ALESSANDRA FIGUEIREDO DE CASTRO NASSAR

**Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto na
detecção de anticorpos anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis*
em ovinos (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758)**

São Paulo
2012

ALESSANDRA FIGUEIREDO DE CASTRO NASSAR

**Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto na
detecção de anticorpos anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis*
em ovinos (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dra. Lilian Gregory

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2566
FMVZ

Nassar, Alessandra Figueiredo de Castro

Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto na detecção de anticorpos anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758) / Alessandra Figueiredo de Castro Nassar. -- 2012.
92 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dra. Lilian Gregory.

1. *C. pseudotuberculosis*. 2. Ovino. 3. Cultivo microbiológico. 4. PCR. 5. ELISA.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto com proteína recombinante para a detecção de anticorpos anti-Corynebacterium pseudotuberculosis em ovinos", protocolado sob o nº 2208/2011, utilizando 202 (duzentos e dois) carneiros e ovelhas, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Lilian Gregory, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Development in indirect ELISA test with recombinant protein for detection the Corynebacterium pseudotuberculosis in sheeps", protocol number 2208/2011, utilizing 202 (two hundred and two) rams and ewes, under the responsibility Profa. Dra. Lilian Gregory, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NASSAR, Alessandra Figueiredo de Castro

Título: Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto na detecção de anticorpos anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

A minha família

Ao meu pai e minha mãe, que sempre me deram exemplos de dedicação, amor e trabalho além de me darem amor, incentivo e apoio para trilhar o caminho de bem.
Aos meus irmãos pelo amor, companheirismo, e principalmente amizade.

Ao meu marido Francis, e meus filhos Enzo e Pedro, pelo amor e carinho, vocês são minha vida e sem vocês não teria conseguido realizar esse sonho, AMO VOCÊS.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Lilian Gregory, pela orientação, competência, paciência e ensinamentos que enriqueceram minha vida profissional.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica, pela excelente convivência e ensinamentos transmitidos.

Aos colegas de pós-graduação, orientados pela Prof^a. Dr^a. Lilian Gregory: Laura, Enoch, Marjorie e Eduardo pela convivência, e Huber Rizzo pela ajuda na colheita.

Às queridas amigas e pesquisadoras do Instituto Biológico, Vanessa Castro, Simone Miyashiro e Cristina Dib, que sempre contribuíram para meu aprimoramento profissional e pelas boas horas de convívios e desabafos.

Às queridas Bernadete, Gabriela e Renata pela constante ajuda no laboratório na minha ausência, vocês são muito especiais.

À Rosa Maria Piatti pela grande colaboração no trabalho, tanto na parte experimental quanto na parte escrita, muito obrigada.

Ao colega Prof^a. Dr. Fábio Gregori pelos ensinamentos, auxílio na execução do trabalho e realização da análise estatística.

Ao meu orientador de mestrado Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, pela constante amizade e incentivo.

Aos colegas do Instituto Butantan, Ana Carolina e Dalton pelos ensinamentos e ajuda na parte de clonagem e expressão gênica.

As colegas pesquisadoras do Instituto Biológico, Maria do Carmo, Elenice, Eliana, Eliana Roxo, Maristela Cardoso, pelo excelente convívio e muitas risadas durante os cafés.

À Dra. Josete Garcia Bersano e toda a diretoria do Instituto Biológico pelo apoio e oportunidade para a realização do meu doutorado.

A todos os proprietários de criatórios ovinos do Estado de São Paulo que proporcionaram o desenvolvimento desse trabalho.

Ao médico veterinário Juraci de Souza Neto e a equipe do frigorífico pela colaboração na colheita das amostras.

Aos residentes e estagiários do Hospital de Ruminantes da FMVZ-USP dos anos de 2010 e 2011 pelos auxílios nas colheitas de amostras.

À equipe das bibliotecárias da FMVZ-USP por todo o auxílio prestado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho.

RESUMO

NASSAR, A. F. C. **Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto na detecção de anticorpos anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758).** [Development of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758)]. 2012. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A linfadenite caseosa é uma doença infectocontagiosa, de ocorrência mundial, que acomete caprinos e ovinos, caracterizada pela formação de abscessos em gânglios linfáticos superficiais, e alguns casos órgãos e linfonodos internos. É uma enfermidade causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsável por grandes perdas econômicas na caprinocultura e ovinocultura. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um teste sorológico sensível e específico para detectar anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis* em ovinos. Os animais foram classificados em dois grupos, com sintomatologia aparente para linfadenite caseosa (n=103) colhidos a campo, onde foram coletadas amostras de soro e punção de linfonodos aumentados; e animais sem sintomatologia aparente (n=50) dos quais as amostras de soro e fragmentos de pulmão e linfonodo mediastínico foram colhidos em frigorífico. Em ambas as amostras a confirmação da presença e ausência da doença foi realizada através das provas de cultivo microbiológico e PCR, considerados nesse estudo como padrão para classificação dos animais. O resultado do cultivo microbiológico dos animais com sintomatologia aparente foi 53,5% (55/103) identificadas como *C. pseudotuberculosis* através de provas bioquímicas, e com a utilização da PCR, 46,5% (48/103) das amostras foram positivas para *C. pseudotuberculosis*. Com relação aos animais sem sintomatologia aparente, todas as amostras foram negativas no cultivo microbiológico e PCR (0/50). Na padronização do ELISA indireto foram utilizados 42 soros positivos e 43 soros negativos confirmados no cultivo microbiológico e PCR para linfadenite caseosa. A média de absorbância foi 1,88 com desvio padrão de 0,43, para as amostras positivas e, para as amostras negativas a média de 0,71 e desvio padrão 0,18. Dessa forma foram consideradas positivas, as amostras que apresentaram na reação de ELISA valor da $DO > 1,1$ e negativas de $< 1,1$. A análise gráfica empregada no presente trabalho, curva ROC, permitiu encontrar o valor do ponto de corte associado à combinação dos parâmetros de

sensibilidade e especificidade, assim, a acurácia do teste pôde discriminar indivíduos doentes de não doentes. A utilização de técnicas sorológicas no diagnóstico da linfadenite caseosa permitirá o controle epidemiológico da doença, porém não substitui o cultivo microbiológico, técnica considerada padrão ouro, e pode ser utilizada como teste de triagem ou mesmo na comercialização de animais, visto que a doença muitas vezes é de caráter inaparente, o que inviabiliza o diagnóstico clínico e microbiológico.

Palavras-chave: *C. pseudotuberculosis*. Ovino. Cultivo microbiológico. PCR. ELISA.

ABSTRACT

NASSAR, A. F. C. **Development of indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758).** [Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto na detecção de anticorpos anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758)]. 2012. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Caseous lymphadenitis is an infectious disease of worldwide occurrence that affects sheep and goats, characterized by the formation of abscesses in superficial lymph nodes, and sometimes internal organs and lymph nodes. It is caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsible for great economic losses in goat and sheep production. This study aimed to develop a sensitive and specific serological test to detect anti-*C. pseudotuberculosis* in sheep. The animals were divided into two groups, the first one encompassing the ones with apparent caseous lymphadenitis symptoms (n = 103), where serum samples and puncture of enlarged lymph nodes were collected, and the second one with animals with no apparent symptoms (n = 50) of which samples (lung fragments, serum and mediastinal lymph nodes) were inspected and harvested in the slaughterhouse. In both groups the presence and absence of the disease was carried through the evidence of microbiological culture and PCR, considered as the standard for the groups classification. Microbiological culture results of animals with apparent symptoms was 53.5% (55/103) identified as *C. pseudotuberculosis* by biochemical tests, and allied to PCR, 46.5% (48/103) of the samples were positive for *C. pseudotuberculosis*. Regarding animals without apparent symptoms, all samples were negative in microbiological culture and PCR (0/50). For the standardization of indirect ELISA we used 42 positive sera and 43 negative sera confirmed by microbiological culture and PCR for caseous lymphadenitis. The mean absorbance was 1.88 with standard deviation of 0.43 for the positive samples, and for negative samples the average was 0.71 and standard deviation 0.18. Thus we considered as positive, the samples with DO value > 1.1 and negative <1.1. The graphical analysis employed in this study, ROC curve, allowed us to find the cutoff value allied to the association of sensitivity and specificity parameters, thus the test accuracy was able to discriminate sick from not sick individuals. The use of serological techniques for the diagnosis of caseous lymphadenitis will allow the

epidemiological control of the disease, but does not replace the microbiological culture, considered as the gold standard technique, and can be used as a screening test or animals trade, since the disease condition often is unapparent, which derails the clinical diagnosis and microbiological.

Key words: *C. pseudotuberculosis*. Sheep. Microbiological culture. PCR. ELISA.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Agentes bacterianos isolados das 103 amostras clínicas analisadas de animais com sintomatologia aparente de linfadenite caseosa – São Paulo – 2012	55
Gráfico 2 – Resultado das amostras positivas diluídas nas concentrações do soro 1:20 até 1:200 com relação a concentração ideal de antígeno (4 µg/mL), com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012.....	58
Gráfico 3 – Resultado das amostras negativas diluídas nas concentrações do soro 1:20 até 1:200 com relação a concentração ideal de antígeno (4 µg/mL), com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012.....	58
Gráfico 4 – Correlação dos resultados das amostras positivas e negativas frente diluição do antígeno (4 µg/mL) e as concentrações do soro 1:20 até 1:200, com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012.....	59
Gráfico 5 – Resultado do ELISA indireto para linfadenite caseosa das amostras de 85 soros, provenientes de ovinos analisados por meio da curva ROC – São Paulo – 2012	63
Gráfico 6 – Resultado do <i>dotplot</i> das amostras de 85 soros analisados pelo software – São Paulo – 2012	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado do cultivo microbiológico e PCR dos ovinos com sintomatologia aparente colhidos em criatórios do Estado de São Paulo e em dois municípios de Estado de Minas Gerais – São Paulo - 2012	51
Tabela 2 - Resultado do cultivo microbiológico e PCR das amostras de pulmão e linfonodo mediastínico provenientes de ovinos sem lesão aparente coletados em abatedouro localizado na cidade de Sorocaba – São Paulo – 2012	52
Tabela 3 - Frequência da raça e sexo dos ovinos com lesão aparente de linfadenite caseosa submetidos à colheita de material para análise diagnóstica – São Paulo – 2012	53
Tabela 4 – Frequência de linfonodos acometidos pela linfadenite caseosa nos ovinos com lesão aparente submetido ao exame clínico – São Paulo - 2012	53
Tabela 5 - Frequência da raça e sexo dos ovinos sem lesão aparente submetido à colheita de material para análise diagnóstica – São Paulo – 2012	54
Tabela 6 - Valores médios de densidades ópticas obtidas com o ensaio de ELISA indireto utilizando diluições de soro sanguíneo positivo ao cultivo microbiológico e a PCR frente a diversas diluições do antígeno, com leitura a 492 nm- São Paulo- 2012.....	57
Tabela 7 - Valores médios de densidades ópticas obtidas com o ensaio de ELISA indireto utilizando diluições de soro sanguíneo negativo ao cultivo microbiológico e a PCR frente a diversas diluições do antígeno, com leitura a 492 nm- São Paulo- 2012.....	57
Tabela 8 – Resultado do ELISA indireto para as 42 amostras positivas para linfadenite caseosa – São Paulo – 2012	60
Tabela 9 – Resultado do ELISA indireto para as 43 amostras negativas para linfadenite caseosa – São Paulo – 2012	61
Tabela 10 – Valores médios de densidade óptica (DO) dos diferentes controles obtidos com ensaio de ELISA indireto com antígeno proteico <i>C. pseudotuberculosis</i> , com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012	62
Tabela 11 Valores médios de absorbância da reação de ELISA na avaliação da repetibilidade de 4 amostras positivas e 4 amostras negativas para linfadenite caseosa, com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Assepsia e visualização do aumento de linfonodo cervical superficial	41
Figura 2 - Colheita da secreção mucopurulenta do linfonodo aumentado em seringa com agulha 40X12	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	22
1.1	ETIOLOGIA.....	24
1.2	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	25
1.2.1	Lipídeos de parede.....	25
1.2.2	Exotoxina.....	26
1.3	PATOGENIA E TRANSMISSÃO.....	27
1.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO <i>C. pseudotuberculosis</i>	29
1.5	SINTOMAS.....	30
1.6	OCORRÊNCIA DA LINFADENITE CASEOSA	32
1.7	DIAGNÓSTICO	33
1.8	TRATAMENTO.....	35
1.9	CONTROLE E PROFILAXIA.....	36
2	OBJETIVO.....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	ANIMAIS	40
3.1.1	Animais com sintomatologia aparente.....	40
3.1.2	Colheita de amostras	41
3.1.3	Animais sem sintomatologia aparente	42
3.1.3.1	Colheita de amostras.....	42
3.2	CULTIVO MICROBIOLÓGICO.....	43
3.3	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	43
3.4	ELISA	44
3.4.1	Preparação do antígeno <i>C. pseudotuberculosis</i>	44
3.4.2	Padronização do ELISA indireto	45
3.4.2.1	Condições do ELISA indireto.....	45

3.4.3	Controles da reação de ELISA	46
3.4.4	Leitura e Interpretação dos resultados.....	47
3.4.5	Determinação da diluição do anticorpo e antígeno	47
3.4.6	ELISA indireto.....	48
3.4.7	Estabelecimento do ponto de corte.....	48
3.4.8	Repetibilidade inter-reações de amostras de soros positivos e negativos no ELISA	48
4	RESULTADOS	50
4.1	CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS	50
4.1.1	Animais positivos	50
4.1.2	Animais negativos	50
4.2	FREQUÊNCIAS DAS CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS ESTUDADOS COM RELAÇÃO AO EXAME CLÍNICO	53
4.3	CULTIVO MICROBIOLÓGICO.....	54
4.3.1	Animais com sintomatologia aparente.....	54
4.3.2	Animais sem sintomatologia aparente	55
4.4	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	56
4.4.1	Animais com sintomatologia aparente.....	56
4.4.2	Animais sem sintomatologia aparente	56
4.5	ELISA INDIRETO	56
4.5.1	Quantificação proteica	56
4.5.2	Determinação da diluição de anticorpo e antígeno.....	57
4.5.3	Determinação da diluição de anticorpo e antígeno.....	59
4.5.4	Controle da reação de ELISA indireto.....	62
4.5.5	Estabelecimento do ponto de corte.....	62
4.5.6	Repetibilidade inter-reações de amostras de soros positivos e negativos no ELISA indireto	64
5	DISCUSSÃO	67

6	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	75
	Apêndice A - Ficha clínica utilizada no experimento	84
	Anexo A - Protocolo de preparo do tampão fosfato salina (PBS) realização do teste de ELISA	85
	Anexo B - Protocolo de preparo do tampão de sensibilização das placas de ELISA	86
	Anexo C - Protocolo de preparo do tampão de lavagem (<i>wash buffer</i>) das placas de ELISA	87
	Anexo D - Protocolo de preparo da solução bloqueadora para teste de ELISA	88
	Anexo E - Protocolo de preparo do tampão de diluição dos anticorpos (<i>dilute buffer</i>) do teste de ELISA	89
	Anexo F - Protocolo de preparo do tampão citrato-fosfato pH 5,0 do teste de ELISA	90
	Anexo G - Protocolo de preparo da solução reveladora – ortofenilenodiamina – OPD para teste de ELISA	91
	Anexo H - Protocolo de preparo da solução de parada (<i>stop solution</i>) para teste de ELISA	92

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A população de ovinos no Brasil está estimada em 16 milhões de cabeças, da quais 60% estão localizadas no Nordeste, 25% no Sul, 6,4% no Centro-Oeste, 4% no sudeste e 4,6% em outros Estados, segundo o Instituto FNP (FIRETTI; MOREIRA, 2007).

Com a expansão do agronegócio da caprinovinocultura, o Ministério da Agricultura e Abastecimento criou o Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO) com objetivo de controlar e erradicar as doenças de caprinos e ovinos, por meio de ações sanitárias e de vigilância epidemiológica, tendo com os principais ações: cadastro sanitário de estabelecimentos; controle de trânsito dos animais e certificação voluntária das propriedades (PNSCO, 2004). A linfadenite caseosa está presente em todo o mundo e possui impacto econômico alto em ovinos, desencadeando perda de peso e condenação da carcaça em casos de abscessos internos (LLOYD et al., 1990).

Esse crescimento no agronegócio de caprinos e ovinos no Brasil cria novas possibilidades comerciais e industriais, promovendo, assim, o desenvolvimento do País (ALVES et al., 2007).

A linfadenite caseosa é uma doença infectocontagiosa, de ocorrência mundial, que acomete caprinos e ovinos, caracterizada pela formação de abscessos em glândulas linfáticas superficiais, podendo também acometer órgãos e linfonodos internos. É uma enfermidade crônica e debilitante, causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsável por grandes perdas econômicas na caprinocultura e ovinocultura (BATEY et al., 1986; DORELLA et al., 2006; BAIRD; FONTAINE, 2007).

A linfadenite caseosa é prevalente em países como Europa, Austrália, América do Norte, América do Sul e África em propriedades com criação de pequenos ruminantes (PATON et al 2003). No Reino Unido, as perdas econômicas com a doença são muito grandes, principalmente em criações de ovinos, com condenação de lã e carne (BAIRD;

FONTAINE, 2007). No Brasil o primeiro relato da doença foi descrito por Moura Costa et al. (1973) no Estado da Bahia. Segundo Costa (2002), a região Nordeste apresenta a maior prevalência de casos de linfadenite caseosa nos rebanhos de ovinos e caprinos. Com a introdução do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO) há a necessidade de uma melhor avaliação do rebanho, já que a produção de ovinos deve ser fundamentada em sistemas de exploração que possam garantir melhores condições sanitárias para estes animais, através de medidas de biossegurança e de exames diagnósticos confiáveis e acessíveis.

O diagnóstico da doença é baseado na sintomatologia clínica como presença de abscessos externos, e a detecção do *C. pseudotuberculosis* no material purulento através da punção aspirativa dos linfonodos (DERCKSEN et al., 2000, DORELLA et al., 2006). Muitas vezes a confirmação do agente por testes bioquímicos são inconclusivos devido à grande variabilidade do agente; dessa forma o diagnóstico pela PCR através do uso de primers específicos pode simplificar a identificação das colônias, classificando o microrganismo em gênero e espécie, o que colabora no controle da disseminação de um determinado foco da doença em uma região (ÇETINKAYA et al., 2002).

A citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) foi descrita por Ribeiro et al. (1999) para detectar *C. pseudotuberculosis* na punção dos linfonodos. Essa técnica possibilita um diagnóstico presuntivo do agente, antes da abscedação do linfonodo, além de ser uma técnica de baixo custo e de fácil realização (RIBEIRO et al., 2001).

Hoje em dia têm sido utilizados inúmeros testes sorológicos, como teste de imunodifusão em gel (BURREL, 1980), *western-blotting* e ELISA (MENZIES et al., 1994). Vários testes para sorodiagnóstico baseados nos preparos crus de células totais mortas, extratos de parede ou toxóides do filtrado de cultivo têm pobre especificidade e frequentemente geram resultados falso-positivos (BROWN et al., 1987; MENZIES; MUCKLE, 1989).

O exame sorológico é importante principalmente para detectar lesões inaparentes, já que animais sem sintomatologia compõem uma potencial fonte de disseminação da infecção no rebanho (MUCKLE et al., 1992, KABA et al., 2001). Dessa forma o atual projeto tem por finalidade desenvolver um teste sorológico para detectar anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis* em ovinos, sensível e específico, já que no Brasil não existe nenhum teste sorológico desenvolvido para o diagnóstico de linfadenite caseosa nessa espécie animal.

1.1 ETIOLOGIA

O *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram positiva de formato coco-bacilar curto e irregular, medindo 0,5 a 0,6 µm por um a três µm, podendo apresentar aspecto cocóide, de clavas ou bacilos (morfologia corineforme) mostrando-se aos pares ou formando grupamentos irregulares em paliçada, decorrentes da grande quantidade de lipídeos na sua parede celular, particularmente o ácido corinomicólico. São imóveis, microaerófilos, mas toleram condições de aerofilia em meios de cultura, são fermentadores, não formadores de esporos (COSTA, 2002; QUINN et al., 2005). Pertencem ao gênero *Corynebacterium*, grupo dos Actinomicetos, juntamente com as bactérias do gênero *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arcanobacterium pyogenes* e *Rhodococcus*, visto que compartilham certas características de parede celular, incluindo espessura, presença de ácidos micólicos, ácidos graxos insaturados e saturados (DORELLA et al., 2006, KONEMAN et al., 2008).

A classificação fenotípica é caracterizada por produção de catalase, produção de uréase, redução de nitrato a nitrito, e fermentação de carboidratos, maltose, glicose e manose (sem fermentação de lactose), sem produção de gás. Não possuem atividade proteolítica, portanto são incapazes de hidrolisar gelatina e digerir a caseína (MUCKLE; GYLES, 1982; COSTA, 2002; QUINN et al., 2005).

O *C. pseudotuberculosis* cresce muito bem em ágar sangue de carneiro a 5%, incubado por 48 horas a 37°C, apresentando as seguintes características macroscópicas: colônias pequenas, brancas e opacas, rodeadas por delicado halo de hemólise (QUINN et al., 2005). O pH ideal de crescimento varia de 7,0 e 7,2 podendo crescer a uma variação de pH de 7,0 a 8,0 (BATEY, 1986).

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

O *C. pseudotuberculosis* apresenta importantes fatores de virulência: lipídeos de parede (ácidos micólicos) e a exotoxina (fosfolipase D).

1.2.1 Lipídeos de parede

Os lipídeos presentes na parede celular são semelhantes ao ácido micólico do *Mycobacterium tuberculosis*, apesar de não apresentar álcool-ácido resistência (COSTA, 2002). Segundo Jolly (1966), a presença dessa densa camada de lipídeos dificulta a fagocitose da bactéria, aumentando a sua virulência. Porém Batey et al. (1986) e Songer et al. (1990) relataram que esta substância está relacionada à citotoxicidade. Estudos em camundongos revelaram que esses lipídeos apresentam característica piogênica e por este motivo são responsáveis por formação de granulomas no sítio da lesão (BURREL, 1978; WILLIANSO, 2001). Outro fator relacionado ao lipídeo é a característica de sobrevivência por longos períodos no ambiente, mesmo sob condições adversas de exposição à luz solar direta ou dessecação (QUINN et al., 2005). A bactéria pode-se manter viável por 55 dias em objetos inanimados contaminados por pus, ou até oito meses em ampla variação das condições de temperatura e umidade (BROWN; ORLANDER, 1987).

1.2.2 Exotoxina

A exotoxina glicoproteica ou citoxina presente no *C. pseudotuberculosis* é a fosfolipase D, capaz de hidrolisar a esfingomielina, um componente importante de membrana citoplasmática, em colina e fosfato de ceramida, enfraquecendo as membranas celulares e favorecendo a infecção pelo microrganismo (PEPIN et al., 1989; BAIRD; FONTAINE, 2007).

Baird e Fontaine (2007) descreveram que a fosfolipase D atua sobre o endotélio vascular, aumentando a permeabilidade e contribuindo para a disseminação do patógeno do local da infecção primária para os linfonodos, determinando necrose dérmica, agregação plaquetária e, em casos graves, falência renal.

A esta exotoxina são atribuídas numerosas atividades biológicas, dentre elas, lise de eritrócitos ovinos e bovinos em meios de cultura; formação de necrose após injeção intradérmica em camundongos. O efeito hemolítico da fosfolipase D promove o sinergismo com a fosfolipase C do *Rhodococcus equi*, possibilitando a confirmação diagnóstica destes microrganismos pelo método clássico do CMP-test, (MUCLKE; GYLES, 1983; COSTA, 2002; QUINN et al., 2005).

O gene fosfolipase D é atualmente muito estudado, pois já foi clonado e expresso em *Escherichia coli* e sabe-se que essa proteína possui peso molecular de aproximadamente 31,5kDa (Kilodáton) com a presença de uma única cópia no genoma do microrganismo (HODGSON et al., 1990; SONGER et al., 1990).

1.3 PATOGENIA E TRANSMISSÃO

O *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo, capaz de sobreviver e de se multiplicar em fagócitos. A patogenia da doença ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que a virulência da bactéria está ligada aos lipídeos de parede e a exotoxina (fosfolipase D), já discutidos no tópico anterior, que são responsáveis pela sobrevivência e multiplicação dentro do hospedeiro (BROWN; ORLANDER, 1987; QUINN et al., 2005).

A infecção em pequenos ruminantes se dá principalmente por formações de abscessos em linfonodos superficiais, que podem drenar naturalmente, e por solução de continuidade levar a formação de abscessos cutâneos, caracterizando a forma cutânea da doença. Esses abscessos são geralmente fibrosos, encapsulados e com grande quantidade de microrganismos viáveis no conteúdo interno, que ao se romperem podem liberar uma carga bacteriana de 1×10^6 a 5×10^7 UFC/g. Esse rompimento pode contaminar o ambiente e também outros animais, sendo dessa forma uma importante via de transmissão da doença (BROWN; ORLANDER, 1987).

Outro tipo de infecção se dá pela forma visceral, com formação de abscessos internos, ou seja, acometimento de órgãos, principalmente linfonodos mediastínicos e pulmões. Mas pode ocorrer a formação de abscessos em glândula mamária, rim, fígado, coração, cérebro e medula espinhal. Nesses casos, a principal via de transmissão para o rebanho será a via respiratória (FONTAINE et al., 2006).

A partir da lesão inicial ou da porta de entrada, que pode ser por via oral, respiratória ou por contaminação de feridas, a bactéria é ativamente fagocitada por neutrófilos e macrófagos, onde o microrganismo se mantém viável no interior da célula e é sequestrado para os linfonodos regionais, nos quais induz a formação de múltiplos piogranulomas (PUGH, 2005). A disseminação do microrganismo no animal depende da exotoxina liberada com propriedade hemolítica e vasodilatadora, da virulência bacteriana e da higidez do animal

(JOLLY, 1966; BURREL, 1981). Na forma visceral a bactéria atinge a circulação linfo-hematógena e atinge outros órgãos alvos, incluindo pulmão, fígado, rim e encéfalo, desencadeando a forma grave da doença (MCKEAN et al., 2007).

Fontaine et al. (2006) realizaram infecção experimental em ovinos com *C. pseudotuberculosis* por via subcutânea, e verificaram a formação de múltiplos abscessos no local da aplicação bem como de abscessos em pulmão e linfonodo mediastínico. Já em casos naturais da infecção, os autores verificaram que a distribuição de lesões pulmonares é bem maior do que em outros órgãos, essa teoria pode ser explicada pela disseminação da bactéria via hematógena ou linfática através da inalação do agente. (NAIRN; ROBERTSON, 1974).

A inoculação experimental em camundongos demonstrou que independente da localização da bactéria, a disseminação ocorre por todo organismo, com predominância nos órgãos do sistema mononuclear fagocitário (linfonodos e baço) além de rim, fígado, pulmões e intestino (BAIRD; FONTAINE, 2007).

Os animais doentes constituem a fonte de infecção, sendo que a via de eliminação está frequentemente relacionada à eliminação do *C. pseudotuberculosis* pelo material purulento de linfonodos abscedados ou descargas oro-nasais de animais com pneumonia. Paralelamente, a contaminação do ambiente, água e alimentos com o material purulento de linfonodos pode levar a formação de aerossóis, ou promover a transmissão via oro-nasal por soluções de continuidade da pele, em especial causada por lesões perfurantes do tecido subcutâneo (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

As principais formas de transmissão da doença nas propriedades são pela introdução de animais infectados e equipamentos contaminados (tatuadores, brincadores e tosquiadores) (ALVES; PINHEIRO, 2000). Deve-se levar em conta também o número de animais nas propriedades, tipo de vegetação, pois plantas cactáceas causam ferimentos na pele dos ovinos e caprinos, sendo de grande relevância na transmissão e disseminação da doença (WALKER, 1994; BAIRD; FONTAINE, 2007).

Em países com criação de animais lanados, a tosquia é considerada um fator importante de transmissão e disseminação da linfadenite caseosa no rebanho, portanto deve-se sempre realizar uma desinfecção prévia para evitar a contaminação entre os animais (PATON et al., 1988).

Outra forma comum da introdução da linfadenite caseosa no rebanho é por aquisição de animais assintomáticos provenientes de rebanhos infectados decorrentes de compras, empréstimo, trocas ou retornos de animais de exposições feiras e outros concursos (SCHREUDER et al., 1994). Desta maneira, é necessária a orientação técnica no sentido de adquirir animais em bom estado sanitário (ALVES et al., 2007).

1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO *C. pseudotuberculosis*

O principal mecanismo de defesa do sistema imune específico do hospedeiro compreende a imunidade humoral e a imunidade celular; mediadas por respostas de tipos distintos de linfócitos. As células responsáveis pela resposta humoral são os linfócitos B (LB), que respondem aos antígenos estranhos, pelo desenvolvimento de anticorpos, enquanto que os mediadores da imunidade celular são os linfócitos T (LT) (ALVES et al., 2007).

A resposta imune do hospedeiro promovida contra *C. pseudotuberculosis* é complexa e envolve tanto a resposta mediada por células, quanto a resposta humoral (ELLIS et al., 1990; MUCKLE et al., 1992).

Estudo realizado por Muckle et al. (1992), revelaram que a presença de anticorpos em soros de animais infectados naturalmente com *C. pseudotuberculosis*, reagiram com várias frações proteicas em *western-blot*, quando foram utilizados antígenos de parede celular, células inteiras mortas e sobrenadantes de cultura de *C. pseudotuberculosis*. Entretanto, segundo Vale et al. (2003), esta forte resposta humoral por si só não é capaz de eliminar a infecção.

Solanet et al. (2011) realizaram estudo com grupos de animais vacinados, e grupos de animais vacinados e desafiados com *C. pseudotuberculosis*, e quinzenalmente foi realizada a sorologia através da utilização de ELISA indireto e *Western-blotting*, a produção da resposta imune ocorreu após a segunda e terceira semana pós-inoculação em ambos os grupos. O grupo dos animais que foi vacinado e desafiado, houve também o aparecimento dos sintomas clínicos, com aumento dos linfonodos superficiais, principalmente o poplíteo. Verificou-se também que os anticorpos foram detectados pela técnica de ELISA por um período de seis meses, em ambos os grupos. Concluindo dessa forma, que o ELISA indireto pode ser utilizado como ferramenta no diagnóstico sorológico, visto que há uma grande produção de anticorpos.

Chirino-Zárraga et al. (2009) sugerem que animais com menos de 6 meses não apresentem títulos de anticorpos detectáveis em técnicas sorológicas, como ELISA indireto, devido a característica da doença ser crônica e por uma débil resposta imune na infecção por *C. pseudotuberculosis*. Seyffert et al. (2010) em estudo sorológico com cabras infectadas com *C. pseudotuberculosis*, a taxa de positividade para animais menores de 6 meses foi baixa, em relação aos animais com idade entre um e dois anos.

1.5 SINTOMAS

A linfadenite caseosa que acomete principalmente ovinos e caprinos é popularmente conhecida como “mal do caroço”, “furúnculo ovino” ou “síndrome da ovelha magra” (RIBEIRO et al., 2001).

Os sintomas se manifestam no animal acometido de duas formas: superficial e visceral, dependendo do local e da extensão das lesões (SMITH; SHERMAN, 1994). Comumente são afetados os linfonodos parotídeo, mandibular, retrofaríngeo, cervical superficial, sub-ilíaco, poplíteo, mamário, porém a doença pode ocorrer em órgãos internos,

com formação de abscessos internos em pulmões e linfonodos mediastínicos e em alguns casos pode levar a quadros de pneumonia crônica, linfadenite mesentérica e pielonefrite (BROWN et al., 1987; RADOSTITIS et al., 1994; O'REILLY et al., 2008).

Os linfonodos acometidos geralmente apresentam aumento de volume, que possivelmente drenam material com grande quantidade de pus de coloração branca ou esverdeada, com consistência pastosa, contendo muitos microrganismos viáveis (COSTA, 2002; MCKEAN et al., 2007).

Em ovinos, estes abscessos inicialmente contêm material verde claro que se transforma em massa calcificada. Em geral, os nódulos cutâneos podem se apresentar em forma de cadeia ou como lesão isolada. Nos casos de abscessos viscerais, pode-se constatar perda de peso crônica, fato mais comum em ovinos. Também pode ocorrer infertilidade, diminuição da produção de leite, nascimento de menor número de crias, baixo peso dos cordeiros a desmama, baixo desenvolvimento e menor produção de lã. O microrganismo pode alcançar o sistema nervoso central ou os linfonodos inguinais e a glândula mamária, resultando conseqüentemente, em sintomas neurológicos e mastites (WILLIAMSON, 2001; PUGH, 2005).

A doença apresenta um período de incubação longo para aparição dos abscessos do *C. pseudotuberculosis*, que pode variar entre 25 e 147 dias ou mais, fazendo com que a enfermidade seja notada em animais mais velhos (QUINN et al., 2005). A introdução de animal infectado ao rebanho leva ao aparecimento de abscessos nos animais no período de dois a três anos. Uma vez introduzida a doença no rebanho mais difícil torna-se sua erradicação (AYERS, 1977).

1.6 OCORRÊNCIA DA LINFADENITE CASEOSA

A linfadenite caseosa é uma doença de importância mundial, em decorrência da alta prevalência e pelos grandes prejuízos econômicos nas criações de ovinos e caprinos (BAIRD; FONTAINE, 2007; BINNS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2001). Animais com linfadenite caseosa apresentam redução na produção de carne e leite, depreciação da lã, retardo no crescimento dos animais, deficiências nos índices reprodutivos do rebanho, condenação de carcaças, descarte e morte precoce dos animais (VALE, et al., 2003; BAIRD; FONTAINE, 2007).

A doença é considerada prevalente em países como, Austrália, Grã-Bretanha, Noruega, Holanda, Nova Zelândia, Estados Unidos, Argentina, Brasil, Egito, Índia, Turquia, Sudão, França e Canadá (ROBINS, 1991; PATON et al., 2003; DORELLA et al., 2006).

Muitos estudos têm sido realizados para estabelecer a incidência e a prevalência da linfadenite caseosa nos rebanhos mundiais, com intuito de avaliar a sua distribuição, e as perdas relacionadas à enfermidade na exploração econômica destas espécies. Entretanto, algumas dificuldades enfrentadas na realização desse estudo, como a forma inaparente da doença e seu longo período de incubação, fazem com que esses dados sejam escassos (ALVES et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009).

Paton et al. (2003) estimaram a prevalência de linfadenite caseosa em 223 rebanhos ovinos localizados no Oeste da Austrália, Nova Gales do Sul e Vitória e a prevalência média encontrada foi de 20% para Oeste da Austrália, 26% em Vitória e 29% em Nova Gales do Sul.

No Canadá foi realizado estudo em abatedouros para estimar a prevalência das doenças que acometem os caprinos e ovinos, entre elas, linfadenite caseosa. A prevalência estimada foi de 21% (ARSENAULT et al., 2003).

Moura e Costa et al. (1973), estudaram a distribuição geográfica da linfadenite caseosa nos rebanhos caprinos no Estado da Bahia e relataram que a doença concentrava-se no Norte do Estado. No Estado de Pernambuco, foi realizado inquérito sorológico em caprinos e que revelou 24% a 50% dos animais infectados (RIET-CORREA et al., 2000).

Daniel et al. (2009) encontraram uma positividade de 59,8% em amostras clínicas colhidas em abatedouro e em propriedades de ovinos com suspeita de linfadenite caseosa no Estado de São Paulo.

Meyer et al. (2005) realizou estudo sorológico na Bahia e detectou 46,6% de anticorpos séricos contra *C. pseudotuberculosis* em caprinos.

Guimarães et al. (2009) realizaram estudo de soroprevalência em 97 propriedades, totalizando 642 amostras de soros ovinos, localizadas no Estado de Minas Gerais, e encontraram 75,8% de soro positividade. Já Seyffert et al. (2010) realizaram o mesmo estudo e na mesma região e encontraram 78,9%, confirmando a alta prevalência da doença no Estado de Minas Gerais.

1.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da linfadenite caseosa é fundamentado no diagnóstico clínico, no qual se visualiza a presença de abscessos nos linfonodos superficiais dos animais. Deve-se ainda realizar o exame laboratorial, isolamento e identificação bacteriana, considerados padrão ouro, a partir do material caseoso drenado dos abscessos, e dos órgãos (ALVES et al., 2007; BAIRD; FONTAINE, 2007). O diagnóstico bacteriológico é um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico *in vivo*, pois permite distinguir *C. pseudotuberculosis* de outros microrganismos que produzem lesões abscedativas, como *Arcanobacterium pyogenes* e a *Pasteurella multocida* (DERCKSEN et al., 2000, WILLIANSO, 2001; DORELLA et al., 2006).

A análise microbiológica inclui o cultivo do conteúdo de abscesso que são semeados em meio contendo ágar sangue de carneiro a 5%, incubados por 48 horas a temperatura de 37°C. Após esse período é realizada a observação das colônias para posterior realização do Gram e identificação bioquímica para confirmação do gênero e espécie (KONEMAN et al., 2008). As provas bioquímicas mais utilizadas são: fermentação dos carboidratos, sem produção de gás como: maltose, manose, glicose, sem fermentar lactose, prova da catalase, urease, hidrólise de gelatina e redução de nitrato (MUCKLE; GYLES, 1982; QUINN et al., 2005). Songer et al. (1988) esclarecem que as diferenças entre os resultados de algumas provas bioquímicas, principalmente na fermentação dos carboidratos, podem ocorrer, em virtude dos diferentes métodos usados por diversos autores. Sugerem ainda que estas diferenças podem ser atribuídas à existência de variedades entre linhagens estudadas. ÇETINKAYA et al. (2002) reportaram que devido a essa variabilidade nos resultados do cultivo microbiológico, o diagnóstico pela PCR através do uso de primers específicos pode simplificar a identificação das colônias, classificando o microrganismo em gênero e espécie, o que colabora no controle da disseminação de um determinado foco da doença em uma região.

Alternativamente são utilizadas técnicas de diagnóstico da linfadenite caseosa, que incluem a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) e métodos sorológicos (BURREL, 1980; MENZIES et al., 1994; RIBEIRO et al., 2001).

A citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) foi descrita por Ribeiro et al. (1999) para uso em casos de mastite em bovinos na identificação do agente *Prototheca zopfii*, dessa forma os mesmos autores adaptaram a técnica para detectar *C. pseudotuberculosis* na punção dos linfonodos. Essa técnica possibilita um diagnóstico presuntivo do agente, antes da abscedação do linfonodo, além de ser uma técnica de baixo custo e de fácil realização (RIBEIRO et al., 2001).

Hoje em dia têm sido utilizados inúmeros testes sorológicos, como teste de imunodifusão em gel (BURREL, 1980), inibição sinérgica da hemólise (BROWN et al.,

1987), microaglutinação (MENZIES; MUCKLE, 1989), *western-blotting* (TER LAAK et al., 1992; PAULE et al., 2004), fixação do complemento (SHIGIDI et al., 1979) e vários ELISA (MENZIES et al., 1994; DERCKSEN et al., 2000). Vários testes para sorodiagnóstico baseados nos preparos crus de células totais mortas, extratos de parede ou toxóides do filtrado de cultivo têm pobre especificidade e frequentemente geram resultados falso-positivos (BROWN et al., 1987; MENZIES; MUCKLE, 1989).

O exame sorológico é importante principalmente para detectar lesões inaparentes, já que animais sem sintomatologia compõem uma potencial fonte de disseminação da infecção no rebanho (MUCKLE et al., 1992; KABA, et al., 2001).

1.8 TRATAMENTO

Existem atualmente muitos antimicrobianos que são eficazes em tratamento *in vitro* para *C. pseudotuberculosis* utilizados na medicina veterinária, pertencentes aos grupos do beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluorquinolonas, macrolídeos, tetraciclina e rifampicina (COSTA, 2002; QUINN et al., 2005). Entretanto, em tratamento *in vivo* o microrganismo é refratário, devido provavelmente a espessa cápsula de tecido conectivo que reveste os abscessos típicos e o denso conteúdo caseoso presente no interior dos piogranulomas, dificultando a ação dos antimicrobianos, além da viabilidade do microrganismo no interior das células (RADOSTITS et al., 1994; BAIRD; FONTAINE, 2007).

A extirpação cirúrgica dos abscessos ou linfonodos externos é sugerida como parte do tratamento em animais de grande valor zootécnico (VALE et al., 2003). Outra aplicabilidade é a lancetagem dos nódulos, com limpeza diária com tintura de iodo a 2%, aliado ao tratamento parenteral com antimicrobianos por no mínimo oito semanas

(WILLIAMSON, 2001; BAIRD, 2006). No entanto, essas práticas retiram o órgão de defesa regional, predispondo à disseminação linfática e infecção de outros órgãos (PUGH, 2005).

1.9 CONTROLE E PROFILAXIA

A identificação dos animais infectados e sua remoção do rebanho são métodos mais eficientes de controle da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes (BINNS et al., 2002).

Pelo fato do microrganismo sobreviver e persistir no meio ambiente por um longo período, a conscientização em relação às práticas de manejo adotadas é fundamental para o controle eficaz desta enfermidade (WILLIAMS, 1980). Essas práticas incluem limpeza e desinfecção das baias e estábulos bem como dos comedouros e bebedouros; dos equipamentos utilizados no manejo dos animais (agulhas, material cirúrgico, alicates e tatuadores) com utilização de desinfetantes comuns, como: amônia quartenária ou hipoclorito de sódio (RADOSTISTS et al., 1994; WILLIAMSON, 2001).

Com relação à tosquia, os animais mais jovens devem ser tosquiados em primeiro lugar e qualquer ovino com lesão palpável, devem ser tosquiados posteriormente. Após a tosquia deve-se evitar o contato íntimo dos animais (RAWASHEDEH; QUDAH, 2000; BAIRD; FONTAINE, 2007).

O estábulo não deve conter objetos que possam provocar lesões cutâneas nos animais, assim como deve ser realizado um controle de parasitos externos, com intuito de controlar o prurido (RADOSTISTS et al., 1994; PATON et al., 1995).

A cuidadosa seleção na aquisição de novos animais para o plantel, a realização de quarentenário, desinfecção das instalações e equipamentos são medidas importantes na profilaxia da doença em ovinos e caprinos (BINNS et al., 2007).

A vacinação, aliada ao teste sorológico, abate e segregação dos animais doentes, são medidas de controle eficazes, no primeiro momento e dispendiosa, mas é necessária para a completa erradicação da linfadenite caseosa (FONTAINE; BAIRD, 2008).

2 OBJETIVO

- Comparar o resultado da identificação presuntiva do cultivo microbiológico com a reação em cadeia pela polimerase com primers descritos por Çentinkaya et al. (2002) que amplificam a região 16Sr RNA.

- Padronizar um protocolo de ELISA indireto para detecção de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* em ovinos utilizando-se o antígeno bacteriano, e desenvolver tecnologia (teste ELISA) capaz de contribuir com controle epidemiológico e clínico da linfadenite caseosa no rebanho nacional.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Geral, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, do Instituto Biológico.

As amostras clínicas foram colhidas em frigorífico localizado na região de Sorocaba, SP e em propriedades de criação ovina localizadas nos Estados de São Paulo e de Minas Gerais.

3.1 ANIMAIS

Os ovinos foram divididos em 2 grupos: animais com sintomatologia aparente e animais sem sintomatologia aparente para linfadenite caseosa.

3.1.1 Animais com sintomatologia aparente

Foram coletados 103 soros e punções de linfonodos superficiais de animais com sintomatologia aparente da linfadenite caseosa em criatórios do Estado de São Paulo e em dois municípios do Estado de Minas Gerais. As colheitas foram realizadas em 20 propriedades localizadas nos municípios de: Atibaia, Pedra Bela, Piedade, Piracaia, Bragança Paulista, Sorocaba, Jacareí, Noeli e Perdizes estes dois últimos localizados no Estado de Minas Gerais. Os animais foram examinados individualmente através do exame clínico geral e específico dos linfonodos de acordo com critérios recomendados por Pugh (2005) e as observações foram registradas em fichas clínicas (Apêndice A).

3.1.2 Colheita de amostras

A colheita de amostras de sangue para obtenção do soro foi efetuada por venopunção jugular com agulhas descartáveis em frascos de vidro estéreis, transparentes sem anticoagulante, de forma asséptica e transportada sob refrigeração. As amostras foram centrifugadas e retiradas o soro sanguíneo e armazenados em freezer, com acondicionamento em alíquotas, para posterior análise no ELISA para diagnóstico de linfadenite caseosa.

As punções de linfonodos foram realizadas com assepsia prévia com álcool-iodado a 70%, e posteriormente com uma seringa com agulha 40X12 foram realizadas as colheitas do material caseoso dentro do linfonodo com aumento de volume (Figura 1 e 2). As seringas foram identificadas e transportadas sob refrigeração até o laboratório. No momento da chegada as amostras foram transferidas para o caldo Brain heart infusion (BHI) para manutenção da viabilidade e crescimento da bactéria e incubados em estufa a 37°C por 18 horas para posterior realização do cultivo microbiológico.

Figura 1 - Assepsia e visualização do aumento de linfonodo cervical superficial

Figura 2 - Colheita da secreção mucopurulenta do linfonodo aumentado em seringa com agulha 40X12

3.1.3 Animais sem sintomatologia aparente

Foram coletados soros e fragmentos de pulmão e linfonodo mediastínico de todos os 50 animais abatidos em frigorífico localizado na região de Sorocaba-SP.

3.1.3.1 Colheita de amostras

A colheita do sangue foi realizada após a sensibilização dos animais com choque e corte da veia jugular. Nesse momento introduzimos o frasco de vidro estéril sem anticoagulante para a colheita do sangue. Os tubos foram identificados em sequência numérica juntamente com os animais para a colheita de órgãos posteriormente. O acompanhamento da linha de abate e inspeção foi realizada para a colheita de fragmento de pulmão e linfonodo mediastínico de todos os animais. O sangue e os fragmentos de órgãos foram transportados sob refrigeração. Os soros foram armazenados em freezer, com acondicionamento em alíquotas, para posterior análise no ELISA para diagnóstico de linfadenite caseosa, enquanto que os órgãos foram processados para o cultivo microbiológico como descrito no item 3.2.

3.2 CULTIVO MICROBIOLÓGICO

O material aspirado dos linfonodos e os órgãos coletados em abatedouro foram suspensos em solução salina 0,85% estéril e 10 µL da suspensão foram semeados em ágar sangue de carneiro 5%, incubados por 48 horas a 37°C. Após o período de incubação havendo proliferação bacteriana neste meio, foram observadas as características morfológicas das colônias como tamanho, forma, coloração, presença e tipo de hemólise. A seguir, foi realizada a bacterioscopia, corando-se pelo método de Gram esfregaços das diferentes colônias, onde ao microscópio foram observadas a morfologia, a disposição das células e as características tintoriais ao Gram, uma vez que bactérias Gram positivas pleomórficas pequenas, que aparecem em formas cocoídes, de clava ou bacilos- morfologia coriniforme (BIER, 1978). As espécies bacterianas foram identificadas de acordo com Quinn et al. (2005) e Koneman et al. (2008) através das provas de catalase, urease, hidrólise de gelatina e redução de nitrato.

3.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

As suspensões dos linfonodos colhidos a campo e os órgãos (pulmão e linfonodo mediastínico) foram diluídas na proporção de 1:5 (peso/volume) em solução salina 0,85% estéril foram processadas para extração de DNA com isotiocianato de guanidina utilizando o reagente comercial DNazol (Invitrogen ®) cujo protocolo foi adaptado de Chomczynski (1993).

Para a técnica de PCR foram utilizados primers descritos por Çetinkaya et al. (2002), que amplificam fragmento de 815 pb da região 16S rDNA do *C. pseudotuberculosis*.

COR1 5' ACC GCA CTT TAG TGT GTG TG 3'

COR2 5'TCT CTA CGC CGA TCT TGT TAT 3'

A amplificação das amostras foi realizada com a utilização de 10 µL de DNA acrescido de 40 µL da mistura de reagentes da PCR contendo 1,25 U taq DNA polimerase,

200 μ M de cada desoxinucleotídeo, tampão (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM KCl); 2 mM $MgCl_2$ e 25 pmol de cada primer.

Nessas condições foi empregado ciclo de temperaturas de amplificação: desnaturação inicial 95°C por 4 min., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min., hibridização 56°C por 1 min., e extensão a 72°C por 1 min., com uma extensão final de 72°C por 10 min.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% acrescido de brometo de etídio a 0,5 μ g/mL. A visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de fotodocumentação (Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

3.4 ELISA

A metodologia empregada para o teste de ELISA indireto são descritos nos tópicos abaixo:

3.4.1 Preparação do antígeno *C. pseudotuberculosis*

Uma estirpe de *C. pseudotuberculosis* isolada e confirmada por identificação bioquímica e PCR através dos primers descritos por Çentikaya, et al. 2002, foi semeada em placa de Petri contendo ágar sangue de carneiro 5% e incubada a 37°C por 72 horas. Após esse período foi realizado a bacterioscopia para confirmação da característica coriniforme, e as colônias foram transferidas com auxílio da alça bacteriológica para caldo BHI (*brain heart infusion*) por 48 horas a 37°C para crescimento e turvação do meio. Após esse período a suspensão bacteriana foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos e o sedimento ressuspense em 10 mL de PBS (Anexo A). Após a realização de 2 lavagens com PBS, foi ressuspense em 2mL de do mesmo tampão. As células bacterianas foram rompidas por ultrassom (T7-Thornitron) por 12 minutos a uma frequência de 60hz. A massa obtida foi centrifugada a

2000 rpm por 10 minutos e a concentração proteica contida no sobrenadante foi verificada utilizando-se o método colorimétrico Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce[®]) de acordo com as indicações do protocolo sugerido pelo fabricante.

O antígeno foi distribuído em microtubos no volume de 1,5mL e armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.4.2 Padronização do ELISA indireto

Para a reação de ELISA indireto foi utilizado microplacas de poliestireno de fundo chato (marca Costar) com 96 orifícios. As diluições de antígeno e soro foram feitas em titulação em blocos desses imunorreagentes.

A fase inicial de padronização foram utilizadas 10 placas, com 6 amostras positivas e 6 amostras negativas de acordo com os resultados obtidos no cultivo microbiológico e PCR das amostras. Testaram-se 4 diferentes concentrações de antígeno (2µg/mL, 4µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL) frente a 6 diluições dos soros (1:20, 1:50, 1:100 e 1:200). A concentração de conjugado empregado foi de 1: 400 como recomendado pelo fabricante (KPL[®] - 04-23-02).

3.4.2.1 Condições do ELISA indireto

As microplacas foram sensibilizadas com 100 µL da solução do antígeno de *C. pseudotuberculosis* nas concentrações 2,5µg/mL, 4µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6 (Anexo B) em incubação por 18 horas em temperatura de 4°C.

Após esse período foram realizados 3 lavagens com o tampão de lavagem (*wash-buffer* - Anexo C) para remoção do antígeno que eventualmente não tenham sido adsorvidos na placa.

O bloqueio foi realizado com solução bloqueadora (Anexo D) por 1 hora a 37°C. Após esse período foram realizadas 3 lavagens com solução de lavagem para retirada das proteínas que eventualmente não tenham sido adsorvidas à placa.

Foram adicionados 100 µl de soros testes diluídos em duplicatas na diluição 1:200 no tampão de diluição da amostra (*dilute buffer* - Anexo E) e incubados por 1 hora a 37°C. Após esse período foram realizadas 3 lavagens com solução de lavagem para retirada dos anticorpos que eventualmente não reagiram.

Foi adicionado de 100 µl de conjugado anti-IgG ovina marcado com peroxidase diluído 1:400 em solução de lavagem e realizada a incubação por 1 hora a 37°C. Realizaram-se 3 lavagens com solução de lavagem para remoção dos anticorpos que não reagiram com IgGs ovina.

Todas as etapas de lavagem foram realizadas em lavador automático de placas *washwell Plate ELISA Washer, Robonik®*, com 250 µl de solução de lavagem por cavidade.

Para o preparo da solução reveladora utilizou-se o tampão citrato-fosfato pH 5,0 (Anexo F). A revelação da reação foi realizada com a adição da solução reveladora 50 µL (Anexo G) acrescido de peróxido de hidrogênio 30% e incubado a 37°C por 10 minutos. Após esse período foram adicionados 50 µl da solução de parada (*stop solution* - Anexo H) e a leitura das placas realizadas em aparelho leitor de microplacas com filtro de 492 nm.

3.4.3 Controles da reação de ELISA

Para evitar possíveis ruídos e reações inespecíficas foram realizados controles das reações da seguinte forma:

a) verificação da reatividade do conjugado anti-IgG ovina com antígeno: poços sensibilizados com antígeno do *C. pseudotuberculosis* + sensibilização com solução bloqueadora + conjugado + revelação.

b) verificação da reatividade do conjugado anti-IgG ovina com solução bloqueadora: poços sensibilizados com solução bloqueadora + adição de conjugado + revelação.

c) verificação da reatividade do conjugado anti-IgG ovina com o soro controle positivo ovino: placas foram sensibilizadas com soros ovinos + sensibilização com solução bloqueadora + adição de conjugado + revelação.

d) verificação da reatividade do conjugado anti-IgG ovina com o soro controle negativo ovino: placas foram sensibilizadas com soros ovinos + sensibilização com solução bloqueadora + adição de conjugado + revelação.

e) verificação do valor da D. O. para cada amostra é devido à reatividade com outros fatores externos exceto o antígeno: poços sensibilizados com solução bloqueadora + soro teste + adição de conjugado + revelação.

3.4.4 Leitura e Interpretação dos resultados

As leituras foram realizadas em leitor de microplacas marca Robonik® modelo Readwell Plate – *ELISA Plate Analyser* com filtro de 492 nm. Os valores de absorbância obtidos foram expressos através da média aritmética dos soros.

3.4.5 Determinação da diluição do anticorpo e antígeno

A diluição de uso foi determinada através da combinação entre a concentração de antígeno e de anticorpos, concomitantemente, o maior valor de absorbância para as amostras positivas e maior diferença das médias de absorbância entre as amostras positivas e negativas.

3.4.6 ELISA indireto

Para a reação de ELISA do presente trabalho foi utilizada 42 soros de animais positivos para linfadenite caseosa confirmados pelo isolamento e identificação bioquímica e PCR do *C. pseudotuberculosis*, e 43 soros de animais negativos no post-mortem em frigorífico especializado, e coletados fragmentos de pulmão e linfonodo mediastínico, e os mesmos foram negativos na identificação bioquímica e a PCR do agente *C. pseudotuberculosis*.

3.4.7 Estabelecimento do ponto de corte

O ponto de corte do teste ELISA foi determinado através da curva *ROC* (*receiver operator characteristics*) ou curva operacional relativa.

Os cálculos da sensibilidade e da especificidade foram realizados utilizando-se os resultados dos 85 soros (42 soros positivos e 43 soros negativos) ao teste de ELISA, tendo como prova padrão ouro o isolamento e identificação de *C. pseudotuberculosis* na lesão caseosa. Os valores preditivos positivos e negativos foram calculados com o valor de ponto de corte definido pela curva *ROC*.

3.4.8 Repetibilidade inter-reações de amostras de soros positivos e negativos no ELISA

Visando avaliar a eficácia da reação de ELISA foram selecionados 8 soros, 4 positivo e 4 negativo para linfadenite caseosa. Cada amostra foi testada em 4 placas com 4 repetições em cada, de modo a estabelecer a variância entre as repetições.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos segundo a metodologia empregada são descritos nos tópicos abaixo:

4.1 CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

4.1.1 Animais positivos

Dos 103 soros e punções de linfonodos superficiais de animais com sintomatologia aparente da linfadenite caseosa coletados em propriedades localizadas no Estado de São Paulo, e Minas Gerais, foram considerados positivos para linfadenite caseosa somente as amostras que foram concomitantemente positivas no cultivo microbiológico e na PCR da amostra clínica, consideradas técnicas padrão ouro. Na tabela 1 encontram-se os resultados das 42 (36%) amostras positivas.

4.1.2 Animais negativos

As amostras consideradas negativas foram coletadas no abatedouro localizado na região de Sorocaba- SP. Foram coletados 50 soros e fragmentos de pulmão e linfonodo mediastínico de cada animal. Na tabela 2 encontram-se os resultados do cultivo microbiológico e PCR das amostras dos animais sem lesão aparente.

Tabela 1 - Resultado do cultivo microbiológico e PCR dos ovinos com sintomatologia aparente colhidos em criatórios do Estado de São Paulo e em dois municípios de Estado de Minas Gerais – São Paulo - 2012

AMOSTRA	ID	SEXO	RAÇA	IDADE	PUNÇÃO DE LINFONODO	RESULTADO	
						CULTIVO MICROBIOLÓGICO	PCR AMOSTRA CLÍNICA
1	8	M	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
2	9	M	Mestiço	> 12 meses	sub-ilíaco	<i>Corynebacterium</i> sp	positivo
3	10	F	Mestiço	> 12 meses	mandibular	<i>Corynebacterium</i> sp	positivo
4	15	F	Santa Inês	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
5	25	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>Corynebacterium</i> sp	positivo
6	26	F	Mestiço	> 12 meses	mamário	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
7	31	F	Santa Inês	> 12 meses	mandibular	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
8	40	F	Santa Inês	> 12 meses	sub-ilíaco	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
9	41	F	Santa Inês	> 12 meses	sub-ilíaco	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
10	50	F	Santa Inês	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
11	55	F	Santa Inês	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
12	58	F	Santa Inês	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
13	63	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
14	67	F	Morada Nova	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
15	81	F	Morada Nova	> 12 meses	sub-ilíaco	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
16	83	F	Morada Nova	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
17	107	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
18	109	F	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
19	110	M	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
20	111	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
21	112	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
22	114	M	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
23	115	F	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
24	103	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
25	118	F	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
26	120	F	Mestiço	> 12 meses	mandibular	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
27	122	F	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
28	123	F	Mestiço	> 12 meses	poplíteo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
29	126	M	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
30	127	F	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
31	128	F	Mestiço	> 12 meses	poplíteo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
32	129	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
33	130	F	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
34	132	F	Santa Inês	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
35	133	F	Santa Inês	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
36	134	F	Santa Inês	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
37	136	F	Mestiço	> 12 meses	parotídeo	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
38	138	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
39	141	F	Mestiço	> 12 meses	mandibular	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
40	149	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
41	150	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo
42	151	F	Mestiço	> 12 meses	cervical superficial	<i>C.pseudotuberculosis</i>	positivo

legenda: ID: identificação do animal

Tabela 2 - Resultado do cultivo microbiológico e PCR das amostras de pulmão e linfonodo mediastínico provenientes de ovinos sem lesão aparente coletados em abatedouro localizado na cidade de Sorocaba – São Paulo – 2012

AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO ANIMAL	SEXO	RAÇA	RESULTADO	
				CULTIVO MICROBIOLÓGICO	PCR
1	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
2	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
3	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
4	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
5	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
6	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
7	COW PIG	Macho	Mestiço	Negativo	Negativo
8	COW PIG	Macho	Mestiço	Negativo	Negativo
9	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
10	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
11	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
12	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
13	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
14	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
15	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
16	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
17	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
18	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
19	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
20	COW PIG	Macho	Mestiço	Negativo	Negativo
21	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
22	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
23	COW PIG	Macho	Mestiço	Negativo	Negativo
24	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
25	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
26	COW PIG	Macho	Mestiço	Negativo	Negativo
27	COW PIG	Macho	Mestiço	Negativo	Negativo
28	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
29	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
30	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
31	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
32	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
33	COW PIG	Macho	Mestiço	Negativo	Negativo
34	COW PIG	Macho	Mestiço	Negativo	Negativo
35	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
36	COW PIG	Macho	Mestiço	Negativo	Negativo
37	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
38	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
39	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
40	COW PIG	Macho	Texel	Negativo	Negativo
41	COW PIG	Fêmea	Texel	Negativo	Negativo
42	COW PIG	Macho	Santa Inês	Negativo	Negativo
43	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
44	COW PIG	Macho	Santa Inês	Negativo	Negativo
45	COW PIG	Fêmea	Santa Inês	Negativo	Negativo
46	COW PIG	Fêmea	Texel	Negativo	Negativo
47	COW PIG	Fêmea	Mestiço	Negativo	Negativo
48	COW PIG	Macho	Texel	Negativo	Negativo
49	COW PIG	Fêmea	Texel	Negativo	Negativo
50	COW PIG	Fêmea	Texel	Negativo	Negativo

4.2 FREQUÊNCIAS DAS CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS ESTUDADOS COM RELAÇÃO AO EXAME CLÍNICO

Com relação à ficha clínica (Apêndice A) foram observadas algumas frequências obtidas nos criatórios ovinos no momento da colheita do material dos animais com lesão aparente para linfadenite caseosa. Na tabela 3 observa-se a raça e sexo prevalentes, sendo os animais mestiços e sexo fêmea, os maiores encontrados nesse estudo.

Tabela 3 - Frequência da raça e sexo dos ovinos com lesão aparente de linfadenite caseosa submetidos à colheita de material para análise diagnóstica – São Paulo – 2012

RAÇA	FÊMEAS	MACHOS	TOTAL
Mestiço	24	5	29 (69%)
Santa Inês	10	-	10 (23,8%)
Morada Nova	3	-	3 (7%)
Total	37	5	42 (100%)

Na tabela 4 observa-se a frequência de linfonodos aumentados no exame clínico do sistema linfático dos ovinos com lesão aparente.

Tabela 4 – Frequência de linfonodos acometidos pela linfadenite caseosa nos ovinos com lesão aparente submetido ao exame clínico – São Paulo - 2012

LINFONODO	TOTAL
Cervical superficial	21 (50%)
Parotídeo	10 (24%)
Mandibular	4 (9,5%)
Sub-ilíaco	4 (9,5%)
Poplíteo	2 (4,8%)
Mamário	1 (2,4%)
TOTAL	42 (100%)

Com relação aos animais sem sintomatologia aparente, colhidos em abatedouro, a relação da raça e sexo encontra-se descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Frequência da raça e sexo dos ovinos sem lesão aparente submetido à colheita de material para análise diagnóstica – São Paulo – 2012

RAÇA	FÊMEAS	MACHOS	TOTAL
Mestiço	33	9	41 (82%)
Santa Inês	2	1	3 (6%)
Texel	3	2	5 (6%)
TOTAL	38	12	50 (100%)

4.3 CULTIVO MICROBIOLÓGICO

Os resultados obtidos segundo a metodologia empregada no cultivo microbiológico das amostras clínicas são descritos nos tópicos abaixo:

4.3.1 Animais com sintomatologia aparente

Foram analisadas 103 punções de linfonodos de animais com lesões sugestivas de linfadenite caseosa colhidas no Estado de São Paulo.

Das 103 amostras analisadas no cultivo microbiológico, 55/103 (53,5%) colônias isoladas foram positivas para o gênero *Corynebacterium*, sendo que 41/55 (74,5%) foram identificadas como *C. pseudotuberculosis* através de provas bioquímicas: produção de catalase, fermentação variável de glicose e lactose, motilidade negativo, urease positivo, redução de nitrato negativo, liquefação de gelatina negativa, e 14/55 (25,5%) foram negativos através das provas bioquímicas e 3/103 não obtiveram crescimento bacteriano. Foram isolados outros agentes bacterianos nas 103 amostras clínicas analisadas (Gráfico 1) tais como, *Staphylococcus* sp (44,5%), *Bacillus* sp (38%), *Corynebacterium* sp (7%), Enterobactérias (6,5%), *Pseudomonas* sp (3%), *Escherichia coli* (3%), *Acinetobacter* sp (2,5%), *Serratia marcescens* (2%), *Streptococcus* sp (2%), *Citrobacter freundii* (2%), *Klebsiella ozaenae* (1,5%), *Actinomyces* sp (1%), *Klebsiella pneumoniae* (0,5%) e *Enterobacter gergoviae* (0,5%) e Bacilos Gram negativos não fermentadores (8%).

4.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

As reações em cadeia pela polimerase (PCR) foram precedidas da extração do DNA total e os resultados óbitos são descritos abaixo:

4.4.1 Animais com sintomatologia aparente

Analisando os resultados da PCR a partir do DNA extraído diretamente das amostras clínicas com sintomatologia aparente, 48/103 (46,5%) amostras foram positivas na PCR para *C. pseudotuberculosis* e 55/103 (53,5%) foram negativas.

4.4.2 Animais sem sintomatologia aparente

Analisando os resultados da PCR a partir do DNA extraído diretamente das amostras de pulmão e linfonodo mediastínico dos animais sem sintomatologia aparente, nenhuma amostra (0/50) foi considerada positiva para *C. pseudotuberculosis*.

4.5 ELISA INDIRETO

Os resultados da padronização do ELISA são descritos nos tópicos a seguir.

4.5.1 Quantificação proteica

Para realização do ELISA indireto, foi primeiramente realizada a quantificação proteica do antígeno empregado utilizando-se o método colorimétrico Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce®).

A concentração proteica definida para ELISA indireto foi de 75µg/mL.

4.5.2 Determinação da diluição de anticorpo e antígeno

Foram testadas 6 amostras positivas e 6 amostras negativas de acordo com os resultados obtidos no cultivo microbiológico e PCR das amostras. Os resultados encontram-se nas tabelas 6 e 7 sendo que os mesmos foram calculados com base na média aritmética entre os valores encontrados em todas as placas. Considerando-se os critérios de valor da absorbância dentro dos limites aceitáveis entre as médias de densidade óptica (positivo $\leq 2,00$); maior diluição do antígeno; dentre os resultados encontrados, adotou-se a concentração do antígeno a 4 $\mu\text{g/mL}$, e diluição do soro na concentração de 1:200, uma vez que essas concentrações apresentaram um valor da absorbância dentro dos limites aceitáveis entre as médias de densidade óptica e as diferenças entre os valores positivos e negativos foram significantes como mostrados nos gráficos 2, 3 e 4.

Tabela 6 - Valores médios de densidades ópticas obtidas com o ensaio de ELISA indireto utilizando diluições de soro sanguíneo positivo ao cultivo microbiológico e a PCR frente a diversas diluições do antígeno, com leitura a 492 nm- São Paulo-2012

PROTEÍNA $\mu\text{g/mL}$	SORO SANGUÍNEO POSITIVO			
	1:20	1:50	1:100	1:200
2	2,11	2,14	1,93	1,09
4	2,35	2,73	2,53	1,81
7,5	2,47	2,34	2,78	1,92
10	3,19	2,65	3,24	1,936

Tabela 7 - Valores médios de densidades ópticas obtidas com o ensaio de ELISA indireto utilizando diluições de soro sanguíneo negativo ao cultivo microbiológico e a PCR frente a diversas diluições do antígeno, com leitura a 492 nm- São Paulo-2012

PROTEÍNA $\mu\text{g/mL}$	SORO SANGUÍNEO NEGATIVO			
	1:20	1:50	1:100	1:200
2	0,319	0,319	0,272	0,188
4	0,607	0,505	0,486	0,348
7,5	0,865	0,960	0,569	0,425
10	0,957	0,710	0,603	0,508

Gráfico 2 – Resultado das amostras positivas diluídas nas concentrações do soro 1:20 até 1:200 com relação a concentração ideal de antígeno (4 $\mu\text{g/mL}$), com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012

Gráfico 3 – Resultado das amostras negativas diluídas nas concentrações do soro 1:20 até 1:200 com relação a concentração ideal de antígeno (4 $\mu\text{g/mL}$), com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012

Gráfico 4 – Correlação dos resultados das amostras positivas e negativas frente diluição do antígeno (4 µg/mL) e as concentrações do soro 1:20 até 1:200, com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012

4.5.3 Determinação da diluição de anticorpo e antígeno

Para a padronização do ELISA indireto foram utilizados 42 soros positivos confirmados pelo cultivo microbiológico e PCR considerados nesse estudo como padrão ouro e 43 amostras de soros negativos para linfadenite caseosa. Para as amostras positivas a média foi 1,88 com desvio padrão de 0,43, e para as amostras negativas a média de 0,71 e desvio padrão 0,18.

Nas tabelas 8 e 9 encontram-se os resultados das amostras positivas e negativas.

Tabela 8 – Resultado do ELISA indireto para as 42 amostras positivas para linfadenite caseosa – São Paulo – 2012

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS	RESULTADO 1	RESULTADO 2	MÉDIA
8	1.859	2.163	2,01
9	0,96	1.647	1,31
10	1.472	1.814	1,64
15	1.179	1.992	1,58
26	2.069	2.386	2,02
31	1.581	1.494	1,53
32	1.662	2.368	2,01
40	1.380	1.441	1,41
41	2.375	2.212	2,47
50	1.792	1.793	1,79
55	2.434	2.443	2,43
58	1.920	2.035	1,97
63	2.386	2.303	2,34
67	2.176	1.914	2,04
81	2.706	2.656	2,68
83	1.544	1.095	1,31
107	1.963	1.965	1,96
109	2.846	2.692	2,76
110	1.680	1.623	1,65
111	1.610	1.597	1,6
112	2.803	2.807	2,8
114	2.623	2.651	2,63
115	1.636	1.578	1,6
117	1.175	1.708	1,44
118	1.536	1.720	1,62
120	1.513	1.515	1,51
122	2.067	1.697	1,88
123	1.997	1.806	1,9
126	1.685	1.883	1,78
127	2.180	2.239	2,2
128	0,912	1.640	1,27
129	1.788	2.062	1,92
130	1.223	1.577	1,4
132	1.566	1.529	1,54
133	1.618	1.607	1,61
134	1.841	1.599	1,72
136	2.537	2.435	2,48
138	1.535	1.469	1,5
141	2.229	2.582	2,43
149	2.095	2.338	2,21
150	1.435	1.470	1,45
151	1.561	1.594	1,57

Tabela 9 – Resultado do ELISA indireto para as 43 amostras negativas para linfadenite caseosa – São Paulo – 2012

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS	RESULTADO 1	RESULTADO 2	MÉDIA
1	0.939	0.918	0.928
2	0.636	0.610	0.623
3	0.721	0.836	0,778
4	0.788	0.905	0.846
5	0.799	0.774	0.786
6	0.823	0.869	0.846
7	0.716	0.827	0.77
8	0.768	0.913	0.840
9	1.095	0.777	0.93
10	0.787	0.828	0.80
11	0.792	0.992	0.892
12	0.830	0.811	0.820
13	0.503	0.493	0.498
14	0.810	0.910	0.860
15	0.668	0.796	0.637
16	0.743	0.784	0,763
17	0.891	0.850	0.87
18	0.609	0.878	0.74
19	0.592	0.732	0.663
20	0.701	0.795	0.748
21	0.613	0.750	0.681
22	0.526	0.570	0.548
23	0.662	0.722	0.692
24	0.784	0.786	0.785
25	0.691	0.762	0.72
26	1.144	0.194	0.669
28	0.894	0.652	0,773
29	0.375	0.507	0,441
30	0.476	0.575	0,311
32	0.811	0.986	0,898
33	0.717	0.782	0,749
34	0.796	0.918	0,857
35	0.717	0.980	0,848
36	0.426	0.532	0,479
37	0.548	0.673	0,6
38	0.735	0.974	0,621
40	0.720	0.849	0,784
41	0.821	0.937	0,879
45	0.881	0.806	0.84
46	0.837	0.979	0,908
48	0.751	0.798	0.77
49	0.694	0.752	0.723
50	0.736	0.889	0.81

4.5.4 Controle da reação de ELISA indireto

Na tabela 10 estão expostos os resultados obtidos com os ensaios realizados com os controles de reação.

Tabela 10 – Valores médios de densidade óptica (DO) dos diferentes controles obtidos com ensaio de ELISA indireto com antígeno proteico *C. pseudotuberculosis*, com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012

CONTROLES	VALOR MÉDIO DE ABSORBÂNCIA (DO)
Sensibilização com antígeno proteico a 4 µg/100µL; solução bloqueadora a 10%, conjugado diluído 1:400 e solução reveladora (OPD)	0,140
Sensibilização da placa com proteína de bloqueio a 10%, conjugado diluído a 1:400 e solução reveladora (OPD)	0,147
Sensibilização com antígeno proteico a 4 µg/100µL; com soro controle positivo diluído 1:200, conjugado diluído 1:400 e solução reveladora (OPD)	1,810
Sensibilização com antígeno proteico a 4 µg/100µL; com soro controle negativo diluído 1:200, conjugado diluído 1:400	0,776
Sensibilização da placa com leite mólico a 10%, conjugado diluído a 1:400 e solução reveladora (OPD)	0,159

4.5.5 Estabelecimento do ponto de corte

O ponto de corte do teste ELISA foi determinado através da curva ROC (*receiver operator characteristics*) através do software SigmaPlot versão 12.1 (<http://www.sigmaplot.com>), a partir de um painel composto por 85 soros, dos quais 42 positivos e 43 negativos, tendo como referência (padrão ouro) a prova de cultivo microbiológico e PCR.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram na reação de ELISA desenvolvida neste trabalho, com valor da DO > 1,1 (95%CI – 0,9159 a 1,0) e negativas de <1,1 (95% CI – 0,9178 a 1,0). No gráfico 5 observa-se que foi possível se obter valores ideais de sensibilidade e especificidade relativas, com máxima área sob a curva, e no gráfico 6 o resultado do *dotplot*, verificou-se que não houve sobreposição das densidades ópticas das

populações padrão ouro positivas e negativas ao se adotar o ponto de corte definido anteriormente.

Gráfico 5 – Resultado do ELISA indireto para linfadenite caseosa das amostras de 85 soros, provenientes de ovinos analisados por meio da curva ROC – São Paulo – 2012

Gráfico 6 – Resultado do *dotplot* das amostras de 85 soros analisados pelo software – São Paulo – 2012

4.5.6 Repetibilidade inter-reações de amostras de soros positivos e negativos no ELISA indireto

Foram selecionados dois soros positivos, 4 negativo e 4 positivo para linfadenite através do cultivo microbiológico e PCR considerados padrão ouro na identificação do *C. pseudotuberculosis*. Testaram-se em 4 placas com 4 repetições e a média, desvio padrão e coeficiente de variação dos controles positivos e negativos estão descritos na tabela 11.

Tabela 11 Valores médios de absorbância da reação de ELISA na avaliação da repetibilidade de 4 amostras positivas e 4 amostras negativas para linfadenite caseosa, com leitura realizada a 492 nm – São Paulo – 2012

	AMOSTRAS POSITIVAS				AMOSTRAS NEGATIVAS			
Nº DE REPETIÇÕES								
MÉDIA DAS AMOSTRAS	1	2	3	4	1	2	3	4
1	1,99	1,48	1,48	1,88	0,511	0,685	0,804	0,423
2	1,82	1,48	1,51	1,91	0,517	0,658	0,8	0,435
3	1,89	1,62	1,47	1,99	0,428	0,638	0,802	0,451
4	1,81	1,42	1,4	1,9	0,512	0,6	0,822	0,421
MÉDIA	1,87	1,50	1,46	1,92	0,49	0,64	,080	0,43
DESVIO PADRÃO	0,083	0,085	0,047	0,0485	0,043	0,036	0,010	0,014
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	4,42%	5,65%	3,17%	2,51%	8,68%%	5,54%	1,25%	3,19%

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No Brasil a população de ovino tem aumentado desde meados de 1990 e hoje se estima que o rebanho nacional seja de 16 milhões de cabeças, dos quais 60% está localizado na região nordeste, 25% no sul, 6,4% no Centro-Oeste, 4% Sudeste e 4,6% em outros Estados, e esse crescente aumento da população favorece a disseminação da doença no rebanho nacional (FIRETTI; MOREIRA, 2007).

Segundo o Plano Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos, a ovinocultura ainda apresenta uma série de problemas, que dificultam a produção econômica desses animais e necessitam de urgentes soluções, visando minimizar os prejuízos. Nessa categoria incluem-se as doenças infecciosas como a linfadenite caseosa, verminoses, broncopneumonias e micoplasmoses (PNSCO, 2004).

A linfadenite caseosa caracteriza-se por ser enfermidade infecciosa de caráter crônico, que acomete pequenos ruminantes e com distribuição mundial. Essa enfermidade acarreta grandes perdas econômicas, seja pela diminuição na produção de leite, no ganho de peso, na condenação da carcaça e prejuízo no comércio de lã e pele dos animais. O diagnóstico rápido e preciso deve ser implantado para auxiliar em medidas de prevenção e controle, uma vez que a doença é caracterizada por formação de abscessos em linfonodos superficiais ou em tecidos cutâneos (forma cutânea) bem como a formação de abscessos em órgãos internos em sua forma visceral. A forma cutânea é a mais fácil de serem diagnosticadas pela presença de linfonodos superficiais aumentados. Já a forma visceral da doença é de difícil diagnóstico e dessa maneira os animais tornam-se portadores assintomáticos nos rebanhos (FONTAINE et al.; 2006).

Neste trabalho os animais foram selecionados em dois grupos: animais com sintomatologia aparente (n= 103); presença de aumento em linfonodos superficiais e/ou presença de abscessos cutâneos (BINNS et al., 2007). E os animais considerados negativos (n= 50) os mesmos foram selecionados em abatedouro para verificação da presença de abscessos internos já que não apresentavam aumento de linfonodos superficiais na inspeção pré-abate. Fontaine e Baird (2008) descreveram que animais infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis* por via subcutânea, desenvolveram focos primários de infecção

em linfonodos mediastínicos e pulmões. Menzies et al. (1994) reportaram que é impossível ter a certeza que a população de animais negativos seja realmente não infectado e que nunca entraram em contato com a doença. Porém Binns et al. (2007) selecionaram os animais negativos com a combinação de sinais clínicos negativos para a doença e animais de experimentos (*specific-pathogen-free*) que nunca entraram em contato com a doença.

No cultivo microbiológico dos animais com sintomatologia aparente, 53,5% (55/103) foram identificadas como *C. pseudotuberculosis* através de provas bioquímicas, e com a utilização da PCR, 46,5% (48/103) das amostras foram positivas para *C. pseudotuberculosis*. Khamis et al. (2005) ressaltam a importância de utilizar métodos moleculares (PCR, RFLP) na confirmação do gênero e espécie dos corineformes, uma vez que os testes bioquímicos utilizados na identificação dos *C. pseudotuberculosis* são variáveis. Segundo Çetinkaya et al. (2002), a utilização da PCR se mostra útil pela rapidez, especificidade e identificação de colônias cultivadas, uma vez que a identificação bioquímica não é confiável, além da baixa sensibilidade na detecção direta do agente em amostras clínicas.

Em contrapartida, Pacheco et al. (2007) reportaram que uma das desvantagens da PCR seria a dependência do cultivo microbiológico. Dessa forma no presente trabalho, optamos trabalhar com duas técnicas de diagnósticos confiáveis, o cultivo microbiológico e a PCR associadas, visto que a PCR com os primers descritos por Çetinkaya et al. (2002) não diferenciam *C. pseudotuberculosis* do *C. ulcerans* devido a semelhança na sequência do gene 16S rRNA de 99,7% de similariedade entre esses dois microrganismos, e com a utilização em associação ao cultivo microbiológico pudemos confirmar que a espécie isolada se tratava do agente em questão. As culturas dos abscessos dos animais com sintomatologia aparente revelaram o crescimento de diversos agentes bacterianos, com maior incidência dos gêneros *Bacillus* sp e *Staphylococcus* sp.

Por outro lado, Abreu et al. (2008) encontraram uma pluralidade de agentes infecciosos associados com o *C. pseudotuberculosis*, destacando a presença *Staphylococcus* sp e bactérias Gram negativas não identificadas. Já Said et al. (2002) também relatam a presença do gênero *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Streptococcus* sp, entre outros, mas nenhum dos trabalhos relatam a presença de *Arcanobacterium pyogenes* e *Pasteurella multocida*, citados como microrganismos que podem vir a causar lesões

purulentas semelhantes ao *C. pseudotuberculosis* (DERCKSEN et al., 2000; DORELLA et al., 2006).

Com relação aos animais sem sintomatologia aparente, foram coletados (n=50) em frigoríficos, pois esses animais poderiam ser considerados fontes de infecção nos rebanhos, uma vez que são disseminadores indetectáveis do microrganismo, fato relatado por Arsenault et al. (2003) e Stoops et al. (1984) onde apenas 26% dos ovinos do total de 450 fêmeas abatidas apresentavam lesões aparentes sem sintomatologia compatíveis com linfadenite caseosa.

Atualmente existem muitos testes ELISA que utilizam diversos antígenos da bactéria como: parede, exotoxina (fosfolipase D), e exotoxina recombinante (MENZIES et al., 1994; BINNS et al., 2007; CHIRINO-ZÁRRAGA et al., 2009).

As proteínas encontradas no sobrenadante da cultura do *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI e reconhecidas através do *Western blotting* têm peso molecular abaixo de 68 KDa e, portanto, são facilmente reconhecidas pelos anticorpos produzidos pelos ovinos e caprinos (MUCKLE et al., 1992; TER LAACK et al., 1992). Paule et al. (2004) estudaram as frações proteicas do *C. pseudotuberculosis* através das técnicas de SDS-Page e *imunoblot* utilizando *pool* de soros de cabras naturalmente infectadas. Nos antígenos obtidos do sobrenadante da cultura em meio BHI foram identificadas 16 proteínas imunorreativas e concluíram que essas frações são muito úteis para fins de diagnóstico, como ELISA.

Sensibilidade e especificidade são parâmetros fundamentais para definição de teste diagnóstico. Dessa forma, quanto maior a sensibilidade do teste, maior será a capacidade do teste negativo afastar a doença, devido diminuição do falso-negativo. Quanto maior a especificidade, maior a capacidade de o teste positivo indicar a doença e dessa maneira diminuir os resultados falso-positivos. A análise gráfica empregada no presente trabalho, curva *ROC*, permitiu encontrar o valor do ponto de corte associado à combinação dos parâmetros de sensibilidade e especificidade, assim a acurácia do teste discriminou indivíduos doentes de não doentes. Além disso, este teste estatístico (curva *ROC*) é uma ferramenta importante para descrever a habilidade de uma variável categórica ordinal ou contínua em classificar os indivíduos em dois grupos. (MARTINEZ et al., 2003).

O teste ELISA indireto padronizado nesse trabalho foi realizado com a utilização do antígeno de parede, sobrenadante de células e dessa forma pôde detectar muitos antígenos presentes no *C. pseudotuberculosis*, porém a sensibilidade e especificidade da reação foram de 100% para ambas. O resultado da sensibilidade especificidade do teste e da repetibilidade desenvolvida nesse trabalho, viabilizam a utilização do ELISA na rotina diagnóstica, dada facilidade do teste, automação e pequena quantidade de amostra utilizada. Ainda os coeficientes de variação encontrados, estão dentro dos limites aceitáveis ($\leq 15\%$) (CROWTHER, 2009).

Em um estudo feito por Dercksen et al. (2000), avaliaram quatro testes ELISA para detecção de anticorpos em ovinos, o teste que apresentou uma melhor sensibilidade ($79 \pm 5\%$) e especificidade ($99 \pm 1\%$) foi o teste que utilizou a exotoxina (fosfolipase D) descrita por Menzies et al. (1994) como antígeno.

Kaba et al.(2001) padronizaram teste ELISA com extrato de parede bruto e em relação a sensibilidade e especificidade foram 85% e 96%, respectivamente. Carminati (2005) avaliou a sensibilidade e especificidade de quatro ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando, como padrão ouro o isolamento microbiológico confirmado pela PCR. Foram utilizados dois antígenos, o primeiro sobrenadante de cultura de *C. pseudotuberculosis* em meio BHI, e o segundo através do fracionamento e três fases (TPP) do sobrenadante de cultura do *C. pseudotuberculosis* no mesmo meio, a sensibilidade e especificidade foram 98% e 98% para o ELISA com sobrenadante, e 100% e 100% com antígeno TPP, igualmente ao encontrado no presente estudo. Já Seyffert et al. (2010) realizaram estudo de prevalência na região de Minas Gerais, com a utilização de ELISA indireto com antígeno bruto do *C. pseudotuberculosis* e a sensibilidade e especificidade foram 93,5% e 100%.

Essa diferença de sensibilidade encontrada pelos autores pode ser explicada primeiramente pela seleção dos animais, naturalmente infectados ou através de infecção experimental; a natural circulação de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* no animal, devido à capacidade do sistema imune produzir anticorpos contra a doença; período de latência; ou reação cruzada com outros microrganismos derivados da cultura do sobrenadante com anticorpos produzidos contra proteínas similares a outros patógenos (Seyffert et al., 2010).

Baird e Fontaine (2007) relataram que ELISA com antígeno bruto empregado no diagnóstico é muito promissora, porém ressalva que a sensibilidade é relativamente boa, mas a especificidade pode ser mais baixa devido a reações cruzadas com outras proteínas presentes na preparação do antígeno. Carminati (2005), na padronização do teste ELISA indireto, utilizou o sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* como antígeno e das amostras testadas, dois animais que provinham de região com isolado confirmado de *Arcanobacterium pyogenes* tiveram resultado negativo para o teste ELISA contra *C. pseudotuberculosis* rebatendo que possa haver reação cruzada com proteínas de outros antígenos bacterianos responsáveis por causar doença semelhante à linfadenite caseosa.

A utilização de técnicas sorológicas no diagnóstico da linfadenite caseosa permitirá o controle epidemiológico da doença, porém não substitui o isolamento e identificação bacteriana, técnicas consideradas padrão ouro, pode ser utilizada como teste de triagem ou mesmo na comercialização de animais, visto que a doença muitas vezes é de caráter inaparente, o que inviabiliza o diagnóstico clínico e microbiológico.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- A definição da população de animais positivos e negativos através das técnicas de cultivo microbiológico e a reação da polimerase em cadeia permitiu a utilização da curva *ROC* na determinação do ponto de corte, otimizando, desta maneira, a sensibilidade e especificidade do ELISA, que foram de 100% para ambas.

- A padronização do ELISA permitirá determinar a prevalência e estimar a incidência de linfadenite caseosa no Estado de São Paulo, contribuindo dessa forma com o Programa Nacional de Caprinos e Ovinos (PNSCO) para o controle epidemiológico da doença no rebanho.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABREU, S. R. O.; MOTA, R. A.; ROSINHA, G. M. S.; FORNER, O.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; PEREIRA, R. R. B.; CASTRO, R. S.; ELISEI, C.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; MADUREIRA, R. C. Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 481-487, 2008.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa – recomendações e medidas profiláticas. **Agropecuária Catarinense**, v. 13, p. 12-14, 2002.
- ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite caseosa: O Estado da Arte. Embrapa Caprinos, Sobral**, 2007. 60 p.
- ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALAMEAU, J. R.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Prevent Veterinary Medicine**, v. 59, p. 67-81, 2003.
- AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis pathogenesis, and immunity. **Journal American Medicine Assistant**, v. 171, p. 1251 - 1254, 1977.
- BAIRD, G. J. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. **Veterinary Record**, v. 159, p. 500, 2006.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal Comparative Pathology**, v. 137, p. 179-210, 2007.
- BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, n. 63, p. 269-272, 1986.
- BATEY, R. G.; SPEED, C. M.; KOBES, C. J. Prevalence and distribution of caseous lymphadenitis in feral goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, p. 33-36, 1986.
- BIER, O. Bacteriologia e imunologia. In: _____. **Corinebactérias**. São Paulo: Melhoramentos, 1978. p. 572-584.
- BINNS, S. H.; BAILEY, M.; GREEN, L. E. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. **Veterinary Record**, v. 150, p. 263-268, 2002.

BINNS, S. H.; GREEN, L. E.; BAILEY, M. Development and validation of ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 169-179, 2007.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 57, n. 1, 1987.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES, S. F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis is a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeast Brazil. **Canadian of Journal Veterinary Research**, v. 51, p. 46-49, 1987.

BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 3, p. 105-110, 1981.

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

BURRELL, D. H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. **Research Veterinary Science**, v. 28, p. 234-237, 1980.

CARMINATI, R. **Estudo da sensibilidade e especificidade de quatros testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos**. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2005.

ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R. DE BAERE, T.; VENECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary of Microbiology**, v.88, p. 75-83, 2002.

CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; REY-VALERION, C.; SCARAMELLI, A., CARRERO, L. Diagnosis of caseous lymphadenitis by ELISA in naturally infeted goats from Venezuela. **Small Ruminants Research**, v. 87, p. 92-95, 2009.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. In: _____. **Linfadenite Caseosa em Ovinos**. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 147-149.

COSTA, L. F. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 1, n .1, p. 105-115, 2002.

CROWTHER, J. R. Methods in molecular biology, the ELISA guidebook. In: _____. Validation of diagnostic test for infections diseases. Austria: Humana Press, 2009. p. 291-334.

DANIEL, G. T.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A. F. C. Detecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através do cultivo microbiológico e PCR em amostras ovinas suspeitas de linfadenite caseosa no Estado de São Paulo – SP. **O Biológico**, v. 71, n. 2, p. 21, 2009.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; VAN MAANEM, K.; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological test for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary of Microbiology**, v. 75, p. 167-175, 2000.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis* microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary. Research**, v. 37, p. 201-218, 2006.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; HOLLER, L. D.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 10, p. 1609-1613, 1990.

FIRETTI, R.; MOREIRA, A. L. A carne ovina e a microrregião de Presidente Prudente. **Revista O Berro**, 16 de outubro de 2007. Disponível em: <<http://www.revistaberro.com.br/materias/ler,866>>. Acesso em: 19 Set 2008.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminants Research**, v. 76, p. 42-48, 2008.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with the virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, p. 5986-5996, 2006.

GUIMARÃES, A. S.; SEYFFERT, N.; BASTOS, B. L.; PORTELA, R. W. D.; MEYER, R.; CARMO, F. B.; CRUZ, J. C. M.; MCCULLOCH, J. A.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the State of Minas Gerais, Brazil: prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, v. 87, p. 86-91, 2009.

HODGSON, A. L. M.; BIRD, P.; NISBET, I. T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 3, p. 1256-1261, 1990.

JOLLY, R. D. Some observation of surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 29, p. 189-196, 1966.

KABA, J.; KUTSCHKE, L.; GERLACH, G. F. Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. **Veterinary Microbiology**, n. 78, p. 155-163, 2001.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; SCOLA, B. L. *rpoB* Gene Sequencing for Identification of *Corynebacterium* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3925-3931, 2005.

KONEMAN, E. W.; WILLIAM, M. J.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; WOODS, G. L. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. In: _____. **Bacilos Gram-positivos aeróbicos e facultativos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 760-851.

LLOYD, S.; LINDSAY, H. J.; SLATER, J. D.; JACKSON, P. G. G. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (caseous lymphadenitis) in goats. **Goat Veterinary Society**, v. 11, p. 55-65, 1990.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.

MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 279-286, 2007.

MENZIES, P. I.; MUCKLE, C. A. The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 10, p. 313-318, 1989.

MENZIES, P. I.; MUCKLE, C. A.; HWANG, Y. T.; SONGER, G. J. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Small Ruminant Research**, v. 13, p. 193-198, 1994.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREITE, S. M. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, p. 249-254, 2005.

MOURA-COSTA, M. D.; CAMARA, J. Q.; ROCHA, J. V. N.; MARTINEZ, T. C. N.

Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 1973.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v. 46, p. 206-208, 1982.

MUCKLE, C. A.; MENZIES, P. I.; LI, Y.; HWANG, Y. T. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 30, p. 47-58, 1992.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, p. 537-542, 1974.

O'REILLY, K. M.; GREEN, L. E.; MALONE, F. E.; MEDLEY, G. F. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. **Prevent Veterinary Medicine**, v. 83, p. 242-259, 2008.

PACHECO, L. G. C.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L. P.; DORELLA, F. A.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; FROTA, M. N. L.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; ALVES, F. S. F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 480-486, 2007.

PATON, M. W.; MERCY, A. R.; SUTHERLAND, S. S.; ELLIS, T. The influence of shearing and age on the incidence of caseous lymphadenitis in Australian sheep flocks. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 84, p. 101-103, 1988.

PATON, M. W.; SUTHERLAND, S. S.; ROSE, I. R.; HART, R. A.; ELLIS, T. M. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in unvaccinated and vaccinated sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, n. 7, p. 266-269, 1995.

PATON, M. W.; WALKER, S. B.; ROSE, I. R.; WATT, G. F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, p. 91-95, 2003.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; NASCIMENTO, I.; MEYER, R. SDS-PAGE and western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 3, n. 1, p. 44-52, 2004.

PEPIN, M.; BISRAM, A.; MARLY, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis*; biochemical properties production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. **Annales de**

Recherches Veterinaires, v. 20, p. 111-115, 1989.

PNSCO - PROGRAMA NACIONAL DE SANIDADE DOS CAPRINOS E OVINOS – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2004. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/PNSCO>>. Acesso em: 29 fev. 2012.

PUGH, D. G. Sheep & Goat Medicine. In: DIFFAY, B. C.; McKENZIE, D.; WOLF, C.; PUGH, D. C. **Handling and examination of sheep and goat**. Philadelphia: Saunders, 2005. p. 8-24.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Capítulo 10- Gênero *Corynebacterium* In: _____ **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1.ed. Artemed Editora S.A: Porto Alegre, 2005. p. 67-70.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. Veterinary Medicine. In: _____ **A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. London: Baillière Tindall, 1994. p. 652-655.

RAWASHDEH, O. F.; QUDAH, K. M. Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 47, p. 287-293, 2000.

RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O.; ROCHA, N. S.; DOMINGUES, P. F.; RIBEIRO, A. R.; NARDI JUNIOR, G. Citologia aspirativa com agulha fina e microscopia eletrônica de varredura no diagnostic de mastite clínica bovina por *Prototheca zopfii*. **Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção**, v. 2, n. 5, p. 15-20, 1999.

RIBEIRO, M. G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A. C.; BARBOSA, P. G.; NARDI JUNIOR, G.; LISTONI, F. J. P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 68, n. 1, p. 23-28, 2001.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2.ed. Livraria Varela: São Paulo, 2001. p. 425.

ROBINS, R. Focus on caseous lymphadenitis. **State Veterinary Journal**, v. 1, p. 7–10, 1991.

SAÏD, M. S. B.; MAITIGUE, H. B.; BENZARTI, M.; REJEB, A.; AMARA, A. Contribution a l'etude epidemiologique et clinique de La lymphadenite caseuse chez lês ovins. **Archives de Institut Pasteur de Tunis**, v. 79, p. 51-57, 2002.

SCHREUDER, B. E.; TER LAAK, E. A.; DERCKSEN, D. P. Erradication of caseous

lymphadenitis in sheep with the help of a newly development ELISA technique. **Veterinary Record**, v. 135, p. 174-176, 1994.

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

SHIGIDI, M. T. A. A comparison of five serological tests for diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. **Brazilian Veterinary Journal**, v. 135, p. 172-177, 1979.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. Caseous Lymphadenitis. In: ____ **Goat Medicine**. Lea; Febier, 1994. p. 47-61.

SOLANET, J. J.; MALENA, R.; ESTEIN, S. M.; BELCHIOR, S. E.; PAOLICCHI, F. A. Desarrollo de uma prueba de ELISA para detectar anticuerpos em carneors vacunados o infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 43, p. 9-17, 2011.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 2, n. 49, p. 223-226, 1988.

SONGER, J. G.; LIBBY, S. J.; IANDOLO, J. H.; CUEVAS, W. A. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 1, p. 131-136, 1990.

STOOPS, S. G.; RENSHAW, H. W.; THILSTED, J. P. Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 557-561, 1984.

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. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 1125-1132, 1992.

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, p. 192-200, 2003.

WALKER, J.; JACKSON, H. J.; EGGLETON, D. G.; MEEUSEN, E. N. T.; WILSON, M. J.; BRANDON, M. R. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2562-2567, 1994.

WILLIAMS, C. S. F. Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinical**, v. 75, n. 7, p. 1165-1169, 1980.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinical of North America: Food Animal Practice**, v. 17, p. 359-371, 2001.

Apêndice A - Ficha clínica utilizada no experimento

A.1 Ficha Clínica dos ovinos analisados para a pesquisa de linfadenite caseosa por ELISA teste.

DATA DA COLHEITA: ____ / ____ / 20____

IDENTIFICAÇÃO			
Nome:	Sexo: F () M ()	Raça:	Idade:
Município:	Vacinação : () sim () não		
EXAME CLÍNICO GERAL			
Inspeção geral:			
Anamnese:			
Estado Nutricional:		Escore:	
Funções vitais: FC bpm	FR mpm	MR mpm	Temperatura: °C
Mucosas: () Hipocoradas () Normais () Hipercoreadas () Outros			
Linfonodos: () linfadenite aparente () suspeita linfadenite inaparente			
Tamanho:			
Consistência:			
Sistema digestivo:			
Sistema respiratório:			
Sistema nervoso:			
Sistema locomotor:			
Sistema gênito-urinário:			
Diagnóstico:			
Exames complementares:			
- Cultivo:			
- PCR para <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> : () Positivo () Negativo () Não realizado			
Obs.:			

Tecidos com lesão caseosa:

☐

Pulmão

☐

Fígado

☐

Outros: _____

Linfonodos alterados: a) parotídeo, b) retrofaríngeo, c) submandibular, d) cervical superficial, e) sub-ilíaco, f) poplíteo

Anexo A - Protocolo de preparo do tampão fosfato salina (PBS) realização do teste de ELISA

A.1 Fórmula do Tampão fosfato salino 10X (PBS-*phosphate buffered saline*)

<u>REAGENTE</u>	<u>QUANTIDADE /VOLUME</u>
NaCl 1,37M _____	64,0 g
KCl 0,027M _____	1,62 g
Na ₂ HPO ₄ 0,10M _____	14,2 g
KH ₂ PO ₄ 0,017M _____	1,85 g
Água ultra pura _____	q.s.p. 800 mL

A.2 Preparo do Tampão fosfato salino 10X (PBS-*phosphate buffered saline*)

Solubilizar os reagentes em 600 mL de água, acertar o pH com HCL 1:1, completar o volume q.s.p. 800 mL, autoclavar e armazenar a temperatura ambiente.

Anexo B - Protocolo de preparo do tampão de sensibilização das placas de ELISA

B.1 Fórmula do Tampão de sensibilização pH 9,6 – ELISA.

<u>REAGENTE</u>	<u>QUANTIDADE /VOLUME</u>
Carbonato de sódio _____	0,85 g
Bicarbonato de sódio _____	1,43g
Água ultra pura _____	q.s.p. 500 mL

B.2 Preparo do Tampão de sensibilização pH 9,6 – ELISA.

Solubilizar os reagentes em 300 mL de água, ajustar o pH, completar o volume com água em armazenar a 4°C.

Anexo C - Protocolo de preparo do tampão de lavagem (*wash buffer*) das placas de ELISA

C.1 Fórmula do Tampão de Lavagem (*wash buffer*)

<u>REAGENTE</u>	<u>QUANTIDADE /VOLUME</u>
PBS 10X _____	100 mL
Tween 20® _____	0,5 mL
Água ultra pura _____	q.s.p. 900 mL

C.2 Preparo do Tampão de Lavagem (*wash buffer*)

Solubilizar os reagentes em 600 mL de água, completar o volume q.s.p. 900 mL, armazenar a temperatura ambiente.

Anexo D - Protocolo de preparo da solução bloqueadora para teste de ELISA

D.1 Fórmula da solução bloqueadora

<u>REAGENTE</u>	<u>QUANTIDADE /VOLUME</u>
<i>Wash buffer</i> _____	50mL
leite em pó desnatado _____	5g

D.2 Preparo da solução bloqueadora

Pesar 5 g de leite em pó desnatado e adicionar o tampão acrescido de Tween 20 % 0,05% (*Wash buffer*) até completar o volume de 50 mL.

Anexo E - Protocolo de preparo do tampão de diluição dos anticorpos (*dilute buffer*) do teste de ELISA

E.1 Fórmula do Tampão de diluição dos anticorpos (*dilute buffer*)

<u>REAGENTE</u>	<u>QUANTIDADE /VOLUME</u>
PBS 10X _____	5 mL
Tween 20® _____	5 µL
leite em pó desnatado _____	0,5 g
Água ultra pura _____	q.s.p. 50 mL

E.2 Preparo do Tampão de diluição dos anticorpos (*dilute buffer*)

Solubilizar os reagentes em 30 mL de água, completar o volume q.s.p 50 mL, utilizar logo após o preparo.

Anexo F - Protocolo de preparo do tampão citrato-fosfato pH 5,0 do teste de ELISA

F.1 Fórmula do Tampão Citrato-fosfato pH 5,0

<u>REAGENTE</u>	<u>QUANTIDADE /VOLUME</u>
Citrato de sódio dibásico 0,1M _____	29,41 g
Fosfato de sódio monobásico 0,2M _____	23,99 g
Água ultra pura _____	q.s.p. 1000 mL

F.2 Preparo do Tampão Citrato-fosfato pH 5,0

Solubilizar os reagentes em 800mL de água, ajustar o pH com HCL 1:1, completar o volume q.s.p. 1000 mL, autoclavar e armazenar a 4°C.

Anexo G - Protocolo de preparo da solução reveladora – ortofenilenodiamina – OPD para teste de ELISA

G.1 Fórmula da solução cromógena – ortofenilenodiamina – OPD

<u>REAGENTE</u>	<u>QUANTIDADE /VOLUME</u>
Ortofenilenodiamina (OPD)	_____ 8 mg
Tampão citrato-fosfato	_____ 20 mL
Peróxido de hidrogênio H ₂ O ₂ 30%	_____ 10 µL

G.2 Preparo da solução cromógena – ortofenilenodiamina – OPD

Homogeneizar os reagentes em um frasco de vidro fosco, ou envolto de papel alumínio. Obs: Preparar imediatamente antes do uso.

Anexo H - Protocolo de preparo da solução de parada

(*stop solution*) para teste de ELISA

H.1 Fórmula da solução de parada (*stop solution*)

<u>REAGENTE</u>	<u>QUANTIDADE /VOLUME</u>
Ácido sulfúrico – H ₂ SO ₄ (95 a 97%)	_____ 22,4 mL
Água ultra pura	_____ q.s.p. 100 mL

H.2 Preparo da solução de parada (*stop solution*)

Adicionar lentamente o ácido sulfúrico ao volume de água ultra pura, monitorando a liberação de calor da reação. Armazenar em frasco de vidro fosco, ou envolto por papel alumínio em temperatura ambiente.