

---

# PRODUÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE UM ANTÍGENO PARA UM TESTE ELISA INDIRETO NO DIAGNÓSTICO DA LINFADENITE CASEOSA EM SOROS CAPRINOS

*Production and Standardization of an Antigen Towards an Indirect ELISA  
Test for the Diagnostic Goats Serum of Caseous Lymphadenitis*

---

Juliano Zerbinati

Graduando de Medicina Veterinária UNIME, Lauro de Freitas - BA.  
e-mail: julianozerbinati@hotmail.com

Iuri Coelho Greve

Graduando de Medicina Veterinária UNIME, Lauro de Freitas - BA.  
e-mail: iurigreve@yahoo.com.br

Renata Franco Leal

Graduanda de Medicina Veterinária UNIME, Salvador - BA.  
e-mail: renata\_115@hotmail.com

Luciane Mari Prado Vasconcelos de Amorin

Graduanda de Medicina Veterinária UNIME, Camaçari - BA.  
e-mail: lucianepradoamorin@yahoo.com.br

Diógenis Lima da Silva

Auxiliar de Saúde do Laboratório de Doenças Infecciosas da UNIME/LADI, Salvador - BA.  
e-mail: diogenisls@hotmail.com

Simone Rosa Assis de Aquino Viegas

Médica Veterinária, M. Sc., Prof.<sup>a</sup> da UFBA, Salvador - BA.  
e-mail: simone@ufBA.br

Ana Paula Cardoso Peixoto

Médica Veterinária, M. Sc., Prof.<sup>a</sup> da UFBA, Lauro de Freitas - BA.  
e-mail: paulapeixoto.hosvet@unime.com.br

Renato Carminati

Médico Veterinário, M. Sc., Prof. da UNIME, Lauro de Freitas - BA.  
e-mail: rcarminat@gmail.com

Robson Bahia Cerqueira

Médico Veterinário, M. Sc., Prof. da UNIME, Lauro de Freitas - BA.  
e-mail: robsonba@gmail.com

---

## Resumo

A Linfadenite Caseosa – LC, pseudotuberculose, ou mal do caroço dos caprinos e ovinos, é uma doença infecto-contagiosa crônica, que tem como agente causador o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caracterizada pela formação de abscedação de linfonodos, tanto superficiais quanto internos, o que leva à lesão em órgãos e debilidade progressiva do animal, acarretando em diminuição da produção de leite, perda de peso e condenação de carcaça. No nordeste do Brasil há uma predominância da enfermidade em caprinos, por se tratar de uma região onde a caprinocultura tem sido utilizada como forma de subsistência para pequenos produtores. O objetivo deste trabalho foi produzir um antígeno, denominado de BMD, e padronizar um teste ELISA indireto para o diagnóstico da LC em soros caprinos naturalmente infectados e não infectados. O estudo da sensibilidade e especificidade foi verificado por análise estatística na qual se obteve resultados de 99,8% e 98,0% para o ELISA indireto BMD e sensibilidade, respectivamente, e especificidade de 98,0% para o ELISA indireto, utilizando o antígeno BHI.

**Palavras-chave:** Antígeno; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Caprino; ELISA; padronização.

## Abstract

*Caseous lymphadenitis, pseudotuberculosis or Kernel (pit) disease from goats and ovinos is a chronic infectcontagious disease caused by Corvuebacterium pseudotuberculosis. As a consequence, there was the formation of abscesses in both internal and superficial lymph nodes generating lesions at the organs and progressive animal weakness bringing no decrease in milk production, lost of weight and carcass condensation. At the Northeast of Brazil, occurs a predominance of this disease, just in a region where the raising of goats is used as the way of subsistence for small farmers. The aim of the present research is the production of an antigen, BMD and the standardization of an indirect ELISA test for the diagnostic of caseous lymphadenitis in serum from naturally infected and non infected goats. The sensitivity and specificity results were checked by statistical analysis with the results of 99.8% and 98.0%, for BMD indirect ELISA and sensitivity, respectively, and specificity of 98.0% for ELISA using the BHI antigen.*

**Keywords:** Antigen; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Goats; ELISA indirect.

## INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa, pseudotuberculosis, ou mal do caroço dos caprinos e ovinos é uma enfermidade causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, de acordo com Nozaki, Faria e Machado (2000), caracterizada pelo comprometimento de linfonodos superficiais ou profundos com material necrótico de cor esbranquiçada, segundo Ayers (1977), e lesões em vísceras, conforme Cameron e Minnar (1969). Várias tentativas têm sido realizadas no sentido de elaboração de uma vacina contra a linfadenite caseosa que induza significativa imunoproteção. Contudo, os resultados têm sido pouco consistentes atribuídos a antígenos como a bactéria inteira, viva ou morta, parede celular e o toxóide obtidos a partir da exotoxina (CAMERON; FULS, 1973). Derksen et al. (2000) relatam que os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) apresentam boa sensibilidade para a detecção da infecção em caprinos e ovinos por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. O objetivo deste trabalho foi produzir um antígeno denominado de BMD e padronizar um teste ELISA indireto para o diagnóstico da linfadenite caseosa, com a utilização de soros caprinos de animais naturalmente infectados e não infectados, avaliando a sensibilidade e especificidade frente a outro antígeno denominado de BHI.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de soro, bem como material caseoso, de caprinos acometidos ou não pela linfadenite caseosa. As amostras foram coletadas de 60 caprinos, SRD, idades variadas e provenientes de uma região endêmica do sertão da Bahia. A coleta foi realizada em 30 caprinos com granuloma e 30 caprinos sem granuloma e sem histórico clínico da doença.

### ELISA indireto

#### Preparação do antígeno BMD

Foi utilizada uma linhagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* fornecida pelo laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia, denominada de T1. O cultivo da cepa em caldo BHI foi utilizado para causar expansão em 200 ml de caldo BHI, colocado em estufa a 37°C, durante 48 horas.

Após esse período, o cultivo foi analisado quanto à sua pureza, aliquotado no fluxo laminar em tubos de ensaio de 10 ml e centrifugado durante 30 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi eliminado e a massa celular foi ressuspensa em 10 ml de PBS estéril. A suspensão resultante foi agitada e aquecida em banho-maria a 80°C, durante 2 horas, agitando-se em intervalos aproximados de 15 minutos. Após o resfriamento, a suspensão celular foi centrifugada a 4000 rpm, durante 10 minutos, para eliminar as macropartículas e restos celulares. O líquido sobrenadante, que constitui o antígeno, foi recolhido e congelado durante 48 horas à temperatura de -20°C, e os sedimentos foram descartados. O antígeno foi descongelado e centrifugado a 4000 rpm, durante 10 minutos, para eliminar os lipídeos. O sedimento foi eliminado e o sobrenadante congelado novamente, o qual foi dialisado a uma temperatura de 4°C, durante 3 dias, com PBS, sendo a solução trocada a cada 8 horas.

#### Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA i) com antígeno BMD

As placas de poliestireno de fundo chato (marca COSTAR 3590) foram sensibilizadas com 100 ul do antígeno BMD, diluído a 1:100, em tampão carbonato- bicarbonato 0,05M, pH 9,6, incubadas a 4°C, por aproximadamente 18 horas. Após duas lavagens com PBS, contendo 0,1% de tween-20, as placas foram bloqueadas com 200 ul/poço de PBS-T20, contendo 5% de leite desnatado (Molico), durante duas horas. A seguir, foram incubadas com 50 ul/poço dos soros testes diluídos a 1:100 em PBS-T-20, contendo 0,5% de BSA (soro fetal bovino), durante 1 hora. Após 5 lavagens em PBS-T-20, adicionou-se às placas 50 ul de imunoglobulinas de coelho, anti-imunoglobulina de caprino, conjugada à peroxidase (DAKO), diluída a 1:10.000 em PBS-T-20. As placas foram incubadas a 37°C, por 45 minutos e, em seguida, lavadas novamente cinco vezes em PBS-T-20 e incubadas com 50 ul poço da solução reveladora (10 ml de tampão cítrico-fosfato pH 5,1 + ortofenilenodiamina 4 mg + 4 ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), freando a reação com 25 ul do ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA, usando-se filtro de 490 nm de comprimento de luz.

#### Preparação do antígeno BHI

O protocolo de produção deste antígeno foi realizado segundo Carminati et al. (2003), utilizando-se uma linhagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* do laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal da Bahia. O cultivo da cepa em caldo BHI foi utilizado para causar expansão em 200 ml de caldo BHI, colocado em estufa 37°C/48 horas. Após esse período, o cultivo foi analisado quanto à sua pureza, aliquotado no fluxo laminar em tubos de ensaio de 10 ml e centrifugado durante 30 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e o líquido sobrenadante, que constitui o antígeno, foi recolhido e congelado à temperatura de -20°C.

## Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA i) com antígeno BHI

As placas de poliestireno de fundo chato (marca COSTAR 3590) foram sensibilizadas com 100 ul do antígeno BHI, diluído a 1:100, em tampão carbonato bicarbonato 0,05M, pH 9,6, incubadas a 4°C, por 12 horas. Após duas lavagens com PBS (0,1% de tween-20), as placas foram bloqueadas com 200 ul/poço de PBS-T20 (5% de leite desnatado (Molico)), durante duas horas. A seguir, foram incubadas com 50 ul/poço dos soros testes diluídos a 1:100 em PBS-T-20, contendo 0,5% de BSA (Soro Fetal Bovino), durante uma hora. Após 5 lavagens em PBS-T-20, adicionou-se às placas 50 ul de imunoglobulinas de coelho, anti-imunoglobulina de caprino, conjugada à peroxidase (DAKO), diluída a 1:10.000 em PBS-T-20. As placas foram incubadas a 37°C, por 45 minutos e, em seguida, lavada novamente cinco vezes em PBS-T-20 e incubadas com 50 ul/poço da solução reveladora (10 ml de tampão cítrico-fosfato pH 5,1 + ortofenilenodiamina 4 mg + 4 ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), interrompendo a reação com 25 ul de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA, usando-se filtro de 490 nm de comprimento de luz.

## RESULTADOS

Os valores de absorbância obtidos com o teste ELISA indireto, utilizando o antígeno BMD, nas amostras de soros caprinos, que apresentavam sintomatologia clínica para a linfadenite caseosa, variaram aproximadamente entre 0,250 e 1,8. Nas amostras de soros caprinos, que não apresentaram sintomatologia clínica para a doença, utilizando o mesmo antígeno nas amostras positivas, verificaram-se valores de absorbância variáveis, aproximadamente entre 0,1 a 0,3. Esses resultados podem ser observados nas Figuras 1 e 2.

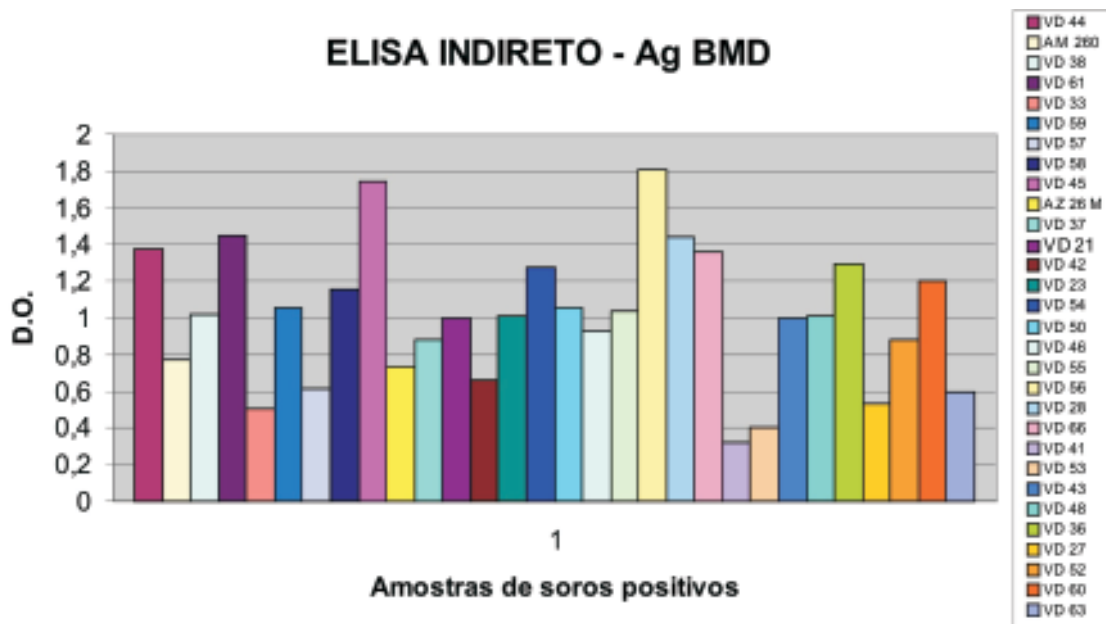


FIGURA 1 - Absorbância de soros de caprinos naturalmente infectados com *C. pseudotuberculosis*  
 Figure 1 - Absorbance of serum goats naturally infected with *C. pseudotuberculosis*

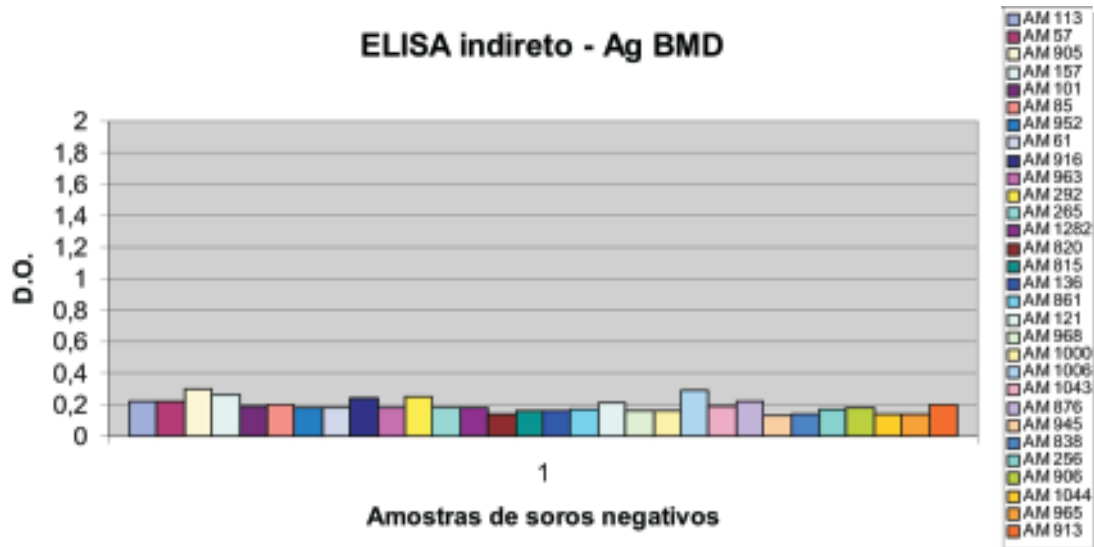


FIGURA 2 - Absorbância de soros de caprinos não infectados com *C. pseudotuberculosis*  
Figure 2 - Absorbance of serum goats not infected with *C. pseudotuberculosis*

Em contrapartida, no teste ELISA indireto, utilizando o antígeno BHI já padronizado e descrito na literatura para comparação com o antígeno BMD preparado no LADI, obtiveram-se valores de D.O. nas amostras de caprinos com sintomatologia clínica para linfadenite caseosa com variação entre 0,3 a 1,7. Os valores da absorbância nas amostras de soros negativos para a doença oscilaram entre 0,1 e 0,3. Resultados como esses comprovam a eficácia dos dois antígenos utilizados para os testes ELISA indireto e podem ser observados nas Figuras 3 e 4.

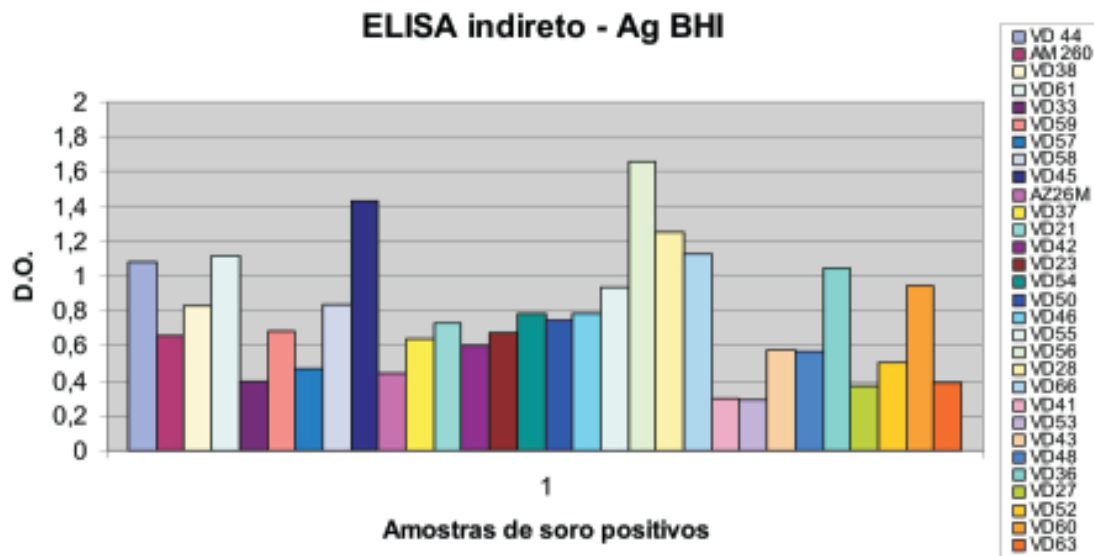


FIGURA 3 - Absorbância de soros de caprinos naturalmente infectados com *C. pseudotuberculosis*  
Figure 3 - Absorbance of serum goats naturally infected with *C. pseudotuberculosis*

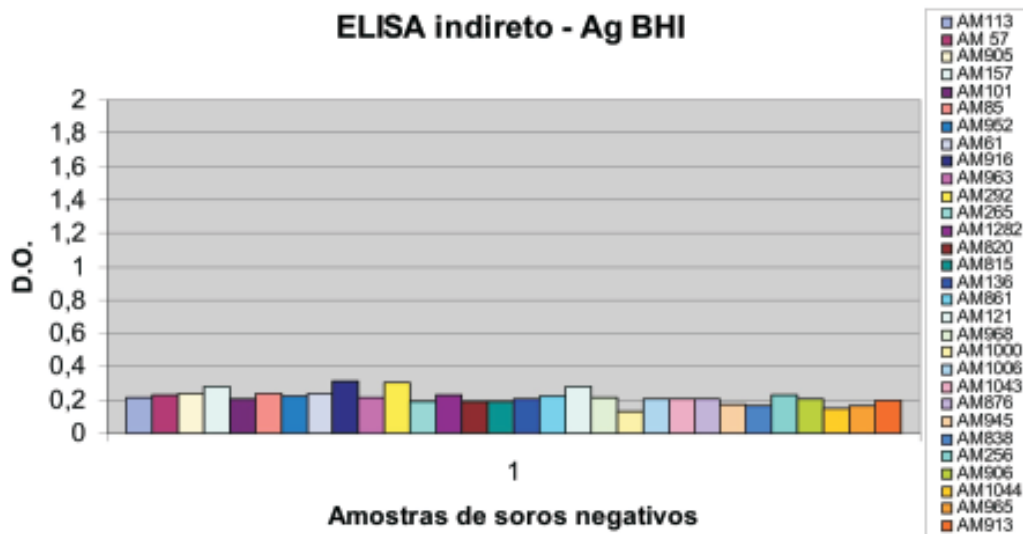


FIGURA 4 - Absorbância de soros de caprinos não infectados com *C. pseudotuberculosis*  
 Figure 4 - Absorbance of serum goats not infected with *C. pseudotuberculosis*

#### Definição dos pontos de corte dos testes ELISA indireto

O *cut-off* foi definido por meio da curva ROC, a qual tem a finalidade de avaliar a sensibilidade em função da especificidade. É importante ressaltar que a região delimitada pela curva do teste ELISA indireto BMD foi mais expressiva, quando comparado ao ELISA indireto com antígeno BHI.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de sensibilidade e especificidade dos testes ELISA, conforme os seus respectivos pontos de corte. Na Tabela 2 podem ser verificados os valores preditivos e negativos de cada um dos testes.

TABELA 1 - Valores de sensibilidade, especificidade e *cut-off*  
 Table 1 - Value of sensitive, specificity and *cut-off*

Sensibilidade/Especificidade	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Cut-off
<b>ELISA</b>			
ELISA BHI	98,0	98,0	0,248
ELISA BMD	99,8	98,0	0,310

TABELA 2 - Valores preditivos de amostras positivas e negativas  
 Table 2 - Prediction values of positive and negative samples

ELISA indireto	Valor Preditivo Amostras Positivas (%)	Valor Preditivo Amostras Negativas (%)
ELISA indireto com antígeno BHI	98	98
ELISA indireto com antígeno BMD	99,8	99



## Comparação entre os testes ELISA indireto

A comparação entre o ELISA indireto com antígeno BMD e o ELISA indireto com antígeno BHI foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson, onde obteve-se um valor de 0,842, conforme a Tabela 3. O índice Kappa, verificado entre os testes ELISA indireto, apresentaram concordância quase perfeita para um valor 0,96, observado na Tabela 4.

TABELA 3 - Valores de Coeficiente de Correlação de Pearson  
*Table 3 - Pearson Correlation coefficient Value*

ELISA indireto	Coeficiente de Pearson
ELISA BHI X ELISA BMD	0,842

TABELA 4 - Valores do Coeficiente de Correlação de Pearson pelo índice Kappa  
*Table 4 - Pearson Correlation Coefficient Value through Kappa index*

ELISA indireto	Coeficiente de Correlação Pearson Através do Índice Kappa
ELISA BHI X ELISA BMD	0,96

## DISCUSSÃO

Autores têm demonstrado que as proteínas encontradas no sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI e reconhecidas por *western blotting* têm peso molecular abaixo de 68 KDa (ELLIS et al., 1991; MUCKLE et al., 1992; BRAITHWAITE et al., 1993). A extração de proteínas ligadas à superfície da célula bacteriana, mediante lavagem com cloreto de sódio, identificaram uma banda de 120 KDa, reconhecida por todos os soros de caprinos e ovinos infectados (MUCKLE et al., 1992). Braithwaite et al. (1993) identificaram que a extração de antígenos ligados à superfície da célula, por meio do uso do detergente SDS, revelou bandas protéicas de 20 a 119 KDa, reconhecidas pelo soro de caprinos infectados. Esses antígenos extraídos da superfície da bactéria foram considerados como antígenos somáticos. No presente trabalho, verificou-se que, apesar de não se realizar a determinação da fração protéica, o antígeno utilizado apresentou uma resposta, diferenciando animais infectados de não infectados.

Andersen et al. (1991) demonstraram que o crescimento de *M. tuberculosis* resulta em liberação de proteínas excretadas no meio, ativamente liberadas, nos primeiros dias da cultura. Posteriormente, são liberadas proteínas secretadas que atravessam a membrana citoplasmática e se localizam externamente à parede celular, sendo liberadas gradualmente durante o crescimento bacteriano. Esses resultados são concordantes com os obtidos neste experimento, acreditando-se que a forma de obtenção do antígeno para *C. pseudotuberculosis* tenha passado pelo mesmo processo. Kaufmann e Hess (1999) sugeriram que antígenos secretados de *M. tuberculosis* seriam mais eficazes que os antígenos somáticos para compor uma vacina e para utilização em testes diagnósticos para estas bactérias.

A sensibilidade e a especificidade são parâmetros fundamentais para a definição de um teste diagnóstico. A sensibilidade pode ser definida como a probabilidade do teste ser positivo, caso o animal esteja doente, enquanto especificidade seria a probabilidade de o teste ser negativo no animal não doente (XU; LOHR; GREINER, 1997).

Segundo Carminati et al. (2003), utilizando como antígeno o secretado de cultura de 48 horas de crescimento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caldo BHI para um teste ELISA indireto desenvolvido e padronizado para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos, obtiveram sensibilidade de 93,5% e 100% de especificidade, mostrando ser um teste capaz de afastar animais que se mostrem falso positivo. Resultados distintos foram obtidos no presente trabalho, onde se obteve sensibilidade de 99,8% e especificidade de 98% para o ELISA indireto com antígeno BMD e sensibilidade e especificidade de 98% para o ELISA com antígeno BHI.

Dercksen et al. (2000), trabalhando com soros caprinos para um teste ELISA indireto do tipo “sanduíche”, no qual utilizou como antígeno a exotoxina da bactéria, obtiveram sensibilidade de 94+3% e especificidade de 98+1%. No presente estudo, verificaram-se resultados discordantes com relação à sensibilidade (maior) e concordante em relação à especificidade, decorrente da forma de obtenção dos antígenos utilizados.

Moura Costa et al. (2002) desenvolveram um meio sintético para possibilitar o crescimento do *Corynebacterium pseudotuberculosis* ausente de proteínas exógenas, permitindo a produção de proteínas secretadas pela bactéria. Esse complexo antigênico foi utilizado para padronização de um teste ELISA indireto no diagnóstico da doença em caprinos e possibilitou detectar sensibilidade de 96,8% e especificidade 98,2%. Os resultados identificados são discordantes dos obtidos no presente experimento, onde se detectou uma sensibilidade de 99,8% e uma especificidade próxima à verificada, de 98% para o ELISA com antígeno BMD.

No presente trabalho, constatou-se que o ELISA com antígeno BMD possui uma capacidade maior de discriminar os grupos infectados do grupo não infectado, concordando com os resultados obtidos por Carminati (2005), que trabalhou com um antígeno denominado de TPP. Verificou-se também uma diferença no teste ELISA BHI entre os grupos infectados e não infectado.

## CONCLUSÕES

A sensibilidade e a especificidade do teste ELISA indireto, utilizando o antígeno BMD, foram de 99,8% e 98,0%, respectivamente, onde a sensibilidade foi maior e a especificidade foi igual, ao comparar com teste ELISA indireto utilizando o antígeno BHI.

Constatou-se que o teste ELISA indireto, utilizando o antígeno BMD, apresenta maior capacidade de discriminação entre os animais com a doença e sem a doença em relação ao teste ELISA indireto, utilizando o antígeno BHI.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, P. et al. Proteins Released from *Mycobacterium tuberculosis* during Growth. **Infectious Immunological**, v. 59, n. 6, p. 1905 -1910, 1991.
- AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a preview of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **JAVMA**, v. 171, n. 12, p. 1251-1254, 1977.
- BRAITHWAITE, C. M. et al. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**. v. 38, p. 59-70, 1993.
- CAMERON, C. M.; MINNAAR, J. L. Immunization of mice against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Veterinary Research Institute, Onderstepoort**, v. 2, n. 36, p. 207-210, 1969.
- CAMERON, C. M.; FULS, W. J. P. Studies on the enhancement of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 40, n. 3, p. 105-114, 1973.



- CARMINATI, R. **Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos**. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.
- CARMINATI, R. et al. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos, **Revista Ciências Médicas Biológicas**. Salvador, v. 2, n. 1, p. 88-93, jan./jun. 2003.
- DERCKSEN, D. P. et al. Comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats, **Veterinary Microbiology**, v. 2, n. 75, p. 167-175, 2000.
- ELLIS, J. A. et al. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology Immunopathological**, v. 1, n. 28, p. 289-301, 1991.
- KAUFMANN, S. H. E.; HESS, J. Impact of intracellular of and antigen display by intracellular bacteria: implication for vaccine development. **Immunology**, v. 65, n. 1, p. 81-84. 1999.
- MOURA COSTA, L. F. et al. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v. 1, n. 3, p. 1-9, 2002.
- MUCKLE, C. A. et al. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 30, p. 47-58, 1992.
- NOZAKI, C. N.; FARIA, M. A. R.; MACHADO, T. M. M. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 187-189, 2000.
- XU, H.; LOHR, J.; GREINER, M. The selection of ELISA cut-off points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis. **Journal Immunology Methods**, v. 208, p. 61-64, 1997.

Recebido em: 27/10/2006

Received in: 10/27/2006

Aprovado em: 30/03/2007

Approved in: 03/30/2007