

ALÉRGENO PARA O DIAGNÓSTICO DA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS¹

CHARLOTTE HUBINGER LANGENEGGER², JEROME LANGENEGGER² e SERGIO GUEDES COSTA²

ABSTRACT. - Langenegger C.H., Langenegger J. & Costa S.G. 1986. [An allergen for the diagnosis of caseous lymphadenitis in goats.] Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(2):27-32. Embrapa-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851, Brazil.

An allergen, designated "lymphadenin" consisting of water-soluble protein, was obtained from washed *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*ovis*) after cultivation of the bacteria for 5 days at 37°C in trypticase soy broth. The protein was precipitated by 4% trichloroacetic acid, after washing by 0,022 M KH_2PO_4 redissolved in 0,066 M Na_2HPO_4 pH 9.0 and preserved by addition of glycerin and phenol at a final concentration of 10.0 and 0.5% respectively, and pH 7.0. For use the "lymphadenin" had been standardized to contain 0.25 mg protein/ml. The effectiveness of "lymphadenin" was first tested in previously sensitized guinea pigs, injecting intradermally 0.1 ml of 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16 dilutions of the allergen into each animal. After 24 hours, local allergic reactions appeared as circular erythematous areas with average diameters of 15.7, 13.1, 9.9 and 7.9 mm respectively. Nonsensitized guinea pigs, used as controls, did not develop any reactions. Intradermal injection of 0.1 ml undiluted standardized "lymphadenin" into the shoulder region of each of 40 goats, clinically affected with Lymphadenitis, gave rise to allergic reactions which reached their maxima 48 hours after application. The increase in the thickness of skin-folds (ITSF) at the side of injection varied from 1.6 to 12.2 mm with a mean of 6.04 ± 2.87 mm. In 40 healthy goats from a herd free of Lymphadenitis the ITSF ranged between 0.0 and 1.5 mm with a mean of 0.57 ± 0.4 mm.

INDEX TERMS: Pseudotuberculosis, Caseous Lymphadenitis, goat, allergen, diagnosis.

SINOPSE.- Foi desenvolvida uma sensitina, designada por "linfadenina" constituída por proteína hidrossolúvel extraída de massa bacteriana lavada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*ovis*), obtida por cultura em caldo de soja triptica, incubada a 37°C, durante 5 dias. A proteína foi precipitada em solução a 4% de ácido tricloro-acético e, após lavagens em solução 0,022 M de KH_2PO_4 , foi redissolvida em solução 0,066 M de Na_2HPO_4 com pH 9,0 e diluída e preservada em tampão glicero-fenica a 10,0 e 0,5% respectivamente e pH 7,0. A "linfadenina" pronta para uso, foi padronizada para a concentração final de 0,25 mg/ml de proteína. A avaliação da eficácia da "linfadenina" foi feita inicialmente em cobaias, previamente sensibilizados, pela inoculação das diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 do alérgeno por via i.d., em doses de 0,1 ml, e que revelaram, após 24 horas, reações alérgicas locais sob forma de halos eritematosos com diâmetros médios de 15,7, 13,1, 9,9 e 7,9 mm, respectivamente. Nos cobaias normais não houve reações dignas de nota. A inoculação i.d. de 0,1 ml da "linfadenina" padronizada, na região da omoplata, em 40 caprinos portadores de lesões de linfadenite caseosa, revelou reações alérgicas locais, com maior intensidade após 48 horas e com aumentos da espessura da dobra da pele (AEDP), variando entre 1,6 a 12,2 mm, com média de $6,04 \pm 2,87$ mm. Em 40 caprinos de

rebanho livre de linfadenite, o AEDP variou de 0 a 1,5 mm, com média de $0,57 \pm 0,40$ mm.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Pseudotuberculose, linfadenite caseosa, caprino, diagnóstico alérgico, sensitina.

INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*ovis*) ocorre em ovinos e caprinos em várias partes do mundo. No Brasil, a doença é particularmente freqüente em caprinos da região nordeste. Estima-se que a maioria dos rebanhos estão infectados e que a prevalência clínica atinge até 30% dos animais (Silva 1972, Costa et al 1973). À medida que se melhora a assistência zootécnica e sanitária aos rebanhos de caprinos, tanto na região nordeste como nas demais, torna-se necessário contar com meios de diagnóstico da infecção, já em sua fase pré-clínica e que sejam de fácil aplicação. Vários testes sorológicos e alérgicos foram e outros ainda estão sendo ensaiados, faltando, contudo, concluir a necessária avaliação crítica e/ou determinar a viabilidade do uso prático, a campo, em nossas condições.

Testes alérgicos foram ensaiados por vários pesquisadores. Cesari (1930), na França, observou que a inoculação de 0,2 ml do filtrado de culturas velhas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (bacilo de Preisz-Nocard) no coxim plantar de cobaias anteriormente infectados com o mesmo germe vivo, provocou uma

¹ Aceito para publicação em 10 de dezembro de 1986.

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

reação de hipersensibilidade local semelhante à reação alérgica da tuberculina em cobaios com tuberculose. O autor designou o alérgeno por Preisznocardina e sugeriu que o teste alérgico poderia ser usado para o diagnóstico da linfadenite caseosa do ovino.

No ano seguinte, Cassamagnaghi (1931), no Uruguai, baseando-se na observação de Cesari (1930), elaborou a Preisznocardina, cultivando o *C. pseudotuberculosis* em caldo de Martin, durante 2 a 3 semanas a 37°C e depois filtrou a cultura em Vela de Chamberland L3. A eficácia do alérgeno foi testada em 14 ovinos infectados experimentalmente, nos quais, após 3 semanas, foi aplicado o alérgeno em doses de 0,1 ml, intradermicamente, na prega ano-caudal. A leitura do teste, feita após 48 e 72 horas, revelou reações locais do tamanho de ovo de pombo em todos os animais, enquanto que 11 ovinos não infectados, não apresentavam reação alérgica. Em outro experimento, utilizando 80 ovinos de abate oriundos de rebanho infectado, 18 animais apresentaram reação alérgica no ponto de inoculação e no exame pós-morte foram encontradas lesões da linfadenite caseosa em cada animal. O autor não faz referência sobre os achados dos ovinos não reagentes.

Na Austrália, Carne (1932) procurou avaliar a sensibilidade e a especificidade do teste alérgico para o diagnóstico da linfadenite caseosa em ovinos. Para tanto, preocupou-se, inicialmente, em obter um alérgeno (pseudotuberculina) seguindo a técnica de elaboração da tuberculina de Koch. Cultivou *C. pseudotuberculosis* em caldo, durante várias semanas e depois esterilizou a cultura em vapor fluente, removendo as bactérias por filtração em papel xarope.

Testou a eficácia do alérgeno em 2 ovinos experimentalmente infectados há 30 dias e em ovinos jovens indenes, aplicando-o, intradermicamente, na prega ano-caudal, em dose de 0,2 ml. O autor testou depois o mesmo alérgeno em 50 ovelhas adultas procedentes de rebanho altamente acometido pela linfadenite caseosa. A leitura feita 48 e 72 horas após inoculação revelou o resultado resumido no Quadro 1.

Neste resultado chamou atenção que nos 25 ovinos não reagentes foram encontradas lesões da linfadenite caseosa em 13 (52%), revelando pouca especificidade do alérgeno, o que motivou o autor a utilizar a filtração da cultura em velas de Chamberland L3, como realizada por Cassamagnaghi (1931). Com a sensitiva assim obtida fez novo teste em mais 50 ovelhas obtendo o resultado demonstrado no Quadro 2.

Neste resultado, dos 19 animais reagentes 5 (26,3%) apresentaram lesões da linfadenite caseosa. Diante destes resultados o autor concluiu que o teste alérgico não havia a necessária eficiência.

Quadro 1. Resultado do teste alérgico

Intensidade da reação ^(a)	Nº de reagentes	Exame pós-morte	
		Com lesões	Sem lesões
+++	3	2	1
++	5	5	-
+	5	4	1
S	12	5	7
-	25	13	12

- (a) +++ = reação local maior do que 3 cm de Ø;
 ++ = entre 1 a 3 cm;
 + = entre 0,5 e 1 cm;
 - = negativo.

Quadro 2. Resultado do teste com alérgeno filtrado em velas Chamberland L3

Intensidade da reação ^(a)	Nº de reagentes	Exame pós-morte	
		Com lesões	Sem lesões
+++	1	-	1
++	13	7	6
+	15	7	8
S	2	1	1
(-)	19	5	14

cia. A elaboração de alérgeno com grande número de amostras de *C. pseudotuberculosis* e o aumento da concentração não melhoraram os resultados, levando o autor a concluir que a resposta imunitária do animal era deficiente e que o teste alérgico para o diagnóstico da linfadenite caseosa, não era adequado.

Nos Estados Unidos, Cameron & McOmie (1940), tentando correlacionar os resultados dos testes da soro-aglutinação e o da reação alérgica no diagnóstico da linfadenite caseosa em ovinos, elaboraram o alérgeno utilizado por Train (1934) no diagnóstico da linfangite ulcerosa do equino, também denominado Preisznocardina, que consistia no cultivo de *C. pseudotuberculosis* em caldo de coração de bovino, durante 34 dias, a 37°C. O sobrenadante da cultura foi reduzido a 1/3 do volume original por evaporação e depois filtrado em Seitz E. K. A sensitina, assim preparada, foi aplicada em dose de 0,2 ml, intradermicamente, no espaço axilar e a leitura feita 72 horas após. Foram utilizadas 45 ovelhas adultas das quais 8 reagiram positivamente e 2 suspeitas porém apenas 4 tinham lesões nos linfonodos externos. Em duas ovelhas portadoras de lesões, o teste alérgico foi negativo. Como os animais não puderam ser sacrificados após o teste, não foi possível avaliar melhor o desempenho da prova alérgica.

No Egito, Farid & Mahmoud (1960/61) utilizaram como sensitina o filtrado esteril de cultura de *C. pseudotuberculosis* em caldo simples com pH 7,4, incubada durante 2 meses e depois morta por autoclavagem a 120°C por 20 minutos. O filtrado foi concentrado à metade do volume por evaporação em banho-maria a 50°C. A sensitina assim obtida foi aplicada intradermicamente em ovinos na região do espaço axilar após depilação e medida a espessura da dobra da pele do local. A leitura, feita a cada 12 horas medindo a espessura da dobra da pele com paquímetro, revelou que às 48 horas a reação alcançou o seu valor máximo, na maioria dos casos. A eficiência da sensitina foi avaliada: a) em 20 ovinos portadores de lesões clínicas de linfadenite caseosa dos quais apenas 1 (5%) não reagiu, 3 (15%) apresentaram diferenças entre 1 e 2 mm, 7 (35%) tiveram reações com 3 mm de diferença e os demais 9 animais revelaram reações superiores com diferenças até 8 mm; b) os animais procedentes de rebanhos negativos não registraram reações, no entanto, os 10 ovinos oriundos de rebanho infectado reagiram em sua totalidade, sendo que 2 (20%) com aumentos da espessura da dobra da pele de 1 e 2 mm, 2 com 3 mm, tendo os demais, reações superiores atingindo mesmo 16 mm de diferença.

Em Pernambuco, Brasil, Costa Filho (1978), pretendendo obter um método de diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos, através da prova alérgica, elaborou uma sensitina a partir da suspensão bacteriana de *C. pseudotuberculosis* e de *C. pyogenes*, fenolizada a 0,5%, contendo 1,2 bilhões de germes por ml. A eficiência do alérgeno foi testada em 5 caprinos portadores da linfadenite caseosa e em 10 animais indenes, através da inoculação da sensitina, por via intradérmica, na dose de 0,1 ml, na

prega ano-caudal e em alguns casos também na pele do abdômen. Em 5 dos 10 caprinos indenes foi aplicada apenas a mesma dose de solução salina fenicada a 0,5%. A leitura da reação, feita às 24, 48 e 72 horas, por meio de paquímetro para avaliar o aumento da espessura da dobra da pele, revelou progressivo crescimento da reação alérgica nos 5 caprinos infectados, com aumento da espessura da dobra da pele entre 6,0 a 9,3 mm. Nos 10 testemunhos não houve reação perceptível. Não foram examinados rebanhos infectados.

Renshaw et al. (1979) ensaiaram um alérgeno obtido por sonicação de bactérias lavadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A massa bacteriana sonificada foi diluída com salina até a densidade ótica correspondente ao tubo nº 5 do nefelômetro de McFarland. Foi acrescido 0,5 g/l de azida sódica e incubada a 37°C durante 12 horas para assegurar a esterilidade.

O alérgeno foi testado em 26 ovinos portadores do síndrome da ovelha magra nos quais foram encontrados alta incidência de abscessos internos causados por *C. pseudotuberculosis*. O resultado revelou reações alérgicas em 67,8% destes animais, mas apenas 10/18 (55,5%) dentre os que tiveram abscessos internos e dos quais foi isolado o agente da linfadenite caseosa.

No Rio de Janeiro, Langenegger & Langenegger (1984) tentaram obter um alérgeno a partir de massa bacteriana de *C. pseudotuberculosis* desintegrada por hidrólise com ácido sulfúrico e a(s) proteína(s) por precipitação com ácido tricloroacético, mas os resultados não foram animadores.

No presente trabalho descreve-se a obtenção de uma sensítina a base de proteína hidrossolúvel, designada por "linfadenina" cuja eficácia foi avaliada em cobaios sensibilizados e caprinos portadores de lesões de linfadenite caseosa, em experimentos pilotos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Técnica de elaboração da "linfadenina"

a) *Cultura estoque*. Foi utilizada a amostra nº 303 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolada de caprino e procedente do Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos (CNPC), em Sobral, CE.

b) *Produção de massa bacteriana*. A semente foi preparada por repique da cultura estoque em tubos de caldo de soja tríplica da Difco e após 24 horas de crescimento, alíquotas de 10 ml da cultura semente eram inoculadas em 400 ml do mesmo meio contido em garrafas de Roux com capacidade de 2 litros. Após incubação por 5 dias a 37°C, a massa bacteriana foi separada do meio por centrifugação a 3.000 rpm e lavada duas vezes com salina.

c) *Extração da proteína solúvel*. A massa bacteriana foi suspensa em água destilada na proporção de 1:5 e mantida sob agitação durante 2 horas para então ser autoclavada a 121°C durante 20 minutos. Em seguida, as bactérias foram separadas por centrifugação da solução contendo a proteína.

d) *Concentração da proteína solúvel*. A proteína contida no sobrenadante foi precipitada pelo ácido tricloroacético. A cada 900 ml da solução colocada em proveta graduada de 1 litro, adicionou-se 100 ml de solução a 40% de ácido tricloroacético, dando a concentração final de 4%. O precipitado foi concentrado por sifonagem após decantação por uma hora e, logo em seguida, por centrifugação, desprezando-se o sobrenadante. Seguiram-se duas lavagens com solução a 1% de ácido tricloroacético e finalmente duas lavagens com solução 0,022 M de KH_2PO_4 por centrifugação.

e) *Determinação da concentração de proteína da "linfadenina"*. A massa de proteína foi dissolvida com solução 0,066 M de Na_2HPO_4 , com pH 9,0 na proporção aproximada de 1 g para 10 ml do dissolvente. A este "concentrado de proteína" adicionou-se a solução preservativa na proporção de 1 parte desta para

Quadro 3. Resultado do teste alérgico com linfadenina com 0,25 mg/ml de proteína em caprinos clinicamente afetados com a linfadenite caseosa

Nº do caprino	Linfonodo com lesão ^(a)	AEDP ^(b) (mm)
58	1 E	9,1
1032	4 D	5,6
1048	1 E	7,7
1104	1 E	12,0
1118	1 D	10,0
1118(c)	1 D	1,6
1206	3 D	9,0
1206(c)	3 D	2,1
1223	1 D	12,0
1250	2 E	4,0
1226	1 D	4,6
1244	1 D	5,5
1256	2 D	8,0
1256(c)	2 D	7,0
1288	1 E	6,5
1289	3 E	4,2
1292	2 E	12,2
1292(c)	2 E	3,0
1296	3 E	6,8
1296(c)	3 E	2,3
1400	2 D	2,5
1414	2 D	4,8
1424	1 D	10,5
1424(c)	1 D	2,5
1497	3 E	5,0
1125	4 E	4,5
1125(c)	4 E	8,3
1129	2 D	6,3
1129(c)	2 D	4,5
732	2 E	3,0
733	3 D	7,2
735	3 D	7,1
736	1 E	4,7
737	3 D	6,8
739	3 D	5,6
741	4 D	7,0
742	1 D	1,7
744	3 D	3,1
745	1 D	5,0
748	3 D	4,9
Total 40	Média 6,04 ± 2,87 mm	

(a) 1 = Linfonodo paratirodiano (D = direito, E = Esquerdo),
2 = Linfonodo submaxilar D e E,
3 = Linfonodo preapular D e E,
4 = Linfonodo precarural D e E.

(b) AEDP = aumento da espessura da dobra da pele.

(c) Teste repetido cerca de seis semanas depois.

Quadro 4. Resultado do teste alérgico com linfadenina diluída (0,12 mg/ml de proteína) em caprinos portadores de lesões da linfadenite caseosa

Nº do caprino	Linfonodo com lesão ^(a)	AEDP ^(b)
1034	1 D	5,2
1105	3 D	3,7
750	1 E	2,5
753	1 D	1,2
753 ^(c)	1 D	1,4
756	1 D	6,8
760	1 E	2,7
1119	1 E	5,1
1126	1 D	6,9
1209	2 D	4,8
1238	3 D	7,0
1254	3 D	6,3
1339	1 D	4,0
80	3 D	9,0
80 ^(c)	3 D	4,3
1114	3 D	6,1
1255	1 D	7,2
1227	2 D	3,7
1248	4 E	3,9
1282	3 E	7,5
1297	3 E	2,4
1327	3 E	2,7
Total 22	Média 4,74 ± 2,14	

(a) 1 = Linfonodo prepatotidiano (D = direito, E = Esquerdo),

2 = Linfonodo submaxilar D e E,

3 = Linfonodo precapular D e E,

4 = Linfonodo precrural D e E.

(b) AEDP = aumento da espessura da dobra da pele.

(c) Teste repetido cerca de seis semanas depois.

5 do concentrado protéico. A solução preservadora compõe-se de 300 ml de glicerina, 15 g de NaCl, 15 g de fenol e 300 ml de tampão fosfatado 0,066 M pH 7,0.

Partindo de uma alíquota deste concentrado protéico preservado, determinou-se a concentração de proteína por ml, com o sistema micro-Kjeldahl. Conhecido o teor de proteína, preparou-se diluições desta para 0,25 mg/ml e 0,12 mg/ml de proteína com o seguinte diluente: 500 ml de tampão fosfatado 0,066 M pH 7,0, 50 ml de glicerina neutra, 2,5 g de NaCl e 2,5 g de fenol. A esterilidade de cada diluição foi assegurada com a filtração em milipore com poros de 0,22 μ m. A "linfadenina" assim elaborada manteve-se estável por um ano, mantida refrigerada à temperatura entre 4 e 8°C.

2. Avaliação da eficiência da "linfadenina" em cabaios

a) *Sensibilização de cabaios.* Foram infectados grupos de 10 animais adultos, albinos, por via s.c., com a cultura nº 303, de *C. pseudotuberculosis*, isoladas de caprinos e mantidas em meio de Loeffler. Cada cultura era semeada em caldo de soja triptica e, após 24 horas de crescimento, inoculada por via s.c., em doses de 0,1 ml diluição 10⁻⁶ que continham entre 1 a 5 bactérias. Desta forma desenvolviam-se inicialmente, abscessos no local da inoculação e posteriormente também lesões internas com sobrevida dos cabaios entre 2 e 4 meses. Os animais estavam bem sensibilizados após a 4ª semana da infecção.

b) *Execução do teste alérgico em cabaios.* Tanto os 10 cabaios sensibilizados quanto um número igual de testemunhos indenes, foram depilados em ambos os lados do tórax e do abdômen com auxílio de tesoura elétrica e depilador químico. A "linfadenina" com 0,25 mg/ml de proteína foi inoculada, por via i.d., em dose de 0,1 ml das diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16, simultaneamente, com a seringa "Syntena" da Hauptner³ de tuberculização.

Quadro 5. Resultado da linfadenização de caprinos de rebanho indene. Comparação entre as linfadeninas com concentração de 0,25 a 0,12 mg/de proteína

Nº do caprino	AEDP ^(a) (mm)	AEDP ^(b) (mm)
703	0,2	0,5
707	0,4	0,4
708	0,1	0,5
711	0,6	0,6
712	0,9	1,0
713	0,5	0,6
731	0,2	0,7
1257	1,3	0,2
1261	0,6	0,8
1263	0,3	0,1
1272	0,2	0,5
1274	0,4	0,2
1280	0,9	0,8
1271	1,4	0,6
1266	0,6	0,2
764	0,5	0,2
701	0,7	0,3
704	0,4	0,5
729	1,0	0,3
730	1,0	0,4
705	0,4	0,4
706	0,3	0,2
710	1,5	1,0
717	0,1	0,2
718	0,1	0,4
719	0,1	0,5
720	0,5	0,1
721	0,4	0,2
722	0,2	0,6
723	0,1	0,1
724	1,5	1,2
725	0,8	0,5
726	1,2	0,6
727	0,3	0,1
728	0,6	1,3
1204	0,9	0,3
1260	0,2	1,0
1273	0,6	0,5
1277	0,3	0,2
1359	0,7	0,5

(a) Linfadenina com 0,25 mg/ de proteína.

(b) Linfadenina com 0,12 mg/ de proteína.

³ H. Hauptner, Kuller Strasse 38-44, Solingen, Alemanha Ocidental.

Quadro 6. Teste de eficiência da linfadenina (0,25 mg/proteína/ml)

Nº cobaios sensibilizados	Dose (ml)	Diluições				Nº cobaios normais	Dose (ml)	Diluições			
		1:2	1:4	1:8	1:16			1:2	1:4	1:8	1:16
1	0,1	15(a)	13	10	7	1	0,1	0,2	0,2	0,0	0,0
2	0,1	15	13	10	8	2	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0
3	0,1	15	12	9	6	3	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1
4	0,1	15	12	9	8	4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,1	18	15	10	8	5	0,5	0,3	0,2	0,1	0,1
6	0,1	15	12	10	9	6	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0
7	0,1	16	14	10	8	7	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0
8	0,1	16	14	10	8	8	0,4	0,2	0,2	0,0	0,0
9	0,1	14	12	10	8	9	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
10	0,1	18	14	11	9	10	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0
Médias		15,7	13,1	9,9	7,9	Médias	0,27	0,26	0,07	0,2	0,2

(a) Halo de eritema em mm.

3. Avaliação da eficácia da "linfadenina" em caprinos.

Execução do teste alérgico em caprinos. A "linfadenização" em caprinos foi realizada, por via i.d., na região da omoplata, em áreas previamente depiladas de 4 x 4 cm de lado com o auxílio de tesoura elétrica ou manual. Após a mensuração da espessura da dobra da pele com o auxílio do cutímetro da Hauptner, o alérgeno foi inoculado no centro da área demarcada, em dose de 0,1 ml, com o auxílio da seringa "Syntena" da Hauptner. A leitura e a interpretação da reação alérgica foram realizadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação, com o auxílio de novas medições da espessura da dobra da pele.

RESULTADOS

A sensitina, designada por "linfadenina" foi obtida por extração de uma proteína hidrossolúvel da massa bacteriana de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*ovis*), concentrada pela precipitação com ácido tricloroacético, preservada em tampão glicero-fenica e padronizada para o uso com uma quantidade de 0,25mg/ml de proteína.

O resultado do teste alérgico em cobaios sensibilizados manifestou-se sob forma de nítido halo eritematoso, com bordo bem delimitado, permitindo fácil mensuração. O tamanho médio do diâmetro do eritema dos 10 animais foi de 15,7, 13,1, 9,9, 7,9 mm, respectivamente para as diluições acima indicadas. Nos cobaios normais, a injeção das mesmas diluições da "linfadenina", não causou reações dignas de nota, conforme mostra o Quadro 6.

A "linfadenização" em 40 caprinos naturalmente infectados, e portadores de lesões da linfadenite caseosa realizada com a "linfadenina" contendo 0,25 mg/ml de proteína, revelou reações no ponto de inoculação, com maior intensidade às 48 horas, em todos os animais com aumentos da espessura da dobra da pele (AEDP) variando de 1,6 a 12,2 mm, com uma média de 6,04 ± 2,87 mm (Quadro 3).

Em outro grupo de 22 caprinos doentes, foi utilizada a "linfadenina" com a concentração de 0,12 mg/ml proteína. Neste experimento também todos os animais reagiram, porém com menor intensidade com o AEDP variando de 1,4 a 9,0 mm e média de 4,74 mm (Quadro 4).

Em 40 caprinos de criação livre da linfadenite caseosa, foi testada, simultaneamente, a "linfadenina" contendo 0,25 e 0,12 mg/ml de proteína. Verificou-se que com a concentração de 0,25

mg/ml houve AEDPs entre 0,0 e 0,5 mm em 47,5% dos animais, entre 0,5 a 1,0 mm em 35,0% e apenas em 17,5% o AEDP variou entre 1,0 e 1,5 mm, com média de 0,57 ± 0,40.

Nos mesmos animais foi aplicada, simultaneamente, a "linfadenina" menos concentrada, ou seja, 0,12 mg/ml de proteína cujos resultados revelaram também que 47,5% dos animais apresentaram AEDP entre 0,0 a 0,5 mm, 40,0% entre 0,5 a 1,0 mm e apenas 12,5% entre 1,0 a 1,5 mm, com média de 0,48 ± 0,31.

DISCUSSÃO

Os alérgenos descritos por Cassamagnaghi (1931), Carne (1932), Cameron & McOmie (1940), Farid & Mahmoud (1960/61) eram constituídos por filtrados de culturas de *C. pseudotuberculosis*, incubadas a 37°C por longos períodos. Estes filtrados, além de terem tido componentes do próprio meio de cultura também continham outros produtos decorrentes do catabolismo bacteriano durante o longo período de incubação e dentre estes também toxinas. A concentração do princípio ativo não foi determinado. A falta de sensibilidade e especificidade nos testes realizados por Carne (1932) em ovinos portadores de lesões da linfadenite fez com que este autor não se visse encorajado a prosseguir suas pesquisas sobre o uso da "Preisznocardina" no diagnóstico alérgico da linfadenite.

Em um ensaio preliminar, Langenegger & Langenegger (1984) tentaram produzir uma sensitina com endoproteínas cujos resultados também não foram promissores.

No presente trabalho, os autores verificaram que foi possível extrair uma proteína solúvel em água destilada de bactérias lavadas e obtidas em cultura de *C. pseudotuberculosis* com 5 dias de incubação. Esta proteína pôde ser concentrada por precipitação com ácido tricloroacético e determinada a sua quantidade no alérgeno. A proteína, extraída segundo a descrição, não se revelou tóxica para cobaios o que permitiu usar este animal para teste de avaliação da eficácia da "linfadenina". Os testes alérgicos em caprinos oriundos de rebanhos sem linfadenite e em caprinos portadores de lesões clínicas da doença revelaram especificidade e sensibilidade alérgica adequada para o seu emprego no diagnóstico, embora neste experimento inicial tenham sido usados apenas 40 caprinos em cada lote.

Os resultados do teste alérgico com as duas "linfadeninas" em caprinos doentes e sadios permitiram concluir que a da con-

centração com 0,25 mg/ml de proteína parece ser mais adequada, revelando boa sensibilidade e suficiente especificidade.

A sensitina elaborada por Costa Filho (1978), aparentemente, baseou-se no mesmo princípio, pois em sua descrição, muito sumária, fala de uma suspensão bacteriana de *C. pseudotuberculosis*, dando a entender que foram utilizados os microrganismos (sem o meio de cultura) em suspensão aquosa em que inadvertidamente houve extração da proteína. A especificidade do teste em caprinos infectados e indenes, embora realizada com um número muito reduzido de animais foi surpreendente considerando-se que a sensitina era constituída por uma suspensão bacteriana fenolizada a 0,5%.

Agradecimentos. - O trabalho foi desenvolvido com recursos financeiros do Programa de Biotecnologia da FINEP através de convênio com a EMBRAPA. Os autores querem registrar seus agradecimentos ao Técnico de Laboratório Sr. Orlandino Gregório e ao Laboratorista Sr. José Eneas Barbosa pela efetiva e dedicada colaboração técnica prestada na realização da presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

- 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.* 4:42-47.
- Cassamagnaghi A. 1931. Le diagnostic de la Lympho-adenite caseéense des moutons par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. *Bull. Acad. Vét. France* 4(7):330-333.
- Césari E. 1930. Sur le diagnostic de la lymphadénie caséense par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. *Bull. Acad. Vét. France* 3(6):291-295.
- Costa Filho G.A. 1977/78. Diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos através da intradermo-reação. *An. Univ. Fed. Rural de Pernambuco, Recife*, nº 2/3: 161-170.
- Costa M.D.M., Câmara, J.Q., Rocha, J.V.N. & Martinez, T.C.N. 1973. Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia - Distribuição geográfica da doença. *Bolm Inst. Biol. Bahia, Salvador*, 12(1):1-7.
- 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(7/8):253-258.
- Langenegger C.H. & Langenegger J. 1984. Avaliação da sensibilidade alérgica da infecção por *Corynebacterium ovis* em caprinos. *An. 19º Congr. Bras. Med. Vet., Belém, Pará*, p. 120.
- Renshaw H.W., Graff V.P. & Gates N.L. 1979. Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: Isolation of *Coynebacterium*, *Staphylococcus*, and *Moraxella* spp from internal abscesses in emaciated ewes. *Am. J. Vet. Res.* 40(8):1110-1114.
- Silva F.M. 1972. Carvão dos caprinos (linfadenite caseosa) no Estado de Pernambuco. Monografia, Univ. Fed. Rural de Pernambuco, Recife.
- Train 1934. Contribution à l'étude du traitement et du diagnostic de la lymphangite ulcérence. *Rev. Vét. Milit., Paris*, 18:355-362.