

Diagnóstico da Linfadenite Caseosa em Caprinos Através de um Teste de Pele

FRANCISCO SELMO F. ALVES¹; HARVEY J. OLANDER²

Resumo

Dez caprinos foram vacinados com toxóide a 3%, dez vacinados com uma bacterina e dois grupos controle (cinco animais cada) foram examinados e avaliados com um teste de pele. Antígeno cru de células do *Corynebacterium pseudotuberculosis* formalizado foi utilizado no teste. Todos os caprinos foram desafiados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*, trinta dias após as vacinações. Nenhuma das vacinas induziu reação de hipersensibilidade na pele dos caprinos antes da infecção. Após a infecção, todos os animais desenvolveram reações mensuráveis na primeira, quinta e décima semana em resposta ao teste de pele. Os diâmetros da reação dérmica aumentaram do décimo dia à quinta semana após a infecção. As medidas alcançaram o seu tamanho maior na décima semana. O resultado deste estudo indica que antígeno específico do *C. pseudotuberculosis* pode ser usado em caprinos no diagnóstico da linfadenite caseosa como teste de pele.

Palavras-chave: bactéria, diagnóstico, teste alérgico, imunidade celular, antígeno, doença subclínica.

DIAGNOSIS OF CASEOUS Lymphadenite IN GOATS BASED ON A SKIN TEST

Abstract

Ten goats were vaccinated with a toxoid 3%, ten vaccinated with a bacterin and two control groups (5 animals each), were skin tested with a crude antigen of formalin-killed *C. pseudotuberculosis* bacterial cells. All goats were challenged with a virulent *C. pseudotuberculosis* thirty days after vaccination. Neither the vaccinated nor control goats responded to the skin test prior to infection. After the challenge, dermal reactions was demonstrated in all animals at one week, five and ten weeks. The diameters increasead from day ten to five weeks. The reactions were more prominent at 10 weeks. The results of this study indicate that skin testing with a specific bacterial antigen of *C. pseudotuberculosis* may be useful in goats for field diagnosis of caseous lymphadenitis or as an experimental tool to monitor progress of the disease.

Keywords: bacteria, diagnostic, allergic test, cell immunity, antigen, subclinical disease.

Introdução

A Linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa causada por uma bactéria denominada *Corynebacterium pseudotuberculosis* que acomete caprinos e ovinos, caracterizada pela formação de abscessos superficiais e/ou nas vísceras. Diversos testes sorológicos e alérgicos foram utilizados no diagnóstico desta enfermidade^{2,4,1}, entretanto, se faz necessária a avaliação e o uso prático em campo. O teste de pele é um método de diagnóstico usado para verificar uma infecção causada por microrganismos intracelulares, e é também usado para medir o estado imunológico mediado por células. É usado comumente em doenças causadas por mycobactérias. O *C. pseudotuberculosis* e o *Mycobacterium* spp apresentam similaridade na estrutura da parede celular³, são microrganismos intracelulares facultativos, com imunidade mediada por células, daí o uso do teste de pele ser importante no diagnóstico destas enfermidades. Em caprinos e ovinos naturalmente e artificialmente infectados com *C. pseudotuberculosis*, a tuberculina demonstrou uma reação cruzada não específica, isto, provavelmente em decorrência de antígenos comuns da parede celular⁷. Usando células sonicadas do *C. pseudotuberculosis* em um grupo de ovelhas com lesões de linfadenite visceral⁸, observaram que o nível de reação foi baixo (56%) provavelmente devido ao

estado de imunossupressão, decorrente da doença disseminada.

LANGENEGGER et al⁵ utilizaram um alérgeno em 40 caprinos, que consistia de proteína hidrossolúvel, extraída a partir de células lavadas do *C. pseudotuberculosis*, e conhecida como "linfadenina". Usando em grupos de caprinos portadores e grupos sadios encontraram diferença entre as respostas dos animais doentes e sadios, mostrando assim resultados promissores. Torna-se essencial contar com meios de diagnóstico desta infecção, já em sua fase subclínica e que sejam de fácil aplicação. O trabalho teve como objetivo avaliar o uso do teste de pele em caprinos vacinados e experimentalmente infectados com o *C. pseudotuberculosis*.

- Material e Métodos

A cepa do *C. pseudotuberculosis* usada no experimento foi obtida de um abscesso de um caprino naturalmente infectado. A bactéria foi identificada no Laboratório de Diagnóstico Microbiológico do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade da Califórnia, Davis. Trinta animais da raça Pardo Alpina com idade de cinco meses, os quais foram casualmente separados em quatro grupos: Grupo I, (10) animais vacinados duas vezes com toxóide a 3%; Grupo II, (10) animais vacinados duas vezes com bacterina; Grupo III, controle(5) animais vacinados com meio de infusão de

¹ EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos Estrada Sobral/Groairas Km 04 Caixa Postal D-10, Sobral-Ceará.

² Universidade da Califórnia, Davis / Departamento de Patologia Veterinária, 95616-Davis, CA.

cérebro e coração; e Grupo IV, controle (5) animais vacinados com solução salina. A vacina toxóide a 3% e a bacterina foram produzidas a partir da cepa isolada. O antígeno para o teste de pele foi preparado segundo o método de Brown¹. O material final obtido foi prensado em um instrumento (prensa Francesa) a 20 000 psi para se tornar viscoso e obter a fragmentação das células. Em espectrofotômetro, comprimento de onda de 540µm a diluição de 1:100 apresentou absorvância linear de 0,57 e a transmitância de 25%. Trinta dias após a segunda vacinação, todos os caprinos foram desafiados por via intradérmica com 100µl (4.2x10³ unidade de colônias formada) de *C. pseudotuberculosis*. O teste de pele foi realizado 10 dias antes da infecção experimental, 1 semana, 5 e 10 semanas após à infecção. Cada caprino foi inoculado por via intradérmica na base mediana ventral da cauda com 0,1 ml da diluição de 1:100. A pele foi higienizada com álcool a 70% antes de cada inoculação. A leitura e a interpretação da reação alérgica foram realizadas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação. A espessura da dobra da pele foi verificada usando um cutímetro de Hauptner e realizada antes da inoculação. O teste de Student foi utilizado para verificar a diferença significativa do diâmetro da reação dérmica entre os grupos vacinados e os grupos controles.

Resultados e Discussão

Os caprinos não desenvolveram reações ao teste de pele depois das vacinações e antes da infecção. Após a infecção todos os animais desenvolveram reações mensuráveis em resposta ao teste de pele. Os diâmetros da reação dérmica aumentaram do décimo dia após a infecção à quinta semana, e as medidas alcançaram o seu tamanho maior na décima semana. Usando o teste de Student, não houve diferença significativa ($p < .01$) entre grupos I e II e entre grupo I e o dois grupos controle na quinta e décima semana após à infecção. Os achados estão condizentes com os de BROWN et al¹ que utilizaram células fragmentadas do *C. pseudotuberculosis* em um teste de pele e inoculadas em intervalos irregulares em caprinos infectados experimentalmente. Eles observaram que não houve reação dérmica ao teste antes da infecção. Entretanto, as respostas ao teste de pele aumentaram diretamente em relação a severidade da doença clínica. Neste trabalho, o teste de pele foi realizado para avaliar a imunidade celular em caprinos vacinados e infectados e observou-se que nenhum dos animais vacinados e o grupo controle responderam ao teste de pele antes da infecção. Após a infecção, oito animais no grupo I apresentavam reação ao teste de pele na primeira semana, quinta e décima semana. No grupo II, haviam nove animais que responderam na primeira semana, e seis destes na quinta, e oito deles na décima semana. Nos dois grupos controle, cinco animais reagiram positivos na primeira semana, quinta e décima semana. As reações foram mais proeminente na décima semana indicando um desenvolvimento contínuo da resposta imuno celular. Não houve uma correlação aparente entre a severidade da doença e as reações de pele. Três animais com a doença disseminada apresentavam o diâmetro da reação de 1.8 cm, 1.9 e 1.8 cm, respectivamente com média de 1,8 cm, enquanto que seis animais sem a presença de lesões demonstravam reações de 2.0 cm, 1.9, 2.1, 1.0, 1.7, e 1.2 cm, com média de 1.65 cm.

As reações não discriminadas observadas nestes animais, talvez seja a um não único componente. O reagente utilizado neste experimento para o teste de pele era cru, ou seja uma suspensão de células fragmentadas do *C. pseudotuberculosis*, então uma quantidade vasta de antígenos incluindo componentes da parede celular, citoplasma e organelas intracelulares estavam presentes aos imunócitos. A presença da exotoxina encontrada na parede celular e em menor quantidade na parede celular desta bactéria^{1,3} pode favorecer uma reação local de Arthus o que ficou confundido com a possibilidade de uma reação de hipersensibilidade. O antígeno purificado pode ser útil na avaliação da resposta imunológica em animais experimentais para observar o progresso da doença ou em diagnóstico de caprinos com LC em campo^{3,5}. O *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria intracelular facultativa³ e a eliminação deste microrganismo necessita de células especializadas e ativas na lesão. A imunidade mediada por células induz a formação de uma população de células mononucleares especializadas em fagocitar e destruir estes microrganismos intracelulares⁶.

Conclusões

Os achados demonstram que é fundamental a purificação do antígeno para o teste de pele da linfadenite caseosa, removendo a exotoxina e componentes citoplasmáticos. O uso de um antígeno específico do *C. pseudotuberculosis* como teste de pele pode auxiliar no diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos e ovinos a campo. O teste de pele para o *C. pseudotuberculosis* é útil para verificar a imunidade mediada por células e detectar casos subclínicos em um rebanho onde a avaliação sorológica é impraticável.

Referências Bibliográficas

- 1 - BROWN, C. C.; OLANDER, G. J.; BIBERSTEIN, E. L.; MORSE, S. M. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*. v. 47, n. 5, p. 1116 - 1119, 1986.
- 2 - COSTA FILHO, G. A. Diagnóstico precoce da linfadenite caseosa de caprinos através da intradermo-reação. *Anais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife*. n. 2/3, p. 161 - 170, 1977/78.
- 3 - HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*. v. 12, n. 6, p. 1439 - 1449, 1975.
- 4 - LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J. Avaliação da sensibilidade alérgica da infecção por *Corynebacterium ovis* em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19, Belém. Anais. Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1984. p. 120.
- 5 - LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J. COSTA, S. G. Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.7, n. 2, p. 27 - 32, 1987.