

## MONITORAMENTO SOROLÓGICO E ALÉRGICO DA INFECÇÃO POR *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAPRINOS<sup>1</sup>

CHARLOTTE H. LANGENEGGER<sup>2</sup> e JEROME LANGENEGGER<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Langenegger C.H. & Langenegger J. 1991. [Serologic and allergic monitoring of experimental infections in goats by *Corynebacterium pseudotuberculosis*.] Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(1/2):1-7. Embrapa-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851, Brazil.

The six month serologic and allergic monitoring of 26 experimentally infected goats, by intradermic inoculation of 5, 20 and 100 *Corynebacterium pseudotuberculosis* cells, showed the development of both humoral and cellular immune responses at the same time. Only one goat did not develop antibodies, but showed a strong allergic reaction, during 22 weeks post-infection. The antibodies, investigated by the synergistic hemolysis inhibition test (Knight 1978), were first detected at the 3rd week and were most elevated at the 7th week post-infection. In 8 animals the antitoxins were persistent until the 29th week; in 7 animals the antibodies could not be detected between the 12th and the 24th week and in other 9 goats between the 5th and 8th week post-infection. Three animals did not show antibodies in any phase after the infection. The allergic reaction, evaluated by the lymphadenization test (Langenegger et al. 1987) in six-week intervals, showed the highest value between the 4th and the 6th week post-infection and then decreased slowly, following generally the antibody level. One third of the infected goats lost the antitoxin titre and the allergic reaction at the 9th and 10th week, having selfcures. A gradual decrease of the antitoxins titre and the allergic sensitization was observed until the total disappearance in some goats with chronic lymphnode abscesses which did not ulcerate, despite live *C. pseudotuberculosis* still being in the lesion.

**INDEX TERMS:** Caseous lymphadenitis, goats, serologic and allergic monitoring.

**SINOPSE.**- O monitoramento sorológico e alérgico de 26 caprinos infectados experimentalmente por inoculação intradérmica de 5, 20 e 100 bactérias de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, durante 6 meses, revelou que as respostas imunológicas humoral e celular desenvolveram-se paralelamente, exceto em um animal no qual não foram detectadas antitoxinas, porém forte reação alérgica até a 22ª semana pós-infecção. A pesquisa de antitoxinas feita através da técnica da Inibição da Hemólise Sinérgica (Knight 1978), revelou a presença de anticorpos a partir da 3ª e atingiu maior concentração na 7ª semana pós-infecção. Em 8 animais a presença destas persistiu até a 29ª semana; em 7 desapareceu entre a 12ª e 24ª e em 9 entre a 5ª e 8ª semana. Três animais não reagiram com título igual ou superior à diluição 1:20. A linfadenização (Langenegger et al. 1987), feita em intervalos de 6 semanas, revelou reações maiores entre a 4ª e 6ª semana pós-infecção. Depois a sensibilidade alérgica decrescia, pouco a pouco, acompanhando grosseiramente o declínio do nível das antitoxinas. Em um terço dos animais houve autocuras a julgar pela regressão total das antitoxinas e perda da sensibilidade alérgica a partir da 9ª e 10ª semana pós-infecção. Em alguns caprinos cujas lesões gan-

gionares se tornavam crônicas sem ulcerar, observou-se também progressiva regressão, tanto das antitoxinas quanto da reação alérgica, até o seu desaparecimento, apesar da presença de *C. pseudotuberculosis* na lesão.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Linfadenite caseosa, caprinos, monitoramento sorológico e alérgico.

### INTRODUÇÃO

O pouco conhecimento sobre a patogenia da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* dificultou, por muito tempo, a correta interpretação dos resultados das provas sorológicas e alérgicas no diagnóstico da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. Isto, por sua vez, estimulou a busca de várias novas técnicas de diagnóstico laboratorial, a partir da década de 1940.

Entre os testes sorológicos, visando detectar a presença de antitoxinas no soro de animais infectados, foi utilizada a soro-neutralização através do teste em animais. Carne (1940) fez uso do teste cutâneo em ovinos cuja reação local, provocada pela inoculação de toxina de *C. pseudotuberculosis*, era neutralizada caso houvesse antitoxinas no soro a ser testado. Doty et al. (1964) desenvolveram o teste da inibição da necrose em coelho e Zaki

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 6 de abril de 1989.

Trabalho desenvolvido com recursos financeiros do Programa de Biotecnologia da Finep através do convênio com a Embrapa.

<sup>2</sup> Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal (UAPNPSA), Embrapa, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851.

& Abdel-Hamid (1974) mostraram a viabilidade do teste de proteção do camundongo.

Entre as primeiras provas laboratoriais *in vitro* consta a soro-aglutinação ensaiada por Cameron & McOmie (1940) e que posteriormente foi aperfeiçoada por Awad (1960), Kestintepe (1976), Burrell (1978), Shigidi (1979) e Lund et al. (1982).

Paralelamente foram utilizadas e adaptadas várias outras técnicas de diagnóstico. Shigidi (1974), Burrell (1980b) e Nain et al. (1984) procuraram adaptar o teste da imunodifusão em gel; Shigidi (1978, 1979) utilizou o teste da hemaglutinação indireta (passiva) e a fixação de complemento e Burrell (1980a) ensaiou o teste da inibição da hemólise em tubo.

Por outro lado, surgiram algumas técnicas originais. Zaki (1968), baseando-se em pesquisas anteriores nas quais fora demonstrado que a toxina de *C. pseudotuberculosis* inibia o efeito hemolizante da beta-lisina estafilocócica, desenvolveu o teste de inibição da anti-beta-lisina para o diagnóstico da linfadenite caseosa. Posteriormente, Knight (1978), baseando-se no efeito sinérgico do filtrado de cultura de *Corynebacterium equi* sobre a hemólise causada pela toxina de *C. pseudotuberculosis*, desenvolveu o teste da inibição da hemólise sinérgica em placas de ágar sangue para o diagnóstico da linfadenite ulcerosa dos eqüinos. Lund et al. (1982), Almeida et al. (1983) e Brown et al. (1986) aplicaram o teste no diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos e ovinos.

Mais recentemente surgiram os trabalhos de Shen et al. (1982), Maki et al. (1985) e Johnson et al. (1987) mostrando o emprego do teste de ELISA no diagnóstico da linfadenite caseosa.

Por sua vez, a imunidade mediada por células foi tentada no diagnóstico alérgico da linfadenite caseosa desde a década de 1930 por Cassamagnaghi (1931), Carne (1932), Cameron & McOmie (1940) e Farid & Mahmod (1960/61) utilizando-se de alérgenos elaborados a base de filtrados de culturas de *C. pseudotuberculosis*. Costa Filho (1977/78) ensaiou um teste alérgico em caprinos portadores de lesões da linfadenite caseosa com uma sensitição preparada com suspensão de cultura bacteriana fenolada de *C. pseudo-tuberculosis* e de *C. pyogenes*. Renshaw et al. (1979) e Brown et al. (1985) elaboraram um alérgeno a partir de bactérias desintegradas por sonicação. Langenegger et al. (1987) prepararam uma sensitição com proteína hidrossolúvel extraída de bactérias lavadas de *C. pseudotuberculosis*.

A avaliação comparativa de técnicas de diagnóstico revelou resultados pouco conclusivos. Hamid & Zaki (1973) observaram que o teste da inibição da anti-beta-hemolisina estafilocócica e o teste da proteção do camundongo deram resultados muito semelhantes, mas foram realizados em apenas 5 cabras experimentalmente infectadas. Shigidi (1978, 1979) verificou que o teste de anti-beta-hemolisina estafilocócica era menos sensível do que a hemaglutinação indireta. Obteve ainda resultados discordantes entre os testes de soro-aglutinação, fixação de

complemento e difusão em gel realizados no mesmo grupo de animais. Burrell (1980b, 1981) comparou os testes da inibição da hemólise em tubo com a difusão em gel, revelando bons resultados. Lund et al. (1982) utilizando-se da soro-aglutinação e da inibição da hemólise sinérgica obteve alta correlação no resultado dos dois testes. Maki et al. (1985) ensaiando o teste de ELISA comparou-o com o da inibição da anti-beta-hemolisina estafilocócica e verificou que o teste de ELISA foi ligeiramente mais sensível.

O monitoramento sorológico da infecção experimental com *C. pseudotuberculosis* realizado por Hamid & Zaki (1973) em 5 cabras com teste da inibição da anti-beta-hemolisina revelou a presença de anticorpos a partir da 5ª semana, permanecendo com altos títulos até a 22ª. No teste da proteção do camundongo a presença de anticorpos, neutralizando a toxina já foi observada na 4ª, mantendo-se também até a 22ª semana pós-infecção. Shigidi (1979) testando paralelamente 5 técnicas com o soro de 9 ovinos infectados por escarificação com *C. pseudotuberculosis* observou que na soro-aglutinação 8 dos 9 animais apresentaram aglutininas da 3ª a 7ª semana e destes 4 continuaram reagindo até a 18ª semana. Um animal nunca reagiu. No teste da fixação de complemento a resposta imunológica foi a mais precoce mas também a mais efêmera, ou seja a partir da 1ª até a 8ª semana. Três dos 9 animais não reagiram. Na prova da imunodifusão em gel, 7 ovinos reagiram entre a 7ª e a 13ª semana e 3 destes mantiveram a reação até a 27ª semana. Neste experimento 2 dos 3 ovinos testemunhos apresentaram reações inespecíficas entre a 5ª e a 27ª semana. No teste da inibição da anti-beta-hemolisina apenas 3 dos 9 soros revelaram a presença de anticorpos entre a 9ª e a 20ª semana. No teste da hemaglutinação indireta, reagiram 6 dos 9 animais, dos quais 3 iniciaram na 4ª semana e os outros 3 passaram a reagir após a 12ª semana em diante. Cinco destes animais permaneceram reagentes até a 27ª semana pós-infecção.

Não houve registro de monitoramento alérgico em caprinos ou ovinos infectados por *C. pseudotuberculosis*.

Considerando-se que poucos testes sorológicos e alérgicos para o diagnóstico da linfadenite caseosa dos caprinos e ovinos foram criteriosamente avaliados, julgou-se oportuno monitorar comparativamente a resposta imunológica de caprinos infectados experimentalmente com pequeno número de *C. pseudotuberculosis* através dos testes da inibição de hemólise sinérgica (Knight 1978) e o teste alérgico com a linfadenina (Langenegger et al. 1987).

## MATERIAL E MÉTODOS

O monitoramento sorológico e alérgico foi realizado em 26 caprinos experimentalmente infectados com 5, 20 e 100 bactérias de *C. pseudotuberculosis*<sup>3</sup>, por via intradérmica, na fossa lombar,

<sup>3</sup> Amostra recentemente isolada de abscesso de caprino.

próximo ao linfonodo pré-femural, cuja evolução assemelhou-se a da infecção natural (Langenegger & Langenegger 1988).

Os caprinos foram infectados em épocas diferentes e mantidos em grupos de 6, 8 e 12 animais, em piquetes anteriormente livres da linfadenite caseosa.

O acompanhamento sorológico foi feito pelo teste da inibição da hemólise sinérgica (Knight 1978) para a pesquisa de antitoxinas. Foram colhidas amostras de sangue, semanalmente até a 13ª semana e depois com 2 ou 3 semanas de intervalo até a 29ª pós-infecção.

A monitoração da imunidade mediada por células foi realizada de 6 em 6 semanas, iniciando-se os testes alérgicos entre a 4ª e a 6ª semana após a infecção. Foi utilizada a linfadenização descrita por Langenegger et al. (1987).

*Descrição do teste da inibição da hemólise sinérgica*

O teste foi realizado em placas de Petri de 20 x 200mm contendo ágar sangue de bovino, cujas hemácias foram previamente sensibilizadas com filtrado de *C. equi*<sup>4</sup>. Sobre o meio de cultura colocam-se os discos de papel de filtro embebidos em diluições de soro suspeito misturado com a toxina de *C. pseudotuberculosis* titulada. A presença de antitoxinas no soro a testar será evidenciada pela inibição da hemólise no meio de cultura. No diagnóstico de rotina utilizou-se as diluições de soro de 1:20 a 1:1280.

*Preparo de filtrado de C. equi.* Foi cultivada a amostra de *C. equi* em meio de caldo-coração-cérebro, a 37° C, durante 5 dias. A cultura assim obtida foi centrifugada a 3.000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante, após passagem por milipore de 0,22 µm, constituiu-se no filtrado sensibilizante pronto para o uso.

*Sensibilização das hemácias com filtrado de C. equi.* Glóbulos vermelhos de bovino foram lavados 3 vezes em salina e depois reconstituído ao volume original com a mesma solução. Ao ágar fundido e mantido a 48° C acrescentando-se 20% do filtrado da cultrua de *C. equi* e, após homogeneização, adicionou-se 7% das hemácias lavadas que foram bem misturadas no ágar. Processou-se assim o contacto das hemácias do meio com o filtrado sensibilizante.

*Produção e titulação da toxina de C. pseudotuberculosis.* Foi utilizada a amostra nº 303 de *C. pseudotuberculosis* cultivada em meio de caldo cérebro-coração, a 37° C, durante 3 dias, sendo agitada duas vezes por dia. Após centrifugação da cultura a 3.000 rpm, filtrou-se o sobrenadante em milipore de 0,22 µm e acrescentou-se mertiolato em concentração final de 1:10.000. A toxina contida no filtrado foi titulada, através de diluições desta em

de hemólise variáveis com a concentração da toxina. Foi considerado como adequado para o teste a diluição que formou um halo entre 1 e 2 mm. A toxina concentrada pode ser mantida na geladeira durante 6 meses.

*Descrição do teste da linfadenização*

Foi utilizada como alérgeno a "linfadenina" contendo 0,25 mg/ml de proteína hidrossolúvel (Langenegger et al. 1987), em dose de 0,1 ml. A linfadenização foi realizada por via i.d., na região do omoplata, em área previamente depilada de cerca de 4 x 4 cm. Após a mensuração da espessura da dobra da pele com cutímetro<sup>5</sup> o alérgeno foi inoculado no centro da área depilada com seringa<sup>6</sup>. A leitura foi feita 48 horas após com nova mensuração da pele e avaliação do edema e dor local. Ausência de reação ou aumento da espessura da dobra da pele (AEDP) até 1 mm era considerado negativo; reações com AEDP entre 1 a 1,4 mm eram consideradas suspeitas e reações com AEDP iguais ou superiores a 1,5 mm foram consideradas como positivas.

RESULTADOS

O monitoramento sorológico através da pesquisa semanal de antitoxinas pelo teste da Inibição da Hemólise Sinérgica (IHS) em 24 caprinos infectados experimentalmente por via intradérmica com 5, 20 e 100 germes de *C. pseudotuberculosis* revelou que as primeiras reações positivas (29,1%), com títulos variando de 1:20 a 1:160, manifestaram-se na 3ª semana pós-infecção e que na 7ª semana ocorreram os níveis mais altos de antitoxinas, envolvendo 91,6% dos animais, com títulos de 1:20 a 1:1280. Os níveis e persistência das antitoxinas variaram muito. Um grupo de 8 caprinos manteve altos níveis de antitoxinas por mais de 29 semanas variando os títulos máximos de 1:80 a 1:1280. Outro grupo de 7 animais que apresentaram títulos máximos entre 1:80 e 1:160, deixaram de reagir entre a 12ª e 24ª semana, e, um 3º grupo de animais, infectado nas mesmas condições dos anteriores, apresentou anticorpos com títulos muito baixos e apenas transitariamente, nas primeiras 5 e 8 semanas, conforme mostram os Quadros 1, 2 e 3. A resposta sorológica ao teste da IHS, do conjunto de todos os animais infectados e dos 3 grupos, separadamente, está registrada graficamente na Fig. 1.

Quadro 1. Resposta sorológica de 8 caprinos mostrando altos e persistentes níveis de antitoxinas no sangue, avaliados pelo teste da IHS

Caprino nº	Semana após infecção experimental																		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	19	22	24	26	29
21 <sup>a</sup>	0	80	160	320	640	320	160	160	160	160	160	160	160	80a	80a	80	80	40	40
23	0	0	40	160	160	320	160	80	80	80	80	80	20	40	40	20	40	40	40
26	0	0	20	40	40	80	80	80	160	160	80	80	160	180	80	80	160	80	160
27	0	80	40	80	160	160	320	320	320	320	320	160	160	640	1280	1280	1280	1280	1280
30 <sup>a</sup>	0	20	20	160	160	320	160	160	160	160	1280	1280	1280	640	640	160a	160a	160	160
31	0	0	0	80	1280	640	640	320	320	160	160	80	160	40	80	80	80	80	80
CP	0	0	0	320	320	1280	1280	320	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160
04	0	0	0	20	20	40	40	40	80	80	80	40	20	20	20	40	80	80	40
Média	0	22,5	35,0	147,5	347,5	395,0	355,0	185,0	180,0	160,0	165,0	255,0	265,0	222,5	298,7	242,5	252,5	230,3	242,5

<sup>a</sup> Abscesso no linfonodo.

série em placas de Plexi-Glass. Por meio de discos embebidos em cada diluição e coocados sobre o ágar-sangue formaram-se halos

<sup>4</sup> Amostra isolada de material de diagnóstico.

<sup>5</sup> Federkutimeter (Cutímetro de Mola) H. Hauptner (Catálogo nº 33865). Endereço: Kuller Str. 38144, D-565 Solingen, RFA.

<sup>6</sup> "Syntena" - Ampullen-Tuberkulinspritze (Seringa de tuberculina para carpule) H. Hauptner (Catálogo nº 33890).

Quadro 2. Grupo de caprinos com títulos médios de antitoxinas que deixaram de reagir entre a 12ª e a 24ª semana ao teste de IHS

Caprino nº	Semanas após infecção experimental																		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	19	22	24	26	29
396a	0	0	0	0	0	20	80	80	160	160	160	160	160	0a	0	40	0	0	0
369	0	0	0	20	20	20	20	40	20	20	40	40	80	80	40	40	40	0	0
385	0	160	80	160	80	160	160	80	80	80	80	40	80	20	20	40	0	0	
370a	0	80	40	40	40	40	20	40	20	20a	0a	0	0	0	0	0	0	0	
022	0	0	0	20	20	160	80	40	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
010a	0	0	20	20	20	20	20	20	20	160	20	0	0	0a	0	0	0	0	
003a	0	0	0	0	20	20	40	40	80	80	40	0	0	0a	0	0	0	0	
Média	0	34,2	20,0	37,1	28,5	62,8	60,0	48,5	60,0	77,1	48,5	34,2	45,7	14,2	8,5	14,2	11,4	0,0	0,0

a Abscesso no linfonodo.

Quadro 3. Grupo de animais infectados que apresentaram apenas pequena e transitória resposta sorológica

Caprino nº	Semanas após infecção experimental																		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	19	22	24	26	29
367	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
371	0	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
388	0	0	20	20	40	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
025a	0	0	0	20	40	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0a	0a	0	0	0
029	0	20	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CB	0	0	0	0	20	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
366a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0a	0a	0	0	0	0	0	0	0	0
006	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
007	0	0	0	0	0	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0	4,4	6,6	8,8	13,3	15,5	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

a Abscesso no linfonodo.

O monitoramento alérgico através do teste intradérmico com a linfadenina descrita por Langenegger et al. (1987) realizado paralelamente nos mesmos animais, porém com intervalos de 6 semanas, acompanhou grosseiramente o resultado do teste de IHS.

Face ao pequeno número de animais em experimentação não pode ser determinado o início do aparecimento

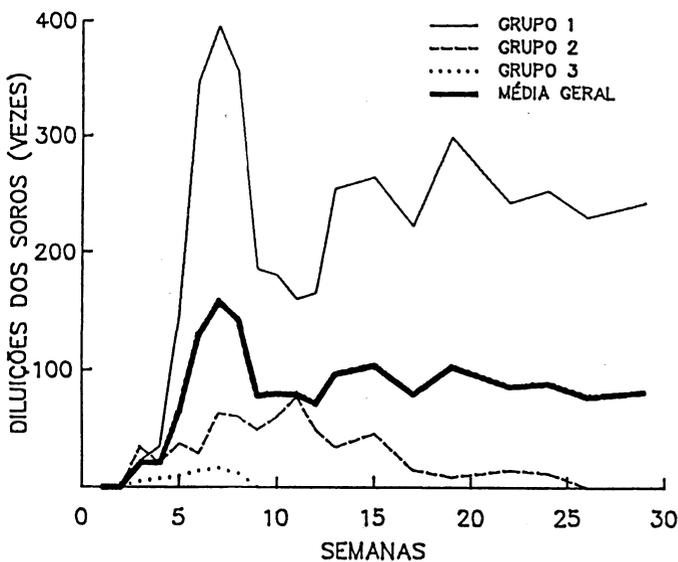


Fig. 1. Monitoramento sorológico pelo teste IHS, mostrando a média geral da resposta imunológica dos 24 caprinos infectados e a média de cada um dos três grupos.

da reação alérgica. Os testes realizados na 4ª e 6ª semana pós-infecção mostraram que neste período houve maior sensibilização alérgica, antecedendo um pouco do pique do teste sorológico que ocorreu na 7ª semana. A partir da 10ª e 12ª semana a reação alérgica decresceu acentuadamente, mas mantendo-se positiva (reações acima de 1,5 mm) até a 22ª e 24ª semana no grupo dos 8 caprinos, até a 16ª e 18ª no segundo grupo, enquanto no 3º apenas 3 dos 9 caprinos ainda reagiram positivamente na 10ª e 12ª semana. Os Quadros 4, 5 e 6 ilustram estes achados. Na Fig. 2 estão apresentados graficamente a reação alérgica dos 24 caprinos e dos 3 grupos que entre si tiveram, como no teste de IHS, comportamento distinto. Início, pico, título máximo e final da resposta imunológica estão resumidos no Quadro 7.

Quadro 4. Resposta ao teste alérgico do grupo de caprinos com altos e persistentes títulos sorológicos

Caprino nº	Período em semanas				
	4-6 (mm)	10-12 (mm)	6-18 (mm)	22-24 (mm)	28-30 (mm)
021a	7,0	5,5	4,0a	4,8	2,0
023	3,2	0,7	1,0	1,8	0,5
026	9,6	2,2	3,4	1,8	1,5
027	2,6	2,5	1,5	2,3	0,2
030a	4,1	3,4	4,0	4,1a	0,5
031	6,0	1,3	1,0	1,1	0,5
CP	8,3	2,4	2,5	3,1	0,3
04	3,6	4,8	4,5	2,0	2,6
Média	5,5	2,8	2,7	2,5	1,0

a Abscesso no linfonodo.

Quadro 5. Resposta ao teste alérgico do grupo de caprinos com títulos sorológicos médios

Caprino nº	Período em semanas				
	4-6 (mm)	10-12 (mm)	6-18 (mm)	22-24 (mm)	28-30 (mm)
396a	9,0	6,2	3,3a	2,3	2,5
369	6,0	3,4	3,0	2,5	-
385	10,0	3,4	1,3	0,5	-
370a	7,3	1,2a	0,6	2,0	2,1
022	2,8	0,8	3,1	2,9	1,3
010a	7,9	4,0	1,9a	-	-
003a	7,8	6,3	8,0a	-	-
Média	7,2	3,6	3,0	1,4	0,8

a Abscesso no linfonodo.

Quadro 6. Resposta ao teste alérgico do grupo de caprinos com títulos sorológicos efêmeros

Caprino nº	Período em semanas				
	4-6 (mm)	10-12 (mm)	6-18 (mm)	22-24 (mm)	28-30 (mm)
367	4,0	1,3	0,9	1,0	-
371	2,0	1,0	0,4	0,3	-
388	6,0	0,7	0,2	0,0	-
025a	4,0	1,4	1,0	1,6a	0,5
029	2,5	0,4	0,8	0,7	1,3
CB	2,7	1,8	2,2	2,1	0,8
366a	2,9	5,3a	3,5	3,0	3,0
006	2,0	1,2	1,0	-	-
007	3,0	1,9	1,8	1,8	2,4
Média	3,2	1,6	1,3	1,1	0,8

a Abscesso no linfonodo.

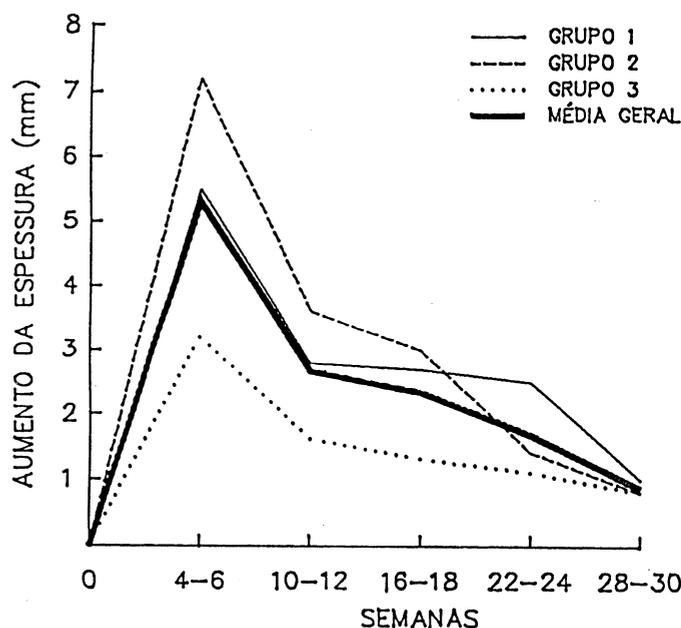


Fig. 2. Monitoramento alérgico pelo teste da linfadenização dos mesmos animais e dos mesmos grupos. As reações alérgicas são mais homogêneas do que as sorológicas.

Em 4 dos 8 casos de infecção que evoluíram para a forma clínica, já não havia mais a presença de antitoxinas no período em que os abscessos ulceraram (n<sup>os</sup> 370, 010, 003 e 025). Desconhece-se o mecanismo que provocaria esta queda e desaparecimento do nível de antitoxinas no

Quadro 7. Início, pico e fim da resposta imunológica avaliado pelo IHS e pelo teste alérgico

Caprino nº	Nível de antitoxina				Reação alérgica			
	Início	Pico	Título <sup>a</sup>	Final	Início <sup>b</sup>	Pico	AEDP (mm) <sup>a</sup>	Final
021	3 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup>	1:640	29 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	7,0	29 <sup>c</sup>
023	4	7	1:320	29	5	5	3,2	22
026	4	10	1:60	29	5	5	9,6	29
027	3	22	1:1280	29	5	5	2,6	22
030	3	12	1:1280	29	5	5	4,1	29
031	5	6	1:1280	29	5	5	6,0	5
CP	5	7	1:1280	29	5	5	8,3	22
004	5	10	1:80	29	5	10	4,8	29
396	7	11	1:160	22	6	6	9,6	28
369	5	15	1:80	24	5	5	6,0	24
385	3	3	1:160	24	5	5	10,0	11
370	3	3	1:180	11	5	5	7,3	28
022	5	7	1:160	11	5	16	3,1	22
010	4	11	1:160	12	5	5	7,9	18
003	6	10	1:80	12	4	16	8,0	16
367	5	5	1:20	5	5	5	4,0	5
371	3	3	1:20	4	5	5	2,0	5
388	4	6	1:40	8	5	5	6,0	5
025	5	6	1:40	8	5	5	4,0	5
029	3	4	1:20	7	5	5	2,5	5
CB	6	7	1:40	8	5	5	2,7	22
006	4	4	1:20	4	5	5	2,0	5
007	7	7	1:20	8	4	4	3,0	29
366	-	-	-	-	6	10	5,3	29
001	-	-	-	-	-	-	-	-
028	-	-	-	-	-	-	-	-

a Títulos e aumentos maiores de cada caprino.

b Não foram feitos testes alérgicos em semanas anteriores.

c Referência em semanas pós-infecção.

soro sanguíneo. A medida que se desenvolve a cápsula fibrosa do abscesso, esta parece impedir a passagem de toxina para o organismo do animal.

O monitoramento alérgico, feito nos mesmos animais porém com intervalos maiores, mostrou uma estreita correlação com a presença de antitoxinas no soro sanguíneo, no entanto, em alguns casos os 2 testes se complementaram. Observou-se que nos caprinos n<sup>os</sup> 023 e 031, cujos títulos de antitoxinas persistiram até a 29<sup>a</sup> semana, a reação alérgica já era negativa na 10<sup>a</sup> (Quadros 1 e 4), ao contrário, o caprino, n<sup>o</sup> 366 manteve-se com reação positiva até a 24<sup>a</sup> semana sem apresentar antitoxinas no sangue (Quadros 3 e 6). Verificou-se ainda que o teste alérgico apresentou reações proporcionalmente maiores no grupo dos animais com os menores títulos de antitoxina (Quadros 3 e 6) e que, por ocasião da maturação dos abscessos dos 8 caprinos que evoluíram para a forma clínica, o teste alérgico ainda apresentava reações positivas em todos os animais, enquanto no sorológico apenas 4 animais ainda reagiram.

## DISCUSSÃO

Baseado nos resultados da infecção experimental de caprinos indenes com pequeno número de *C. pseudotuberculosis*, Langenegger & Langenegger (1988) deduziram que nas infecções naturais apenas cerca de um terço evolue para a doença clínica com abscedações de linfonodos e que nas demais infecções sobrevém a cura espontânea. O monitoramento sorológico e alérgico destes mesmos animais mostrou que a resposta imunológica, avaliada pelo nível de antitoxinas no soro sanguíneo e pela sensibilidade cutânea, coincidiu apenas parcialmente com a evolução clínica da linfadenite caseosa. Assim num grupo de 8 animais que apresentou os maiores e mais persistentes títulos de antitoxinas (Quadro 1) apenas 2, os caprinos n<sup>os</sup> 021 e 030, desenvolveram abscessos. No grupo de 7 animais (Quadro 2) com títulos e persistência média, a infecção evoluiu para doença clínica em 4 destes. Num terceiro grupo de 9 animais (Quadro 3) com apenas pequena e fugaz presença de antitoxinas houve também dois caprinos, os de n<sup>os</sup> 025 e 366 que apresentaram abscessos. O caprino n<sup>o</sup> 366 não revelou antitoxina em nenhuma fase da infecção, no entanto, apresentou reação alérgica positiva até a 24<sup>a</sup> semana. Observou-se também que os níveis mais altos de antitoxinas no sangue sempre antecederam em muito a maturação dos abscessos.

Diante deste comportamento imunológico avaliado pelas antitoxinas e reações alérgicas desenvolvidas no decurso da infecção experimental concluiu-se que os testes de IHS e da linfadenização, separadamente, permitem detectar, precocemente, a infecção por *C. pseudotuberculosis*, mas que os mesmos complementam-se mais satisfatoriamente no reconhecimento de animais com infecções, atingindo alto índice de sensibilidade e especificidade.

Como em apenas um terço das infecções por *C. pseudotuberculosis* houve evolução para a forma clínica da

linfadenite caseosa, a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico não podem ser avaliados em função da presença ou não de lesões clínicas, pois como também demonstrou o monitoramento sorológico e alérgico houve, simultaneamente, respostas imunológicas humoral e mediada por células na fase pré-clínica e ainda, durante períodos variáveis, houve níveis de antitoxinas e sensibilidade alérgica em animais que, pouco a pouco, apresentaram auto-curas sem passar pela fase clínica de abscedação de linfonodos. O monitoramento mostrou ainda ter havido variações, às vezes bem acentuadas, destas respostas imunitárias de um animal para outro. Esta situação permitiu concluir que o uso do IHS e o teste da linfadenização se complementaram e obtiveram assim um alto nível de sensibilidade e especificidade diagnóstica.

O uso dos dois testes individualmente ou combinados, tem-se mostrado muito práticos na vigilância sanitária de rebanhos indenes e na separação dos animais sadios dos infectados em rebanhos com linfadenite caseosa. No entanto, os mesmos testes e, presumivelmente, quaisquer outros, tem limitações, pois não permitem separar os animais reagentes cujas infecções venham evoluir para a forma clínica das que passam para a autocura, a não ser pelo monitoramento por cerca de 6 meses.

Em rebanhos infectados a situação se torna ainda mais complexa se não forem separados os animais portadores de abscessos externos, clinicamente evidentes, pois com a rotura destes ocorrem reinfeções em diversas épocas, o que força o prolongamento do monitoramento por muito tempo, além dos 6 meses.

Diante disso, no saneamento de um rebanho torna-se imperioso separar e isolar sistematicamente os animais portadores de abscessos em linfonodos externos através do exame clínico semanal, pois a rotura de um linfonodo reativa a infecção no rebanho e conseqüentemente a resposta imunitária.

*Agradecimentos.* - Os autores querem registrar seus agradecimentos ao Técnico de Laboratório Sr. Orlandino José Gregório, ao Laboratorista III Sr. José Enéias Barbosa e ao Laboratorista I Sr. Marildo de Azevedo pela efetiva e dedicada colaboração técnica prestada na realização da presente pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- Almeida M.C., Sawyer M. & Sawyer J. 1983. Utilização do teste de inibição da hemólise sinérgica na pesquisa de antitoxina contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. Congr. Lat. Am. Microbiol. 9:212.
- Awad F.J. 1960. Serological investigation of pseudotuberculosis in sheep. I. Agglutination test. Am. J. Vet. Res. 81:251-253.
- Brown C.C., Olander H.J., Biberstein E.L. & Moreno D. 1985. Serologic response and lesion produced in goats experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* of caprine and equine origin. Am. J. Vet. Res. 46:2322-2326.
- Brown C.C., Olander H.J., Zometa C. & Alves S.F. 1986. Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. Am. J. Vet. Res. 47:1461-1463.
- Burrell D.H. 1978. Non-specific agglutination of *C. ovis* by precolostral and young lamb sera. Res. Vet. Sci. 25:373-375.
- Burrell D.H. 1980a. A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. Res. Vet. Sci. 28:190-194.

- Burrell D.H. 1980b. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *C. ovis* antitoxin. Res. Vet. Sci. 28:234-237.
- Burrell D.H. 1981. Caseous lymphadenitis in goats. Aust. Vet. J. 57:105-110.
- Cameron H.S. & McOmie W.A. 1940. The agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. Cornell Vet. 30:41-46.
- Carne H.R. 1932. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents. Aust. Vet. J. 8:42-47.
- Carne H.R. 1940. The toxin of *Corynebacterium ovis*. J. Path. Bact. 51:199-212.
- Cassamagnaghi A. 1931. Le diagnostic de la lympho-adenite caseuse des moutons par l'intradermo-reaction a la Preisz-Nocardine. Bull. Acad. Vet. France 4:330-333.
- Costa Filho G.A. 1977/78. Diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos através da intradermo-reação. Anais Univ. Fed. Rural Pernambuco 2/3:161-170.
- Doty R.B., Dunne H.W., Hokanson J.F. & Reid J.J. 1964. A comparison of toxins produced by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the development of a diagnostic skin test for caseous lymphadenitis of sheep and goats. Amer. J. Vet. Res. 25:1679-1685.
- Farid A. & Mahmoud A.H. 1960/61. Primary trials on the diagnosis of caseous lymphadenitis in Egypt by means of intradermal inoculation of allergic material. Vet. Med. J., Giza, 7:253-258.
- Hamid Y.M.A. & Zaki M.M. 1973. Immune response of goats artificially infected with *C. ovis*. J. Egyptian Vet. Med. Ass. 33:137-140.
- Johnson E.H., Oliveira S.C., Ribeiro O.C. & Silva J.A. 1987. Serological detection of abscesses caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* using the DIG-ELISA. Proc. IV Int. Conf. Goats, Brasilia, p. 1358.
- Kestintepe H. 1976. Stabilization of *Corynebacterium ovis* antigens for serum agglutination test. Firat Univ. Vet. Fak., Dergisi, 3:84-93.
- Knight H.D. 1978. A serologic method for the detection of *C. pseudotuberculosis* infections in horses. Cornell Vet. 68:220-237.
- Langenegger C.H., Langenegger J. & Costa S.G. 1987. Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. Pesq. Vet. Bras. 7(2):27-32.
- Langenegger J. & Langenegger, C.H. 1988. Reprodução da linfadenite caseosa em caprinos com pequeno número de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Pesq. Vet. Bras. 8(1/2):23-26.
- Lund A., Almlid T., Larsen H.J. & Steine T. 1982. Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. Acta Vet. Scand. 23:473-482.
- Maki L.R., Shen S., Bergstrom R.C. & Stetzenbach L.D. 1985. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep using an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 46:212-214.
- Nain S.P.S., Garg D.N. & Chandiramani N.K. 1984. An agar-gel-immunoprecipitation test for the detection of *Corynebacterium ovis* antibodies in sheep and goats sera. Indian J. Comp. Microbiol. Infect. Dis. 5:93-96.
- Renshaw H.W., Graft V.P. & Gates N.L. 1979. Visceral caseous lymphadenitis in the thin ewe syndrome. Isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Moraxella* spp. from internal abscesses in emaciated ewes Am. J. Vet. Res. 40:1110-1114.
- Shen D.T., Jen L.W. & Gorham J.R. 1982. The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Proc. 3rd Int. Conf. Goat Prod. Dis., Tucson, Arizona, p. 445-448.
- Shigidi M.T.A. 1974. Antigenic relationship of various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Bull. Epizootic Dis. Africa 22:263-269.
- Shigidi M.T.A. 1978. An indirect haemagglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Res. Vet. Sci. 24:57-60.
- Shigidi M.T.A. 1979. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Brit. Vet. J. 135:172-177.
- Zaki M.M. 1968. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. Res. Vet. Sci. 9:489-493.
- Zaki M.M. & Abdel-Hamid Y.M. 1974. A comparative study of *in vitro* and *in vivo* tests for caseous lymphadenitis. Res. Vet. Sci. 16:167-170.