudotuberculosis*. Linha 21 até linha 40, corresponde as respectivas amostras.

FIGURA 8: Resultado da amplificação de bandas das amostras de *C. pseudotuberculosis*. Linha 41 até linha 49, corresponde as respectivas amostras.

FIGURA 9: Resultado da amplificação de bandas das amostras controle de *C. pseudotuberculosis*. Linhagem T1, T2 e 1002 e os controles da reação que contém apenas o mix.

FIGURA 10: Resultado da amplificação de bandas das amostras correlacionadas com *C. pseudotuberculosis*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CL	<i>Caseous LymphAdenitis</i> (Linfadenite Caseosa)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
OD/DO	<i>Optical Density</i> /Densidade ótica
PBS	Tampão fosfato com salina
PBS-T	Tampão fosfato com salina e Tween 80 (detergente)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Reação em cadeia da Polimerase com Transcriptase Reverse
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 $\gamma\delta$
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
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)

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	16
2.1- <b>Agente etiológico</b>	16
2.1.1- Taxonomia	16
2.1.2- Características morfológicas, tintoriais e bioquímicas	17
2.1.3- Características crescimento	18
2.1.4- Fatores de virulência	18
2.1.4.1- Lipídeos de parede	19
2.1.4.2- Exotoxina	19
2.2- Ocorrência da linfadenite caseosa	21
2.3- Transmissão	21
2.4- Patogenia	23
2.5- Resposta imunológica a <i>C. pseudotuberculosis</i>	24
2.6- Diagnóstico	27
2.7- Linfadenite caseosa no homem	29
<b>3.0- OBJETIVOS</b>	34
<b>4.0- MATERIAL E MÉTODOS</b>	36
<b>5.0- RESULTADOS</b>	50
<b>6.0- DISCUSSÃO</b>	62
<b>7.0- CONCLUSÕES</b>	70

<b>8.0- PERSPECTIVAS</b>	<b>71</b>
<b>9.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>72</b>

## 1- INTRODUÇÃO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa (CL) em caprinos e ovinos, cujo quadro clínico caracteriza-se pela formação de granulomas em linfonodos superficiais ou internos e em outros órgãos e linfangite ulcerativa em eqüinos (ASHFAQ e CAMPBELL, 1979; BURREL, 1981). Os linfonodos mais acometidos são pré-escapular, parotídeo, sub-mandibular, supramamário e poplíteo. O agente também está associado a mastite, pneumonia (UNANIAN e outros 1985; BROWN e OLANDER, 1987). Por se tratar de uma doença crônica, o animal pode não apresentar sinais clínicos característicos durante algum tempo, podendo ser um disseminador do microrganismo. O diagnóstico sorológico pode ser uma alternativa para indicar animais infectados e afastá-los do restante do rebanho (WILLIAMSON, 2001). A doença é um sério problema para a caprinovinocultura nacional, evidenciado por perdas econômicas, como, desvalorização da pele em 40%, diminuição na produção de leite e aumento nos custos para tratar as lesões (ALVES e OLANDER, 1999). Casos descritos relatam que a linfadenite caseosa pode ser caracterizada como uma zoonose ocupacional, acometendo pessoas que tem contato com ovinos e caprinos, como 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- O agente etiológico

#### 2.1.1- Taxonomia

Nocard, em 1888, isolou uma bactéria de afecção nodular subcutânea de bovino que, pela descrição, era compatível com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Em 1891, Preisz e Guinard isolaram um germe similar de um abscesso renal de ovelhas. Novamente Nocard em 1893, isolou o mesmo microrganismo a partir de uma enfermidade cutânea similar ao mormo, em eqüinos. Preisz em 1894 descreveu melhor o agente, comparando-o com o bacilo diftérico, denominando-o então *Bacillus pseudotuberculosis ovis*. Em 1896, Lehmann e Neumann introduziram o nome genérico de *Corynebacterium* para o bacilo da difteria e aos microrganismos relacionados. 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*. Carne, em 1939, considerou a denominação de *C. ovis* como impróprio, uma vez que o microrganismo poderia ser isolado de outras espécies. 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).

De acordo com Takahashi, e outros (1997), o gênero *Corynebacterium* pertence à família *Actinomycetae*, assim como os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*.

### **2.1.2- Características morfológicas, tintoriais e bioquímicas**

*C. pseudotuberculosis* é caracterizado como um bacilo Gram positivo, medindo 0,5 a 0,6  $\mu\text{m}$  por 1 a 3  $\mu\text{m}$ , podendo apresentar forma cocóide. Este microrganismo é anaeróbio facultativo, imóvel, não esporulado e fermentativo (BENHAM, SEAMAN e WOBBIDINE, 1962; MERCHANT e PACKER, 1975; QUINN e outros, 1994; SELIM 2001).

*C. pseudotuberculosis* é identificado por provas bioquímicas como: produção de catalase, produção de urease, redução de nitrato a nitrito e fermentação de carboidratos sem produção de gás, como glicose, ribose, trealose e apresentam-se variáveis quanto a fermentação da maltose e lactose (MUKLE e GYLES, 1982; SONGER e outros, 1988). Não hidrolisam a gelatina e nem digerem a caseína (MERCHANT e PACKER, 1975; QUINN e outros, 1994). A variabilidade nas características bioquímicas, particularmente quanto a fermentação de carboidratos, pode ser atribuída à existência de biovars entre as espécies e diferentes métodos utilizados por diversos pesquisadores Songer e outros (1988), e Biberstein e outros (1971), sugerem a existência de dois biovars, com base no fato de linhagens isoladas em eqüinos reduzem nitrato a nitrito, enquanto linhagens isoladas de caprinos e ovinos não possuem esta característica.

### 2.1.3- Características de crescimento

*C. pseudotuberculosis* é uma bactéria mesofílica, cuja temperatura ideal de crescimento é 37°C por 48 horas em uma atmosfera de 5% de gás carbônico (BENHAM, SEAMAN e WOOBIDINE, 1962; MUKLE e GYLES, 1982; SELIM 2001). O microrganismo é exigente do ponto de vista nutricional, apresentando bom crescimento em meios enriquecido como Agar sangue, Agar ou caldo BHI (Infusão de cérebro e coração) e meios enriquecidos com o soro animal ou proteínas vegetais (CAMEROM e STUART, 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).

*C. pseudotuberculosis* cresce melhor em meios com sangue ou soro. 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 é em torno de 7,0 a 7,2 (BENHAM, SEAMAN e WOOBIDINE, 1962; MERCHAM e PACKER, 1975; QUINN e outros, 1994).

### 2.1.4- Fatores de virulência

Apesar do processo patogênico provocado pelo *C. pseudotuberculosis* não estar completamente definido, foram identificados dois fatores de virulência: lipídeos de parede e a exotoxina (WALKER e outros, 1994; PEPIN e outros, 1999).

#### **2.1.4.1- Lipídeos de parede**

*C. pseudotuberculosis*, assim como o *Mycobacterium tuberculosis*, é um parasita intracelular facultativo possuidor de uma grande quantidade de lipídeos de superfície que aumenta a resistência da digestão por enzimas celulares (BROW e OLANDER, 1987). Segundo Jolly (1966), a presença desta camada lipídica dificulta a fagocitose da bactéria, aumentando sua virulência, enquanto que, para BATEY (1986) e SONGER e outros (1990), esta substância está relacionada à citotoxicidade.

Uma relação entre virulência e quantidade de lipídeos na parede de *C. pseudotuberculosis* foi evidenciada 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. Segundo Willianson (2001), os lipídeos celulares da bactéria tem característica piogênica e este fator de virulência está associado à formação de granulomas.

#### **2.1.4.2- Exotoxina**

A produção da exotoxina, uma fosfolipase D é o segundo componente importante para o mecanismo de patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*. Esta toxina foi descrita pela primeira vez por Carne em 1940, que relacionou algumas propriedades físicas e patogênicas (BROW e OLANDER, 1987).

A fosfolipase D hidrolisa esfingomielina, um componente importante de membrana citoplasmática, em colina e fosfato de ceramida (CARNE e ONON, 1978). A colina é liberada, enquanto o fosfato de ceramida fica associado à membrana. Esta ação da fosfolipase D compromete as células do epitélio vascular, aumentando a

permeabilidade e favorecendo a disseminação do microrganismo a partir do local inicial da infecção (CARNE e ONON, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983).

A esta exotoxina são atribuídas numerosas atividades biológicas. A fosfolipase D demonstra uma atividade hemolítica em sinergia com a colesterol-oxidase e a fosfolipase C de *Rhodococcus equi* (BURREL, 1979; SONGER, 1997) e proporciona uma resistência à hemólise pela toxina  $\beta$ -estafilocócica (SONGER e outros, 1988). Estas duas propriedades deram origem a 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 intradérmica (GOEL e SINGH, 1972; MUCKLE e GYLES, 1983), assim como à aderência a eritrócitos (BROGDEN e outros, 1990).

A seqüência de nucleotídeos dos genes de *C. pseudotuberculosis* biotipos *equi* e *ovis*, *Corynebacterium ulcerans* e *Arcanobacterium haemoliticum*, para a fosfolipase D, demonstrou uma homologia de que varia de 64 a 98% (McNAMARA e outros, 1995). O gene da fosfolipase D de *C. pseudotuberculosis*, já foi clonado e expresso em *Escherichia coli*, codificando uma proteína de 31,5 KDa que é reconhecida por anticorpos no soro de ovelhas naturalmente infectadas com *C. pseudotuberculosis* (SONGER e outros, 1990).

## 2.2- Ocorrência da linfadenite caseosa

A linfadenite caseosa é considerada uma doença de ocorrência mundial, sendo descrita em todos países que possuem significativa população de caprinos e ovinos, como: Grã-Bretanha, Noruega, Holanda, Nova Zelândia, Estados Unidos, Austrália, Argentina e Brasil (ANDERSON e NAIRN, 1984), Egito, Índia, Turquia, Sudão, França e Canadá (BATEY, 1986b). No Paquistão, relatou-se *C. pseudotuberculosis* como agente etiológico da linfadenite caseosa em camelos (AFZAL e SAKIR, 1986).

A doença esta presente em várias regiões do Brasil. Em um estudo realizado no Ceará em rebanho caprino, demonstrou-se que a linfadenite caseosa era responsável por 27,7% dos abscessos encontrados nos animais (UNANIAN e outros, 1985).

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).

## 2.3- Transmissão

*C. pseudotuberculosis* é capaz de permanecer viável no ambiente por longos períodos. O microrganismo pode alojar-se em superfícies e continuamente infectar animais por contato direto. Portanto, a alta persistência do microrganismo no ambiente parece ser o principal fator responsável pela sua manutenção dentro de um rebanho. O modo de transmissão desta bactéria se dá pelo contato do animal hígido com elementos contaminados do ambiente e outros animais doentes com granulomas superficiais ou pulmonares exudativos (ELLIS e outros, 1987)

A forma de contágio ainda é controversa, provavelmente, ocorrendo através do contato entre o drenado do linfonodo comprometido de animais doentes, e a pele ou as mucosas íntegras de animais sadios, ou, onde existam soluções de continuidade (BURREL, 1981; BATEY, 1986a), pode ocorrer ainda por aspiração de aerossóis (CHAPLIN, 1999). Segundo Paton e outros (1995), a fonte de microrganismos em rebanhos ovinos, pode ser lesões pulmonares clinicamente não diagnosticadas. Tais lesões seriam responsáveis pela liberação das bactérias em aerossóis.

Assim como existem divergências quanto à porta de entrada do *C. pseudotuberculosis* no organismo do animal, é discutível como o microrganismo chega até os linfonodos. A hipótese mais aceita é que a infecção ocorra na pele ou na mucosa e a partir daí, chegue aos linfonodos ou a outros órgãos (BURREL, 1981; BATEY, 1986a).

No caso específico dos 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 mucosa oral e pele. Em estudos sobre indução experimental da linfadenite caseosa em cabras, demonstrou-se que 100% dos animais infectados por inoculação subgengival apresentaram granulomas mandibulares (ASHFAQ e CAMPBELL, 1980). 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.

## 2.4-Patogenia

*C. pseudotuberculosis* é um microrganismo comum nos animais de criação. Em ovelhas, este microrganismo afeta linfonodos superficiais, pele e tecido subcutâneo, pulmão e outras partes do corpo. Infecções em várias partes do corpo tem sido relatada em eqüinos, bovinos, búfalos, cabras e cervos (ZACKI, 1976). As lesões internas acarretam perda de peso e deficiência reprodutiva, podendo levar o animal à morte (BURREL, 1981).

A patogenia de *C. pseudotuberculosis* não está completamente esclarecida, mas os dois fatores de virulência já descritos, os lipídeos de parede e a fosfolipase D são importantes neste processo (BROWN e OLANDER, 1997).

Estudos “in vitro” com neutrófilos de ovinos, demonstraram que a fosfolipase D, quando, no interior das células tem a habilidade de destruí-las. Assim a fosfolipase D pode aumentar a sobrevivência do *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro, devido à capacidade de destruir e escapar destas células (YOZWIAK e SONGER, 1993).

Mcnamara e outros (1994), utilizando linhagens mutantes com o gene da fosfolipase D deletado, demonstraram que estes mutantes não são capazes de estabelecer uma infecção primária ou a formação de granulomas nos linfonodos regionais, confirmando que a exotoxina está envolvida na persistência e disseminação da bactéria no organismo hospedeiro.

A camada lipídica na superfície externa da parede, tem uma composição que assemelha-se ao ácido micólico encontrado no gênero *Mycobacterium*. Estes lipídeos teriam uma ação letal sobre os macrófagos (HARD, 1975). Estudos de microscopia eletrônica, utilizando macrófagos de caprinos, estabeleceram que apesar de haver a fusão entre o fagossoma e lisossoma, *C. pseudotuberculosis* sobrevive dentro dos



macrófagos, isto se deve provavelmente aos lipídeos de parede (TASHJIAN e CAMPBELL, 1983), que também são considerados como um fator de virulência (JOLLY, 1966; HARD, 1969; MUCKLE e GYLES, 1983).

Após a entrada da bactéria no hospedeiro ocorre uma disseminação rápida do microrganismo livre ou dentro dos fagócitos a partir dos sítios primários de infecção, levando a uma localização nos linfonodos ou órgãos internos. Neste processo a fosfolipase D tem um papel importante, aumentando a permeabilidade vascular e favorecendo a disseminação da bactéria (CARNE, 1940; JOLLY, 1965; JOLLY, 1966; BATEY, 1986). Em outros estudos, demonstrou-se que a fosfolipase D além de degradar a esfingomielina em fosfato de ceramida e colina e estimula a liberação de histamina, aumentando a permeabilidade vascular (CARNE e ONON, 1978).

Tambourgi e outros (2002), em um estudo com eritrócitos de humanos, demonstraram que a fosfolipase D, que tem ação de esfingolmielinase, induzia hemólise dependente de complemento através via clássica. A fosfolipase D hidrolisa a esfingomielina em fosfato de ceramida, que tem um grupamento polar semelhante ao ácido fosfatídico, que tem afinidade por anexina V. De acordo com estes autores, possivelmente a anexina V se ligaria ao fosfato de ceramida nos eritrócitos tratados com fosfolipase D. Desta forma, através da anexina V, seria ativada a via clássica do complemento, causando a destruição dos eritrócitos.

## **2.5-Resposta imunológica a *Corynebacterium pseudotuberculosis***

A imunidade a *C. pseudotuberculosis* é atribuída a mecanismos humorais e celulares (MUCKLE e outros 1992; LAN e outros 1998). Cameron e Engelbrecht, (1971), demonstraram a proteção por anticorpos, através de imunização passiva em

camundongos com soro de coelhos imunizados contra *C. pseudotuberculosis*. O efeito protetor foi associado à capacidade dos anticorpos atuarem contra a disseminação da bactéria. Yozwiak e Songer(1993), constataram que a presença de anticorpos anti-fosfolipase D antes da infecção, exercem um efeito protetor, dificultando a disseminação da bactéria para os linfonodos.

*C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo que se multiplica dentro de macrófagos. A imunidade protetora deste microrganismo está associada à população de células reticuloendoteliais que desenvolve um aumento na habilidade de matar ou inibir a multiplicação desta bactéria (LAM e outros,1999). A importância dos neutrófilos e macrófagos, células predominantes nas infecções por *C. pseudotuberculosis*, foi ressaltada por Jolly (1965b).

Em um estudo da interação de macrófagos caprinos com *C. pseudotuberculosis*, verificou-se que ocorria a fusão do fagossoma com o lisossoma. Apesar de a bactéria sobreviver dentro do fagolisossoma e o macrófago poder ser destruído. O microrganismo aparentemente resiste à morte e digestão no interior dos fagócitos devido aos lipídeos de parede (TASHJIAM e CAMPBELL, 1983).

Os granulomas são formados por várias camadas, internamente por um centro necrótico, seguido por uma camada rica em macrófagos, uma zona com predominância de linfócitos T CD4, CD8 e  $T\gamma\delta$  e uma zona rica em linfócitos B, limitada externamente por uma cápsula fibrótica. (WALKER e outros,1991; PÉPIN e outros, 1994). Nas lesões imaturas existe uma predominância de células T CD4 e nas lesões maduras T CD8 e  $T\gamma\delta$  (PÉPIN e outros, 1994).

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.

A resistência a infecções causadas por bactérias intracelulares facultativas está relacionada às células T CD4 e mais especificamente aos clones Th1, pelo aumento da atividade microbicida dos macrófagos pela produção de  $\text{INF-}\gamma$  e  $\text{TNF-}\alpha$ . O papel das células T CD8 na resistência deste tipo de infecção, está relacionada à capacidade de produzir  $\text{INF-}\gamma$  e lise de células infectadas. Em estudos realizados em camundongos, administrando-se anticorpo anti-CD4 e anti-CD8, observou-se aumento do crescimento bacteriano e conseqüentemente morte dos animais, bem como redução na produção de  $\text{INF-}\gamma$ , o que sugere que ambas as populações de linfócitos são importantes na resistência a *C. pseudotuberculosis* (LAM e outros, 1998).

Em infecções causadas por *C. pseudotuberculosis* foi demonstrado através de RT-PCR o aumento nos níveis de  $\text{INF-}\gamma$  e  $\text{TNF-}\alpha$ , associado a baixas concentrações de IL-4 no local da infecção em ovinos experimentalmente inoculados (PÉPIN e outros, 1997).

## 2.6-Diagnóstico

Em pequenos ruminantes, a presença de granulomas externos é altamente sugestivo de linfadenite caseosa, principalmente em rebanhos endêmico. Quando o material caseoso é devidamente coletado e enviado ao laboratório de bacteriologia é possível identificar o agente etiológico. Por se tratar de uma doença crônica, o animal que não apresenta sinais clínicos evidentes, pode ser um disseminador do microrganismo. O diagnóstico sorológico é uma forma de se identificar os animais infectados e afastá-los do restante do rebanho (WILLIAMSON, 2001).

Muitos testes sorológicos para diagnóstico de linfadenite caseosa foram descritos, como a aglutinação em tubo, fixação de complemento, hemaglutinação indireta, inibição da hemólise sinérgica e *Western blotting* (TER LAAK e outros, 1992). A maioria destes testes detecta anticorpos contra a exotoxina de *C. pseudotuberculosis* (BROWN E OLANDER, 1987).

Comparando-se a aglutinação em tubo, fixação de complemento, difusão em gel, inibição da anti-hemolisina, hemaglutinação indireta, constatou-se que a hemaglutinação indireta era mais confiável e detectava os anticorpos contra a exotoxina por um período maior que os outros testes, possuindo uma vantagem para o diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* (SHIGID, 1979).

A inibição da hemólise sinérgica foi desenvolvida para o diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* em eqüinos. O teste baseia-se na neutralização provocada pela presença de anticorpos anti-fosfolipase D de *C. pseudotuberculosis*. A reação dos anticorpos com a exotoxina impede que aconteça hemólise sinérgica característica com a toxina de *Rhodococcus equi* em Agar sangue (KNIGHT, 1978). Este teste mostrou-se sensível, embora com pouca especificidade, uma vez que, pode conferir resultados

positivos em animais infectados por outros agentes etiológicos, como o *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacterium pyogenes* e outros bacilos Gam positivos (BROWN e outros, 1986; BROWN e outros, 1987).

Kuria (1989), comparando o teste de inibição da hemólise sinérgica com o ELISA, verificaram que o ELISA era muito mais eficiente do que a inibição da hemólise sinérgica.

Nos testes ELISA têm sido utilizados vários preparados antigênicos como a parede celular bacteriana, que contém um grande número de proteínas imunologicamente ativas (SHEN e outros, 1982; SUTHERLAND e outros, 1987; STING e outros, 1998), a exotoxina (MAKI e outros, 1985; SUTHERLAND e outros, 1987; TER LAAK e outros, 1992; STING e outros, 1998; DERCKENSEN e outros, 2000; CARMINATI e outros, 2003), Exotoxina recombinante (MENZIES e outros, 1994) ou antígeno preparado a partir do aquecimento da massa bacteriana em uma solução de SDS com 2-mercaptoetanol (KABA e outros, 2001).

Maki e outros (1985), em estudos realizados em ovinos, compararam a exotoxina e o sonicado de célula como antígenos para o ELISA, constatando-se que a exotoxina era mais sensível.

Ter Laak e outros (1992), desenvolveram um teste ELISA sanduíche para detecção de anticorpos contra a exotoxina de *C. pseudotuberculosis*. Foi utilizado como anticorpo de captura, soro hiperimune de coelho contra o sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI. Os soros com resultados inconclusivos foram submetidos a técnica de *Western blotting*. A especificidade e sensibilidade foram de aproximadamente de 100%.

Em um estudo visando padronizar um teste ELISA para diagnóstico em caprinos, utilizou-se antígenos extraídos por SDS da parede celular (antígeno somático) e em paralelo os antígenos obtidos em cultura de 48 horas em caldo BHI, onde a massa bacteriana foi retirada por centrifugação seguida por posterior filtração. Considerando-se os resultados positivos para um dos dois antígenos testados a sensibilidade observada foi de 96%. Quando avaliados separadamente a sensibilidade observada foi de 88% para o antígeno de parede celular e 73% para o antígeno filtrado da cultura. A especificidade considerando o teste negativo para o antígeno de parede celular foi de 77% enquanto que para o filtrado foi de 92% (STING e outros,1998). Resultados semelhantes foram encontrados por Sutherland e outros (1987), em um experimento realizado em ovinos, no qual verificou-se uma sensibilidade para antígenos de parede de 76% e de 67% para os antígenos secretados em caldo BHI. Quanto à especificidade, alcançaram uma média de 73% para os antígenos de parede e 77% para os antígenos secretados. Os antígenos de parede celular, de acordo com os autores destes trabalhos, revelaram serem mais sensíveis, porém menos específicos que os antígenos secretados.

Derkensen e outros (2000), desenvolveram um teste ELISA sanduíche, baseado no teste ELISA descrito por Ter Laak e outros em 1992, para detecção de *C. pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos, com o objetivo de melhorar a sensibilidade. Foi utilizado neste ensaio como anticorpo de captura soro hiperimune de coelho contra os antígenos secretados por *C. pseudotuberculosis*, em cultura de 72 horas a 37°C em caldo BHI. Através deste teste ELISA melhorado, constatou-se uma sensibilidade equivalente a 72±5% e uma especificidade da ordem de 99±1% em caprinos e de 51±6% e 97±2%, respectivamente em ovinos.

Kaba e outros (2001), padronizaram um teste ELISA, cujo antígeno foi obtido a partir do aquecimento da massa bacteriana com SDS e 2-mercaptoetanol, seguido de centrifugação e o sobrenadante foi utilizado como antígeno. Desta forma, obteve-se uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 96%, utilizando como referência a técnica de *Western Blotting*.

Alguns autores questionam a utilização apenas de métodos sorológicos para o diagnóstico de linfadenite caseosa, e defendem o seu uso principalmente para estudos epidemiológicos (STING e outros, 1998). De acordo com estes, o uso de métodos sorológicos na tentativa de erradicação da linfadenite caseosa é bastante controverso. Entretanto, pesquisadores como Ter Laak e outros (1992) e Dercksen e outros (2000) preconizam o uso de métodos sorológicos em programas de erradicação da linfadenite caseosa, como respaldo para a eliminação de animais com sorologia positiva. Estes autores defendem o uso da técnica de *western blotting* para confirmar os casos suspeitos (TER LAAK e outros, 1992) ou a repetição do teste de ELISA após 4 semanas (DERCKSEN e outros, 2000). De acordo com Ter Laak e outros, (1992), o teste de *western blotting* pode ser usado como prova para a confirmação de um resultado positivo, embora se o resultado do teste de ELISA se mostrar duvidoso, freqüentemente o *blotting* também se revelará inconclusivo. Ainda de acordo com Ter Laak e outros (1992), os soros de ovinos se mostram mais freqüentemente inconclusivos do que os soros de caprinos.

Menzies e outros (2004), compararam a detecção de *C. pseudotuberculosis* em cabras experimentalmente infectadas através da dosagem do INF- $\gamma$  utilizando um ELISA para interferon gama bovino disponível comercialmente e a resposta sorológica

através de um ELISA utilizando a fosfolipase D recombinante como antígeno. Utilizando o ELISA INF- $\gamma$  para detectar a infecção por *C. pseudotuberculosis* em cabra experimentalmente infectada, constatou-se uma sensibilidade de 89,2% e uma especificidade de 97,1%. Utilizando o ELISA fosfolipase D em cabras experimentalmente infectadas, obteve-se uma sensibilidade de 81% e especificidade de 97%. Prescott e outros (2002), em um estudo realizado com ovinos, visando identificar a infecção por *C. pseudotuberculosis* através da dosagem de INF- $\gamma$ , constataram uma sensibilidade de 95,7% em ovelhas experimentalmente infectadas e uma especificidade de 95,5%.

O diagnóstico molecular está revolucionando a prática clínica das doenças infecciosas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica bem desenvolvida e possui um amplo potencial para detecção de patógenos (YANG e ROTHMAN, 2004).

Mikhailovich e outros (1995), utilizaram a PCR para detectar cepas toxigênicas de *Corynebacterium diphtheriae* e relatam que o uso desta técnica aumenta a probabilidade de diagnóstico das doenças infecciosas.

Çetinkaya e outros (2002), em um estudo na Turquia, examinaram 2046 ovelhas e 2262 cabras, encontrando-se 118 animais com granulomas, onde isolou-se *C. pseudotuberculosis* em 96 amostras e em 93 destas amostras obteve-se a amplificação de um fragmento de 815 bp. Concluíram que a PCR específica para *C. pseudotuberculosis* baseada em oligonucleotídeos iniciadores do gene 16S rRNA, poderia ser utilizada para detecção de microrganismos cultivados, na identificação da linfadenite caseosa e em estudos de vacina. Em um estudo no Peru, para avaliar a



eficácia de uma vacina, utilizou-se a PCR para identificar *C. pseudotuberculosis* em animais que tiveram granulomas durante o experimento (MEDRANO e outros, 2003).

## **2.7- Linfadenite caseosa no homem**

Lopez e outros (1966), relataram o primeiro caso de *C. pseudotuberculosis* em um homem. O quadro clínico caracterizava-se por fadiga, dor muscular, fígado aumentado e macio e linfadenopatia localizada. A caracterização de *C. pseudotuberculosis* foi realizada pela identificação microbiológica do material coletado através de aspiração e incisão do linfonodo inguinal. Ao exame anatomo-patológico do linfonodo afetado, observou-se áreas com foco de inflamação crônica, com células epitelióides circundadas por reação fibroblástica, caracterizando linfadenite esclerótica crônica.

Na Austrália, relatou-se dez casos de linfadenite em humanos devido a infecção por *C. pseudotuberculosis*. Muitos dos casos relatados, foram relacionados a pessoas que estão expostas a ovelhas. Os casos de linfadenite supurativa foram tratados por incisão e drenagem do pus, antibioticoterapia sem a identificação microbiológica do agente. As características histopatológicas das lesões podem confundir com outros agentes infecciosos. Contudo, o aumento no uso de vacinas contra linfadenite caseosa em ovelhas na Austrália, levou a uma diminuição da incidência humana desta zoonose (PEEL e outros, 1997).

Mills e outros (1997), relataram um caso em um jovem estudante com a presença de uma massa na axila. O paciente apresentava febre, dor e indisposição. Este paciente estava exposto a ovelhas e bovinos. Os autores sugerem a probabilidade que a infecção tenha ocorrido a partir das fezes de um animal, talvez por uma lesão na

pele. Em um estudo de infecção por *C. pseudotuberculosis* em um açougueiro, verificou-se através de antibiograma que o microrganismo era sensível a penicilina, amoxicilina, eritromicina e ciprofloxacina, mas era resistente a oxalilina e aminoglicosídeos. A antibioticoterapia, apresentou-se como um tratamento eficaz. Embora, *C. pseudotuberculosis* seja sensível a muitos antibióticos “in vitro”, a alta concentração celular de macrolídeos é uma vantagem. O infiltrado eosinófilico sugeriu a possibilidade de infecção por *C. pseudotuberculosis* (BREGENZER e outros, 1997).

A linfadenite caseosa ocorre com pouca frequência em seres humanos, mas possui um potencial zoonótico já demonstrado e uma boa higiene quando se manuseia animais doentes e materiais contaminados com exudatos é importante para impedir a propagação desta doença (PEEL e outros, 1997).

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1-OBJETIVO GERAL**

Avaliar a sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA para diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos.

#### **3.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Padronizar um teste ELISA indireto com antígeno produzido através da técnica de separação em três fases (TPP).
- Padronizar um teste ELISA indireto com antígeno usando como antígeno o sobrenadante da cultura em caldo BHI.
- Padronizar um teste ELISA sanduiche usando o antígeno produzido através da técnica de separação em três fases (TPP) para sensibilizar coelhos *New Zealand*, com a finalidade de obter soro hiperimune.
- Padronizar um teste ELISA sanduiche usando como antígeno para sensibilizar coelhos *New Zealand* o sobrenadante da cultura em caldo BHI.para produção de soro hiperimune.
- Comparar os quatro testes ELISA propostos quanto à sensibilidade e especificidade.

- Comparar o resultado da identificação presuntiva de *C. pseudotuberculosis* pelas técnicas microbiológicas clássicas com a reação de polimerase em cadeia usando *primers* descritos na literatura.
- Utilizar o isolamento e identificação de *C. pseudotuberculosis* como padrão ouro.

## **4- MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1-AMOSTRAS**

Foram utilizados quarenta e nove soros de animais que apresentavam granulomas em linfonodos superficiais, dos quais isolou-se *C. pseudotuberculosis*. Todos os animais eram sem raça definida e oriundos de rebanhos do sertão da Bahia, pertencentes a criadores dos municípios de Andorinha, Juazeiro, Santa Luz e Uauá .

Os cinquenta soros negativos foram obtidos a partir de animais clinicamente sadios, provenientes de animais do sertão da Bahia pertencentes a criadores dos municípios de Campo Alegre de Lourdes, Remanso, Pilão Arcado, Casa Nova e Juazeiro.

### **4.2- IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO**

O material caseoso dos linfonodos foi coletado a campo, tendo a contenção do animal sido feita pelo tratador da propriedade. Procedeu-se a identificação do animal através de colocação de um brinco com numeração para controle do Laboratório de Imunologia- ICS-UFBA . Após a tricotomia e assepsia do local com álcool iodado, realizou-se uma pequena incisão na pele e da cápsula do granuloma com lâmina de bisturi estéril com aproximadamente 1 cm, desprezou-se a primeira quantidade, colocando-se em seguida a amostra em um coletor universal estéril. O material foi acondicionado em caixa de isopor com gelo por no máximo 48h, sendo então conduzido ao laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA. O

material caseoso coletado foi semeado em placas de agar BHI, enriquecido com 5% de sangue de carneiro. Após 48h de incubação a 37<sup>o</sup> C, em aerobiose, uma colônia suspeita de cada placa foi repicada para outra placa de agar BHI com 5% de sangue de carneiro e duas outras para caldo BHI, para evidenciar o crescimento característico. Foi realizada a coloração de Gram, e evidenciados bacilos Gram positivos curtos e pleomórficos. Foram realizadas prova da urease (meio de Christensen), catalase e fermentação de lactose, glicose, sacarose, maltose e manose. Após a identificação positiva, foi realizada ainda a prova da hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* ATCC33701. O resultado das provas realizadas permitiu a identificação de *C. pseudotuberculosis* em todas as amostras.

O isolamento e identificação de *C. pseudotuberculosis*, foi utilizado como padrão ouro para avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes estudados.

### **4.3- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

#### **4.3.1- EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *C. pseudotuberculosis* UTILIZANDO O MÉTODO DE LISE ALCALINA E PURIFICAÇÃO COM FENOL-CLOROFÓRMIO**

Para a extração do DNA genômico da *C. pseudotuberculosis*, 100 µl da cultura congelada foi inoculada em 10 ml de meio BHI, em tubo de 50 ml e incubada a 37°C durante 48 horas. Após esta etapa, a cultura foi dividida em 5 tubos de 2 ml, centrifugada a 13.800 g durante sete minutos em uma minicentrífuga MSE; o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 ml da solução I (Tris-

HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 5 mM pH 8.0, NaCl 300 mM). Em seguida a mistura foi centrifugada a 5.200 g e ao precipitado foi acrescentou-se 300  $\mu$ l da solução I, e 100  $\mu$ l de lisozima (10 mg/ml), os tubos foram invertidos delicadamente e incubados em banho de gelo durante 10 minutos, sendo então transferidos para banho-maria a 37°C por 10 minutos. Após esse procedimento foi adicionado 100  $\mu$ l de sarcozyl 30% em cada tubo, que foram em seguida homogeneizados e incubados em banho-maria a 65°C por 15 minutos, e em banho de gelo por 5 minutos. Para a purificação do DNA, utilizou-se fenol 1x (1:1 do volume da solução), fenol-clorofórmio 1x (1:1 do volume da solução) e clorofórmio 1x (1:1 do volume da solução). Em seguida a solução foi precipitada com etanol absoluto (2,5: 1 do volume da solução) na presença de 10  $\mu$ l de NaCl (5 M) e incubado a -70°C durante 30 minutos. Ao final da incubação os tubos foram centrifugados por 6 minutos a 8.200 g e o sobrenadante descartado. Ao DNA precipitado foi acrescentado 500  $\mu$ l de etanol 70% e centrifugado sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e os tubos ficaram a temperatura ambiente até secarem completamente. O DNA foi ressuspensão em 20  $\mu$ l de água mili-Q estéril em seguida foram reunidos em um tubo único de 1,7 ml e tratado com RNase A (100  $\mu$ g/ml), em banho-maria a 37°C por 1 hora e congelado a -70°C até a sua utilização.

#### **4.3.2 - DOSAGEM DO DNA GENÔMICO**

A concentração e pureza do DNA genômico foi estimada utilizando 2  $\mu$ l do DNA genômico extraído, ao qual foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5% e glicerol 25%). As amostras foram depositadas em um gel de agarose 1% e

submetidas à eletroforese, utilizando-se o tampão TAE 1X (Tris base 40 mM pH 7.2, NaOAc 20 mM, EDTA 1 mM) e EtBr (0,7 µg/ml), utilizando uma corrente constante de 100 Volts durante 1 hora em cuba horizontal.

#### 4.3.3- PCR DO DNA GENÔMICO

Após a extração, o DNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes *primers*, usados por Pascual e outros (1995), que amplificam uma banda de 1600 bp, referente ao gene do 16S rRNA:

PA senso - 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

PH anti-senso - 5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'.

e os *primers* descritos por Çetinkaya e outros(2002), que amplificam uma banda de 815 bp, que seria específica para o gene 16S rRNA de *C. pseudotuberculosis*:

CP1 senso - 5' ACCGCACTTTAGTGTGTGTG 3'

CP2 anti-senso - 5'TCTCTACGCCGATCTTGTAT 3'

As reações de amplificação foram feitas com um volume final de 10 µl, contendo 20 pM de cada iniciador, 0,25 mM de dNTPs, 1 unidade de Taq DNA polimerase (GIBCO BRL), 2mM de MgCL<sub>2</sub> e tampão da enzima 1X concentrado (GIBCO BRL). A reação foi realizada em um aparelho termociclador “Mini-cycler™ MJ Reserch”. O programa utilizado foi: 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto e 40 segundos; 72°C por 8 minutos.

Após a reação, o volume total das mesmas foi depositado em um gel de agarose 1% e submetidas à eletroforese, utilizando-se o tampão TAE 1X (Tris base 40



mM pH 7.2, NaOAc 20 mM, EDTA 1 mM) e 0,5 µg/ml de EtBr utilizando uma corrente constante de 100 Volts durante 60 minutos em cuba horizontal.

#### **4.4- PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS SECRETADO EM MEIO BHI**

##### **4.4.1- ANTÍGENO SECRETADO EM MEIO BHI**

A linhagem bacteriana utilizada na preparação do antígeno foi obtida a partir de animal infectado, da região de Santa Luz, no interior do Estado da Bahia. Esta cepa vem sendo mantida na coleção do Instituto de Ciências da Saúde e foi codificada como T1.

A bactéria foi cultivada em caldo BHI por 72 h a 37<sup>o</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 µm. A dosagem de proteína foi feita através do método de 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 obtido foi estocado a - 20<sup>o</sup>C.

##### **4.4.2- ANTÍGENO TPP EM MEIO BHI**

Foi usada a mesma linhagem T1 do antígeno secretado em caldo BHI. A bactéria foi cultivada em caldo BHI por 72 h a 37<sup>o</sup> 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 µm. 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°C.

#### **4.5- OBTENÇÃO DO SORO HIPERIMUNE**

##### **4.5.1- SORO HIPERIMUNE CONTRA O ANTÍGENO SECRETADO EM MEIO BHI**

Para produção do soro hiperimune, imunizou-se coelhos *New Zeland* adultos. Para inativação da toxina, utilizou-se 174 µl de formaldeído em 2 ml do antígeno secretado. O toxóide foi diluído em 2 ml de adjuvante completo de Freund (Sigma). Foi inoculado 6,02 mg/ml do antígeno para cada coelho (Ter Laak e outros, 1992). O Antígeno foi inoculado via intra-muscular em quatro sítios, perfazendo uma dose de 500 µl por sítio. Realizou-se um booster no 30<sup>o</sup> dia com o mesmo antígeno diluído em adjuvante incompleto de Freund (Sigma). No 45<sup>o</sup> dia, os coelhos foram sangrados por punção da artéria auricular, com agulha de 0,80 x 25, para obtenção do soro, o qual foi mantido a -20°C.

##### **4.5.2-SORO HIPERIMUNE CONTRA O ANTÍGENO TPP**

Para produção do soro hiperimune, imunizou-se coelhos *New Zeland* adultos. Para inativação da toxina, utilizou-se 174 µl de formaldeído em 2 ml do antígeno TPP. O toxóide foi diluído em 2 ml de adjuvante completo de Freund (Sigma). Foi inoculado 1,0 mg/ml do antígeno para cada coelho (Harlow e Lone, 1988). O Antígeno foi inoculado via intra muscular em quatro sítios, perfazendo uma dose de 500 µl por sítio.

Realizou-se um booster no 30<sup>o</sup> dia com o antígeno diluído em adjuvante incompleto de Freund (Sigma). No dia 45<sup>o</sup> dia, os coelhos foram sangrados por punção da artéria auricular, com agulha de 0,80 x 25, para obtenção do soro, que foi mantido a -20<sup>o</sup>C.

#### **4.5.3- TITULAÇÃO DO SORO HIPERIMUNE**

O título de anticorpos do soro hiperimune de coelho foi obtido utilizando um teste ELISA indireto. Na fase sólida foram usadas microplacas de poliestireno de fundo chato (COSTAR 3590). As placas foram sensibilizadas com o antígeno secretado BHI na diluição de 1:100 por poço e o antígeno TPP da concentração de 0,5 µg por poço e, então, incubadas por toda a noite a 4<sup>o</sup>C em câmara úmida. No dia seguinte as placas foram lavadas 2 vezes com PBS-Tween 0,05% e bloqueadas com leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em PBS-Tween e incubou-se durante 2 horas a 37<sup>o</sup>C. Em seguida lavou-se as placas 1 vez com PBS-Tween e adicionou o soro de coelho diluído em PBS-Tween, com diluições crescentes a partir de 1:100. Incubou-se a 37<sup>o</sup>C por 1 hora. Após a incubação lavou-se as placas 5 vezes com PBS-T e em seguida acrescentou-se o anticorpo anti-IgG de coelho 1:5000 (Sigma) conjugado à peroxidase diluído em PBS-Tween. Incubou-se por 1 hora a 37<sup>o</sup>C e lavou-se 5 vezes com PBS-Tween. Foi usado como cromógeno a orto-fenilendiamina (OPD- MERCK), adicionado 50 µl/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%). As placas foram incubadas 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 e as placas lidas em espectrofotômetro (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) com filtro de 490 nm de comprimento de luz. A diluição de uso do soro hiperimune de

coelho foi fixada em 1:50 para o antígeno secretado BHI e 1:2000 para o antígeno TPP.

#### **4.6- TESTE ELISA**

##### **4.6.1- 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 pH 9,6 para uma concentração final de 1:100 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 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°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.

#### **4.6.2- ELISA SANDUÍCHE COM ANTÍGENO SECRETADO BHI**

Foram usadas, como fase sólida, placas de poliestireno de fundo chato, (COSTAR 3590). A placa foi sensibilizada com 50 µl por poço do soro hiperimune produzido a partir do antígeno secretado BHI, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 para uma concentração final de 1:50 por poço 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 Soro Albumina Bovina (Sigma), a 3% 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 por poço do antígeno secretado diluído em PBS 0,05% de Tween 20 com BSA 0,5% para uma concentração final de 1:100 e incubado a 37°C por 1 hora. Após a incubação a solução foi descartada e a placa lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS-T 20) A seguir adicionou-se 50 µl do soro diluído 1:100 em PBS 0,05%

Tween 20 0,5% BSA e incubados por 1 hora a 37°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 1:5.000 e incubado por 45 minutos a 37°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 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.

#### **4.6.3- 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 pH 9,6 para uma concentração final de 0,5 µg por poço 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°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°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.

#### **4.6.4- ELISA SANDUÍCHE 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 soro hiperimune produzido a partir do antígeno TPP, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M

pH 9,6 para uma concentração final de 1:2000 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 Soro Albumina Bovina (BSA) Sigma, a 3% 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 por poço do antígeno TPP diluído em PBS 0,05% de Tween 20 com BSA 0,5% para uma concentração final de 0,5 µg/poço e incubado a 37°C por 1 hora. Após a incubação a solução foi descartada e a placa lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS-T 20). A seguir adicionou-se 50 µl do soro diluído 1:100 em PBS 0,05% Tween 20 com BSA 0,5% e incubados por 1 hora a 37°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°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 l 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.

#### 4.6.5- 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- a 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.

#### 4.6.6-CÁLCULO DO VALOR PREDITIVO POSITIVO E VALOR PREDITIVO NEGATIVO

Os cálculos foram realizados utilizando os resultados obtidos com os 99 soros testados, tendo como padrão ouro o isolamento microbiológico de *C. pseudotuberculosis* na lesão caseosa. Para estes cálculos utilizou-se a seguinte fórmula:

VALOR PREDITIVO POSITIVO:  $\frac{\text{positivos verdadeiros}}{\text{positivos verdadeiros} + \text{positivos falsos}}$

VALOR PREDITIVO NEGATIVO:  $\frac{\text{negativos verdadeiros}}{\text{negativos verdadeiros} + \text{negativos falsos}}$

negativos falsos + negativos verdadeiro

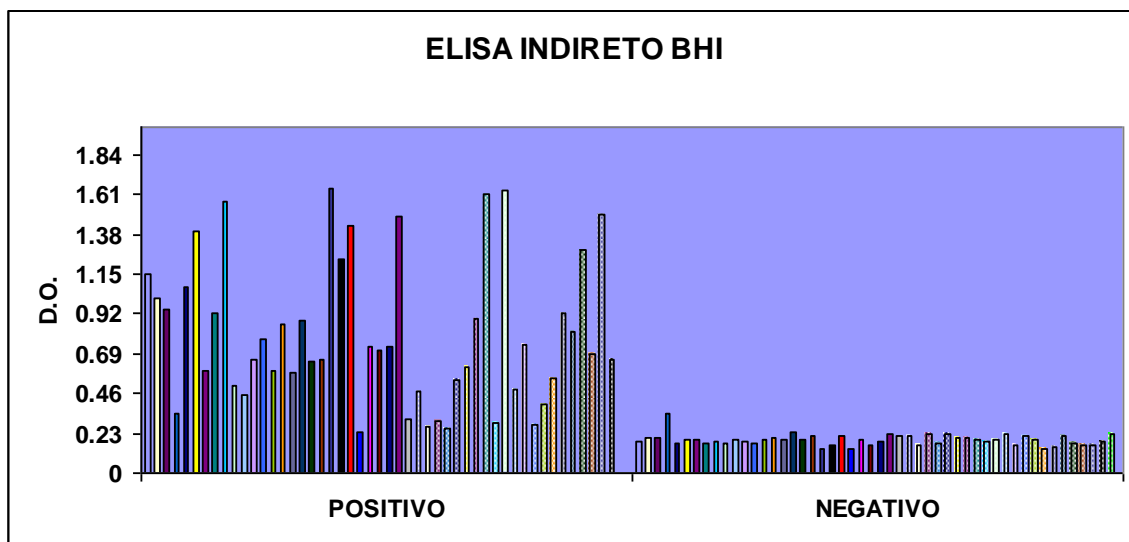
#### **4.7- ESTUDO ESTATÍSTICO**

Os quatro testes ELISA, o isolamento microbiológico e a PCR foram comparados por determinação do índice concordância Kappa. Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre o resultado dos quatro teste ELISA. A curva ROC foi construída para todos os testes ELISA. O programa utilizado para esta análise estatística foi o SPSS 12.0.

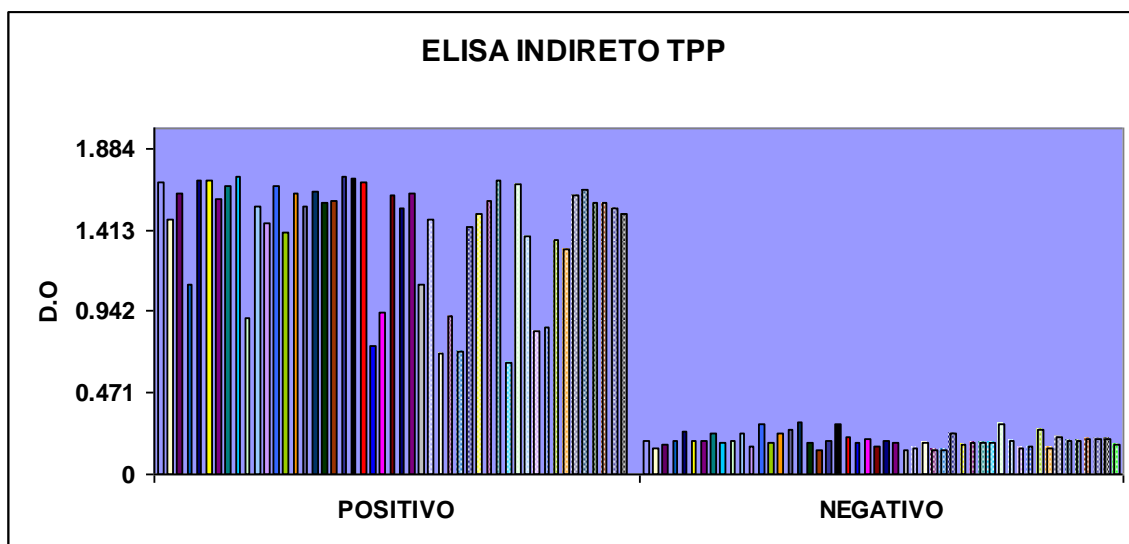
## **5- RESULTADOS**

### **5.1- ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO E ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO SANDUÍCHE**

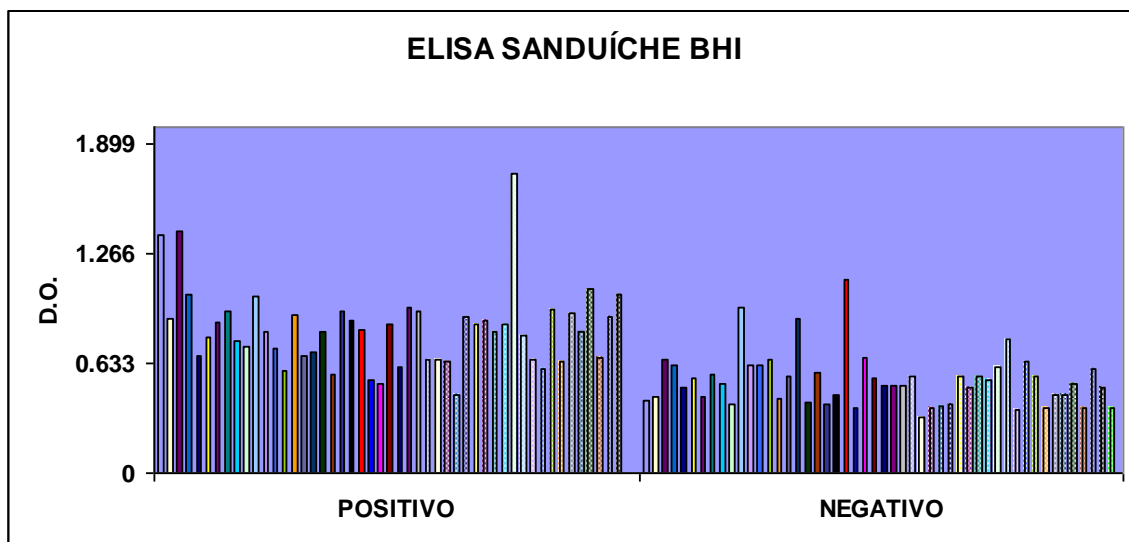
Os valores de DO obtidos com os testes ELISA indireto foram mais baixos que os testes ELISA sanduíche. Os valores de DO do teste ELISA BHI indireto variaram de 0,254 a 1,645 para o soro de animais infectados e de 0,135 a 0,241 para o soro dos animais não infectados. Os valores de DO do teste ELISA TPP indireto variaram de 0,642 a 1,718 para o soro de animais infectados e de 0,134 a 0,300 para o soro dos animais não infectados. Os valores de DO do teste ELISA BHI sanduíche variaram de 0,452 a 1,733 para o soro de animais infectados e de 0,322 a 1,716 para o soro dos animais não infectados. Os valores de DO do teste ELISA TPP sanduíche variaram de 0,316 a 1,573 para o soro de animais infectados e de 0,261 a 0,776 para o soro dos animais não infectados. As figuras 1, 2, 3 e 4 mostram os gráficos que comparam os resultados obtidos entre os animais infectados e os não infectados nos testes ELISA.



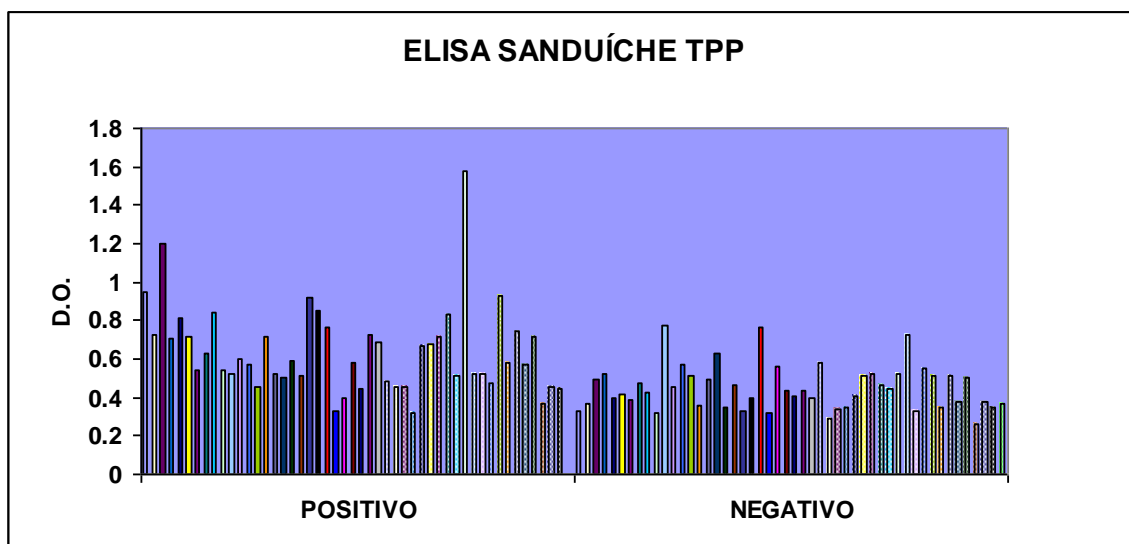
**FIGURA 1- Valores de DO no teste ELISA indireto BHI**



**FIGURA 2 - Valores de DO no teste ELISA indireto TPP**



**FIGURA 3 - Valores de DO no teste ELISA Sanduíche BHI**



**FIGURA 4- Valores de DO no teste ELISA Sanduíche TPP**

Os valores da média e desvio padrão de cada teste ELISA estão descrito na tabela 1.

TABELA 1

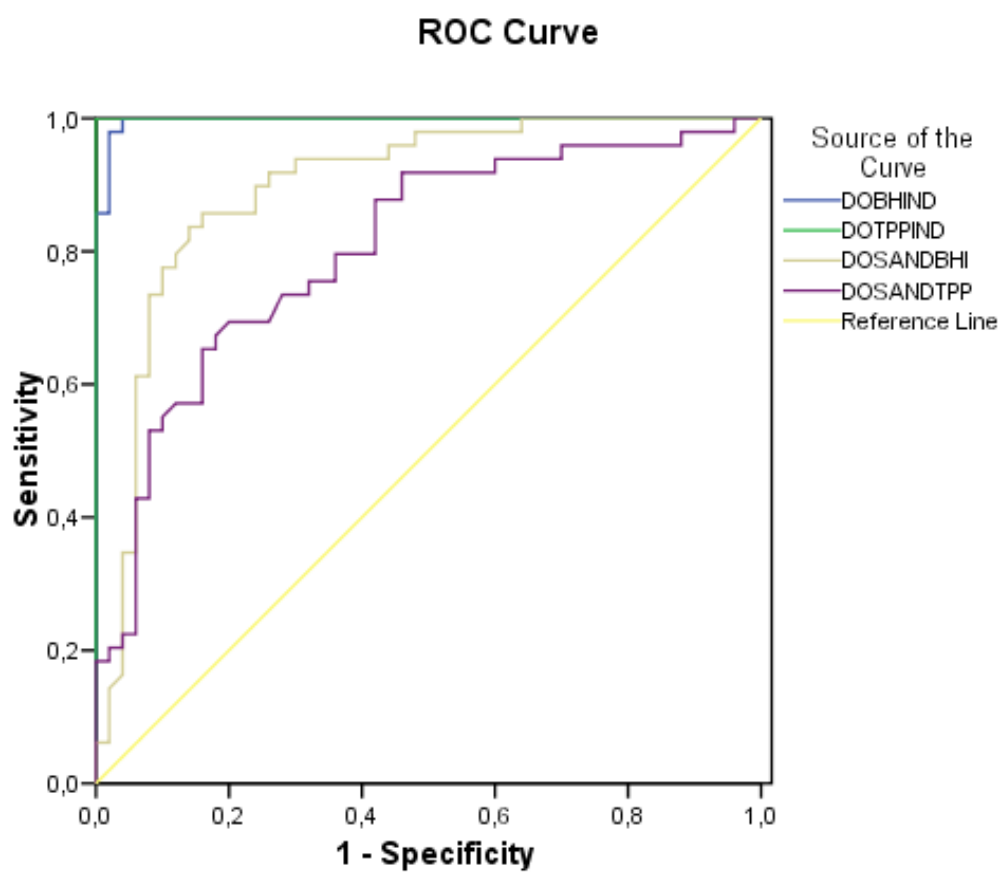
Valores da média e desvio padrão dos animais infectados e não infectados para os testes ELISA

	<i>média</i>	<i>desvio padrão</i>
ELISA indireto BHI (infectados)	0,802	0,0318
ELISA indireto BHI (não infectados)	0,192	0,0123
ELISA indireto TPP (infectados)	1,414	0,0318
ELISA indireto TPP (não infectados)	0,198	0,0103
ELISA sanduíche BHI (infectados)	0,835	0,0182
ELISA sanduíche BHI (não infectados)	0,534	0,0188
ELISA sanduíche TPP (infectados)	0,641	0,0124
ELISA sanduíche TPP (não infectados)	0,445	0,0108

Microsoft Excel

## 5.2 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 TPP foi maior que os outros testes ELISA, seguido pelo ELISA indireto BHI, ELISA sanduíche BHI e sendo a menor área a da curva delimitada pelo ELISA sanduíche TPP. As curvas ROC dos testes ELISA estão demonstradas pela figura 5.



**FIGURA 5- Curva ROC dos testes ELISA**

A tabela 2 demonstra os valores de sensibilidade e especificidade dos testes ELISA de acordo com os seus respectivos pontos de corte. Os valores preditivos positivos e negativos de cada um dos testes encontram-se na tabela 3.

TABELA 2

Valores da sensibilidade e especificidade para os testes ELISA

	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Cut-off</i>
ELISA indireto BHI	98%	98%	0,248
ELISA indireto TPP	100%	100%	0,471
ELISA sanduíche BHI	86%	84%	0,633
ELISA sanduíche TPP	74%	72%	0,512

TABELA 3

Valores Preditivo Positivo e Valores Preditivo Negativo dos testes ELISA

	<i>Valor Preditivo Positivo</i>	<i>Valor Preditivo Negativo</i>
ELISA indireto BHI	98%	98%
ELISA indireto TPP	100%	100%
ELISA sanduíche BHI	86%	84%
ELISA sanduíche TPP	73%	72%



### 5.3- COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES ELISA

Comparando-se o coeficiente de correlação de Pearson entre o ELISA indireto BHI e o ELISA indireto TPP obteve-se um resultado de 0,8429. Quando comparado o ELISA indireto BHI e o ELISA sanduíche BHI obtemos uma correlação de 0,646. Comparando-se o ELISA indireto BHI e o ELISA sanduíche TPP observamos uma correlação de 0,677. A correlação observada entre ELISA indireto TPP com o ELISA sanduíche TPP foi de 0,584. Verificando a correlação entre ELISA indireto TPP e o ELISA sanduíche BHI, observamos um resultado de 0,675. Estes dados estão na tabela 4.

TABELA 4

Correlação entre os ELISAs através do coeficiente de Pearson

	Coeficiente de Pearson
ELISA indireto BHI X ELISA indireto TPP	0,8429
ELISA indireto BHI X ELISA sanduíche BHI	0,646
ELISA indireto BHI X ELISA sanduíche TPP	0,677
ELISA indireto TPP X ELISA sanduíche TPP	0,584
ELISA indireto TPP X ELISA sanduíche BHI	0,675

O índice Kappa calculado entre o ELISA indireto BHI e o ELISA indireto TPP, demonstra uma concordância quase perfeita para um valor de 0,96. Para o ELISA

indireto BHI e o ELISA sanduíche BHI, este índice foi de 0,70, uma concordância substancial e entre o ELISA indireto BHI e o ELISA sanduíche TPP foi de 0,49, uma concordância moderada. Quando o índice Kappa foi calculado entre o ELISA indireto TPP e o ELISA sanduíche TPP, observou-se um resultado de 0,45, uma concordância moderada e entre o ELISA indireto TPP e o ELISA sanduíche BHI foi de 0,70, obtendo-se uma concordância substancial. Os índices Kappa entre os testes encontram-se na tabela 5

TABELA 5

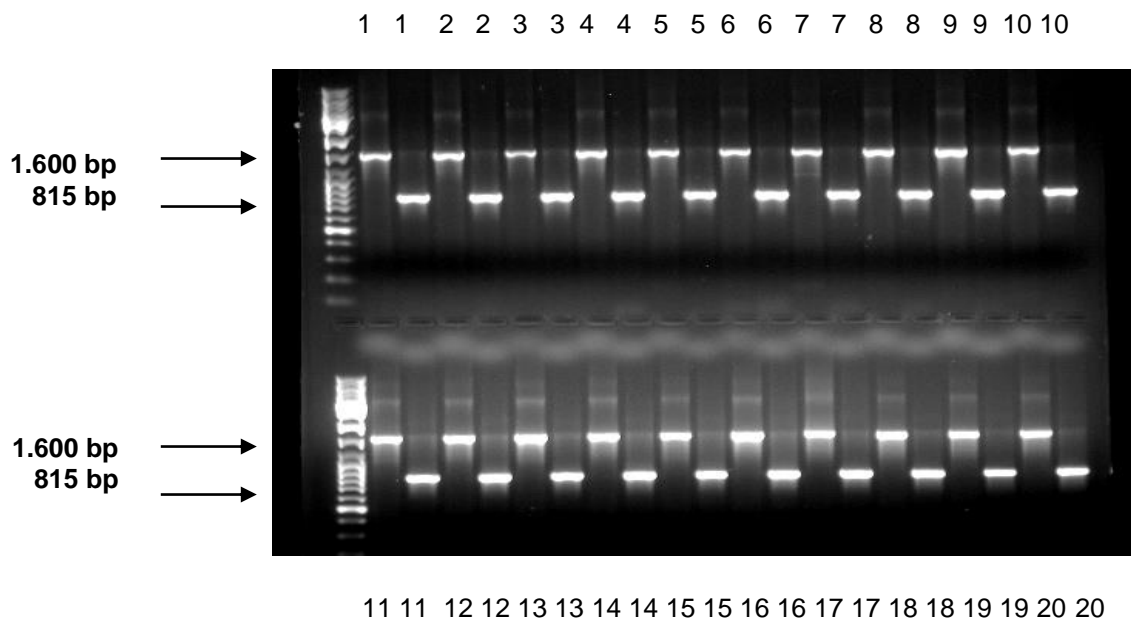
Concordância entre os testes ELISA através do índice Kappa

	Coeficiente de Pearson
ELISA indireto BHI X ELISA indireto TPP	0,96
ELISA indireto BHI X ELISA sanduíche BHI	0,70
ELISA indireto BHI X ELISA sanduíche TPP	0,49
ELISA indireto TPP X ELISA sanduíche TPP	0,45
ELISA indireto TPP X ELISA sanduíche BHI	0,70

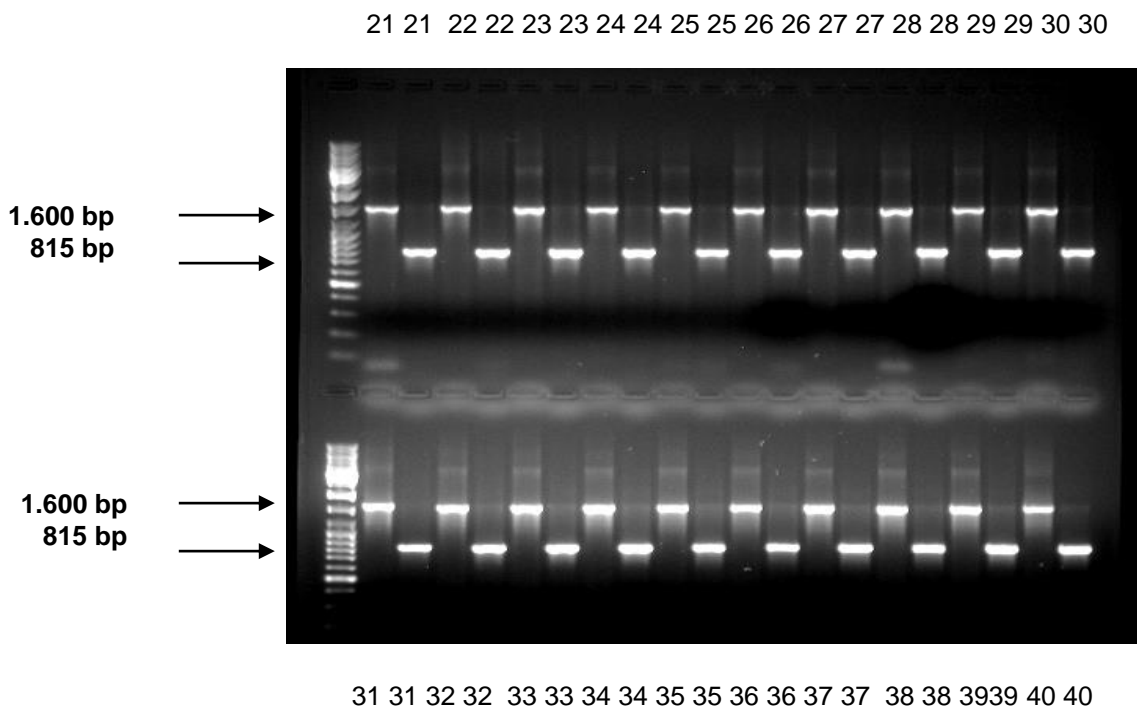
#### 5.4- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Através da PCR, usando-se um par de *primers* obteve-se uma banda de 1.600 bp, e o outro *primer* mais interno em relação ao gene 16S rRNA, também amplifica uma banda de 815 bp. As figuras 6, 7, 8 e 9 demonstram as bandas amplificadas. A figura 10 mostra o resultado obtido quando se utilizou estes *primers* para amplificar o gene

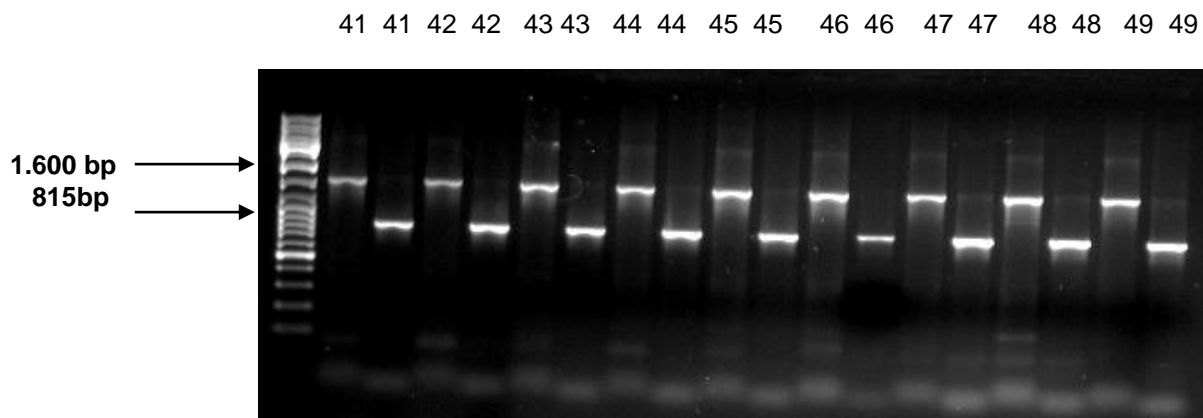
16S rRNA de outras bactérias, como *Arcanobacterium pyogenes*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Arcanobacterium pseudopyogenes*, *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis equi*, filogeneticamente relacionadas. Observou-se que a banda de 1600 bp foi amplificada por todas estes microrganismos, enquanto a banda de 815 bp foi amplificada por todos, exceto *Corynebacterium amycolatum* e *Corynebacterium bovis*.



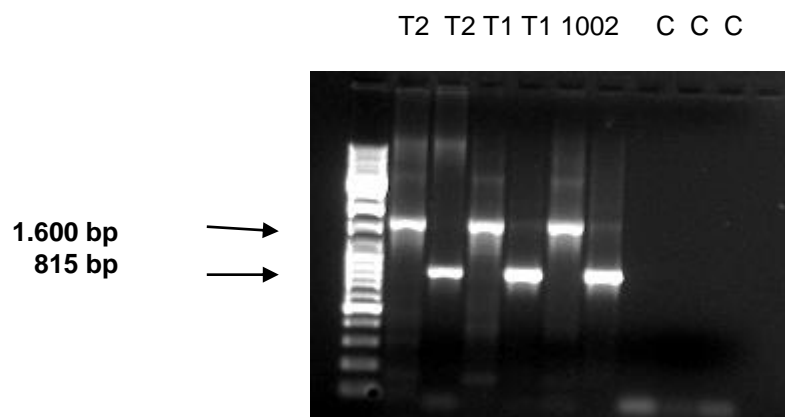
**FIGURA 6-** Resultado da amplificação de bandas das amostras de *C. pseudotuberculosis*. Linha 1 até linha 20, corresponde as respectivas amostras.



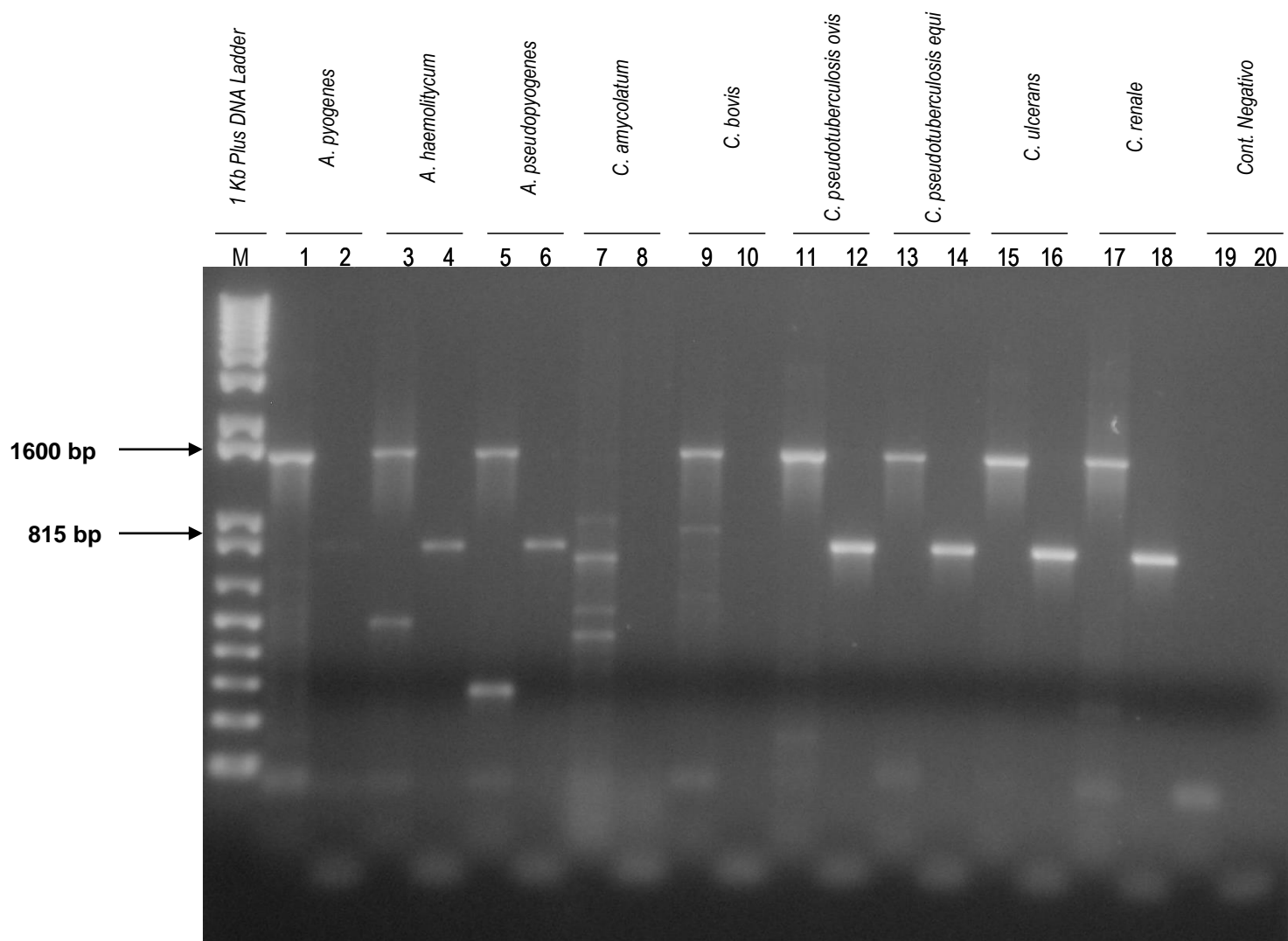
**FIGURA 7-** Resultado da amplificação de bandas das amostras de *C. pseudotuberculosis*. Linha 21 até linha 40, corresponde as respectivas amostras.



**FIGURA 8-** Resultado da amplificação de bandas das amostras de *C. pseudotuberculosis*. Linha 41 até linha 49, corresponde as respectivas amostras.



**FIGURA 9-** Resultado da amplificação de bandas das amostras controle de *C. pseudotuberculosis*. Linhagem T1, T2 e 1002 e os controles da reação que contém apenas o mix.



**FIGURA 10-** Resultado da amplificação de bandas das amostras correlacionadas com *C. pseudotuberculosis*.

## 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.

Em um estudo realizado com caprinos, o fracionamento eletroforético, seguido da avaliação da imunorreatividade 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).

Um dos antígenos usados em dois dos testes ELISAs propostos neste trabalho foi o TPP. Este antígeno foi desenvolvido por Paule e outros (2004), em um estudo com sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI, no qual o antígeno foi obtido através da separação em três fases com butanol e sulfato de amônio, demonstrou-se que caprinos naturalmente infectados reconheceram bandas de 16KDa,

20KDa, 27KDa, 30KDa, 36KDa, 40KDa, 43KDa, 58KDa, 64KDa, 68KDa e 125KDa. 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.

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 contra estas bactérias.

O estudo mais aprofundado das proteínas liberadas no meio, por *C. pseudotuberculosis*, permitirá uma melhor compreensão da patogenia deste microrganismo, e fornecerá material para ensaios sorológicos e estudos de vacinas.

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 análise da curva ROC pode ser utilizada para examinar o desempenho de um teste diagnóstico, como também para os possíveis valores de corte e comparar diferentes testes diagnósticos a fim de escolher o melhor (GREINER e outros 1995). Os pontos de corte dos quatro testes ELISA foram determinados com auxílio da curva ROC. Pontos de corte acima dos indicados implicariam em pouco aumento da especificidade com redução da sensibilidade. Estes pontos de corte foram definidos de forma a melhorar a especificidade em detrimento da sensibilidade uma vez que, em função da alta prevalência da linfadenite caseosa em nossa região, é mais interessante que haja uma maior probabilidade do teste ELISA ser negativo em animais sem a doença.

Greiner e outros (1995), relatam que o melhor ponto de corte está na situação em que a soma da sensibilidade e da especificidade alcance valores mais altos. Dercksen e outros (2000), referem que o ponto de corte deve ser selecionado com muito critério, devido a modificações na sensibilidade e especificidade, podendo variar na dependência do uso do teste, ou seja, se o teste será usado em um esquema de erradicação da doença entre animais realmente infectados ou em um esquema de controle em rebanhos de animais não infectados.

De acordo com o gráfico descrito pela curva ROC, quanto maior a área definida pela curva, melhor será o teste. Desta forma o ELISA indireto TPP se mostra melhor que os outros testes ELISA, seguido pelo ELISA indireto BHI, ELISA sanduíche BHI e sendo a menor área da curva delimitada pelo ELISA sanduíche TPP.

No teste ELISA indireto BHI e ELISA indireto TPP, de acordo com os pontos de corte definidos, a sensibilidade foi de 98% para o BHI e 100% para o TPP e a especificidade de 98% e 100% respectivamente. Os antígenos usados nestes testes

foram obtidos a partir da linhagem T1, atualmente utilizada como linhagem padrão pelo Laboratório de Imunologia (ICS-UFBA). Os resultados de sensibilidade e especificidade destes testes mostram-se próximos aos obtidos anteriormente por Carminati e outros (2003), em um estudo com caprinos, quando a sensibilidade foi de 93,5% e especificidade de 100%. No referido estudo foi utilizado como antígeno o sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis*, linhagem 1002, como antígeno. Neste mesmo estudo, dois soros, tendo a mesma origem geográfica dos animais positivos para a doença, sendo, porém, provenientes de animais apresentando abscessos dos quais foi isolado *Arcanobacterium pyogenes*, tiveram resultados negativo para este teste de ELISA.

Os resultados de sensibilidade e especificidade do ELISA indireto BHI foram de 98% e 98%, respectivamente, e a sensibilidade e especificidade do ELISA indireto TPP foram, ambas, de 100%. Os resultados obtidos por Sutherland e outros (1987) obtiveram a sensibilidade de 67% e a especificidade de 77%, em um estudo com ovelhas naturalmente infectadas e experimentalmente infectadas. Sting e outros (1998), desenvolveram teste ELISA indireto usando como antígeno o sobrenadante da cultura em caldo BHI. Estes autores mostraram uma sensibilidade de 73% e uma especificidade de 92%, em caprinos. Dercksen e outros (2000), desenvolveram um teste ELISA indireto com sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* e chegaram a uma sensibilidade de  $56\pm 6\%$  e especificidade foi de  $97\pm 1\%$ , em caprinos. Os nossos resultados de sensibilidade e especificidade foram superiores aos estudos relacionados e estão próximos aos obtidos por Kaba e outros (2001), cuja sensibilidade e especificidade foram de, 85% e 96%, respectivamente, também em caprinos.

A sensibilidade obtida neste estudo pelo teste ELISA sanduíche BHI foi 86% e pelo ELISA sanduíche TPP foi 74%. Já as especificidades foram de 84% e 72%, respectivamente. Estes resultados revelam que as sensibilidades dos dois testes ELISA estavam acima da sensibilidade obtida por Dercksen e outros (2000), em um teste ELISA tipo duplo “sanduíche”, onde foi usado soro de coelho imunizado com o sobrenadante da cultura em caldo BHI, para sensibilizar as placas. Estes autores relataram uma sensibilidade deste teste de  $72\pm 5\%$ . As especificidades dos nossos ELISAs sanduíche, no entanto, se encontram abaixo do valor encontrado por estes autores que foi de  $99\pm 1\%$ . Estes autores, ainda neste estudo, desenvolveram um teste ELISA sanduíche, tendo como antígeno a exotoxina, onde foi utilizado IgG1 de bovino conjugado com peroxidase. A sensibilidade deste teste foi de  $94\pm 3\%$  e a especificidade  $98\pm 1\%$ . Também neste trabalho os autores descrevem um teste ELISA indireto tendo como antígeno um preparado de parede celular, cuja sensibilidade foi de  $61\pm 3\%$  e especificidade de  $86\pm 3\%$ . Os autores citados lembram que são possíveis reações cruzadas com outros microrganismos, como outras espécies de *Corynebacterium*, *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* e *Listeria monocytogenes*.

Os valores preditivos são medidas relacionadas ao desempenho de um teste diagnóstico. O valor preditivo positivo define a probabilidade de existência da doença na presença de um teste positivo. O valor preditivo negativo define a probabilidade de ausência da doença na presença de um teste negativo (FERREIRA e ÁVILA, 1996, p.5).

Os valores preditivos positivos dos testes ELISA foram calculados, para os pontos de corte definidos, sendo de 98% para o ELISA indireto BHI, 100% para o ELISA indireto TPP, 86% para o ELISA sanduíche BHI e 73% para o ELISA sanduíche

TPP. Os valores preditivos negativos, para os pontos de corte definidos, foram calculados em 98% para o ELISA indireto BHI, 100% para o ELISA indireto TPP, 84% para o ELISA sanduíche BHI e 72% para o ELISA sanduíche TPP.

Apesar da sensibilidade e especificidade, nos experimentos realizados neste trabalho, não mostrarem uma maior diferença entre os testes ELISA indireto BHI e ELISA indireto TPP, é possível afirmar que o ELISA indireto TPP possui uma capacidade de discriminação entre animais infectados e não infectados maior. Esta maior capacidade de discriminação é demonstrada pelo fato do maior valor da DO dos soros dos animais não infectados (0,241), estar mais próximo ao menor valor de DO dos soros dos animais infectados (0,254) no ELISA indireto BHI, quando comparado ao ELISA indireto TPP. Neste ELISA, o maior valor de DO dos soros dos animais não infectados (0,300) é muito inferior ao menor valor de DO dos soros dos animais infectados (0,642). A relação média dos resultados positivos/ média dos resultados negativos foi de 4,2, para o ELISA indireto BHI e 7,1, para o ELISA indireto TPP. No caso dos ELISAs sanduíche, esta relação foi de 1,6 para o ELISA sanduíche BHI e 1,4 para o ELISA sanduíche TPP. Moura-Costa (2002), demonstrou que o ELISA indireto com sobrenadante de *C. pseudotuberculosis*, linhagem 1002, em caldo BHI teve esta relação média dos resultados positivos/ média dos resultados negativos de 3,8. Esta maior capacidade de distinção entre soros de animais infectados e não infectados no ELISA indireto TPP pode ser atribuída a uma maior concentração de proteínas específicas de *C. pseudotuberculosis*, permitida pela técnica de produção deste antígeno.

Jones e outros (2005), em uma revisão sobre identificação de microrganismos, através de ensaios de DNA, afirmam que é possível identificar espécies de *Bacillus*,

*Yersinia*, *Francisella*, *Brucella* e *Burkholderia*, tendo como base a seqüência do gene 16S rRNA.

Takahashi e outros (1997) realizaram um estudo sobre a relação filogenética entre *C. pseudotuberculosis* e outras espécies do gênero *Corynebacterium* e gêneros relacionados, através do gene 16S rRNA. Neste trabalho ficou demonstrado que *C. pseudotuberculosis* está filogeneticamente mais próximo de *Corynebacterium ulcerans* do que de *Corynebacterium diphtheriae*. Pascual e outros (1995), avaliando o gene 16S rRNA, através da PCR, utilizando um *primer* universal e comparando a seqüência com diferentes programas de computador, verificaram que *Corynebacterium diphtheriae* e *C. pseudotuberculosis* possuem um nível semelhança na seqüência do gene 16S rRNA de 97,8%, embora sejam espécies diferentes. Entre *Corynebacterium ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* demonstraram uma semelhança na seqüência do gene 16S rRNA de 99,7%.

Neste estudo, em todas as amostras isoladas e identificadas como *C. pseudotuberculosis*, foi possível amplificar duas bandas, uma de 1600 bp e outra de 815 bp. Os *primers* usados para amplificar a banda de 1600 bp foram os mesmos usados por Pascual e outros (1995), designados como pA e pH. O par de *primers* utilizado para amplificar a banda de 815 bp foi descrito por Çetinkaya e outros (2002), designados de CP1 e CP2 e, segundo estes autores, são específicos para o gene 16S rRNA de *C. pseudotuberculosis*. Estes autores estudaram a prevalência em 2046 ovinos e 2262 caprinos em abatedouros na Turquia, identificaram 89 ovinos suspeitos de linfadenite caseosa, dos quais isolou-se *C. pseudotuberculosis* em 71 amostras, destas, 69 amostras foram positivas através de PCR, usando-se os *primers* descritos pelo autor. Em 29 caprinos com suspeita de linfadenite caseosa, isolou-se *C.*

*pseudotuberculosis* em 25 amostras, das quais 24 foram positivas usando a técnica de PCR. Os mesmos *primers*, foram usados por Medrano e outros (2003), em um estudo de vacina em ratos. Neste experimento os autores obtiveram a amplificação de uma banda de 815 bp nas amostras de *C. pseudotuberculosis* isoladas de granulomas dos animais vacinados.

No presente trabalho ambos os *primers*, usados por Çetinkaya e outros (2002) amplificaram as linhagens isoladas e identificadas, através dos métodos convencionais, como *C. pseudotuberculosis*. Foi realizada ainda PCR de espécies correlacionadas, como *Arcanobacterium pyogenes*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Arcanobacterium pseudopyogenes*, *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* e *Corynebacterium pseudotuberculosis equi*. Observou-se que a banda de 1600 bp foi amplificada por todos estes microrganismos, enquanto a banda de 815 bp foi amplificada por todos, exceto *Corynebacterium amycolatum* e *Corynebacterium bovis*. De acordo com estes resultados, podemos afirmar que os *primers* CP1 e CP2 não são espécie-específicos

## 7.0- CONCLUSÕES

- A sensibilidade e especificidade do teste de ELISA indireto TPP foram, ambas, de 100%
- A sensibilidade e especificidade do teste de ELISA indireto BHI foram, de 98%
- O teste de ELISA sanduíche BHI apresentou uma sensibilidade de 86% e uma especificidade de 84%
- A especificidade e sensibilidade do teste de ELISA sanduíche TPP foram de 74% e 72%, respectivamente
- Constatou-se que o teste ELISA indireto TPP, possui uma capacidade de discriminação maior entre os animais com a doença e animais sem a doença, em relação aos demais testes.
- Através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, verificou-se que todas as amostras identificadas como *C. pseudotuberculosis* amplificaram a banda de 815 bp do gene 16S rRNA.
- Através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, demonstrou-se que amostras de bactérias filogeneticamente relacionadas, também amplificaram a banda de 815 bp, exceto *Corynebacterium amycolatum* e *Corynebacterium bovis*.

## 8.0- PERSPECTIVAS

- Avaliar possíveis reações cruzadas dos testes ELISA indiretos, usando soros de animais com outras patologias.
- Estudar as frações protéicas do antígeno TPP, analisando o potencial destas frações de induzirem uma resposta imunológica protetora.
- Estudar outros *primers* específicos para *C. pseudotuberculosis*.



## 9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Aust. Vet. J.**, n. 63, p. 269-272, 1986.

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.

BATEY, Y. M., TONGE, J. I. Human infection with *Corynebacterium ovis*. **The Medical Journal of Australia**, September, n. 28, p. 540-543. 1968.

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.

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

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., ZOMETA, 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.

CARMINATI, R., *et al.* Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Rev. Ci. Méd. Biol.* n.1 v.2 p. 88-93, 2003.

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.

ÇETINKAYA, B. *et al.* Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Vet. Microbiol.**, v. 88, p. 75-83, 2002.

CHAPLIN, P. J., *et al.* Targeting Improves the efficacy of a DNA Vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep. **Infect. Immun.**, n. 67 p. 6434-6438, 1999.

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.

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.

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, 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 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-ímenes**. Editora Guanabara-Koogan, p.1-6, 1996.

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

GREINER M., SOHR, D., GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **J. Immunological Methods**, n. 185, p. 123-132, 1995.

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.

HARLOW, E., LONE, D., **A Laboratory Manual**. Editora Cold Spring Harbor Laboratory. v. 1, p. 92- 115. 1988.

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.

JONES, W. S. *et al.*, DNA Assays for Detection, Identification, and individualization of Select Agent Microorganisms. **Croat. Med. J.** n 4, v. 46, p. 522-529, 2005.

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. 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.

KURIA, J. N. K., Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep- Correlation between the hemolysis inhibition Test and ELISA test. **Acta Vet. Scand.** n.1 v.30 p. 109-110.1989.

LAN, D. T. B., *et al.*, Role of Endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiol. Immunol.** n. 42 v.12, p. 863-870, 1998.

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.

LOPES, A. A., **Tópicos de Metodologia da Pesquisa.** 2000, 134p.

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 na 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.

MCNAMARA, P. J., CUEVAS, W. A., SONGER, J. G. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. **Gene**, n. 156, p. 13-118, 1995.

MEDRANO, G. G. et al., Evaluación de una vacuna contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ratones albinos. **Rev. Inv. Vet. Perú.** n. 1, v 14, p. 61-67. 2003.

MENZIES P. I., et al., Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Small Rumin. Res.**, n. 13, p. 193-198, 1994.

MERCHANT, I. A., PACKER, R. A. **Bacteriologia y Virologia Veterinarias**, Editora Acribia, Zaragoza- España , 3ª Edição Espanhola - 2ª 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.

MIKHAILOVICH, V. R., et al. Application of PCR for detection of toxigênic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. **Journal of Clinical Microbiology.** n.11, v. 33, p, 3061-3063. 1995.

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.

PASCUAL. C., et al., Phylogenetic Analysis of the Genus *Corynebacterium* Based on 16S rRNA Gene Sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.** , n. 45 v. 4 , p. 724-728, 1995.

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.

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.*, Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Vet. Microbiol.**, n. 29 p.123-134, 1991.

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.*, Cytokine 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.

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

SHEN, D.T., JEN, J. R., GORHAM, J. R. The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by the Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA). In: **Proceedings of the Third International Conference on Goat Production and Disease**. P. 445-448, 1982.

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.

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.

TAMBOURGI, V. D., *et al.*, Mechanism of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology**. n. 107, p. 93-101, 2002.

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.

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.

YANG, S., ROTHMAN, R., PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **Lancet Infect. Dis.** v.4, p. 337-348. 2004.

YOZWIAK, M. L., SONGER, J. G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. **Am. J. Vet. Res.** n. 54, p. 3392-3397, 1993.

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.