

Avaliação de antígenos através do ensaio imunoenzimático ELISA ao longo de infecção experimental em caprinos com *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Evaluation of antigens by enzyme immunoassay ELISA during experimental infection in goats with *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Evaluación de antígenos por inmunoensayo enzimático ELISA durante la infección experimental en cabras con *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Recebido: 25/08/2022 | Revisado: 09/09/2022 | Aceito: 12/09/2022 | Publicado: 20/09/2022

Victoria Christiane Wense Gazarian Calderon

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2310-3566>

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Brasil

E-mail: victoriagc04@gmail.com

José Tadeu Raynal Rocha Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2771-0235>

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Brasil

E-mail: jtraynal@hotmail.com

Maria Conceição Aquino de Sá

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8145-7018>

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Brasil

E-mail: ceicazoo@hotmail.com

Bruno Lopes Bastos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8128-1657>

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: bastosbl@gmail.com

Soraya Castro Trindade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7125-9114>

Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil

E-mail: soraya.castrotrindade@gmail.com

Natalia Augusto da Silva Cavalcante

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8637-959X>

Acadêmica do curso de Medicina da UNIME, Brasil

E-mail: ncavalcanti943@gmail.com

Antonio Pedro Fróes de Farias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2625-9470>

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Brasil

E-mail: froes_pedro@hotmail.com

Ricardo Wagner Dias Portela

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9095-776X>

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Brasil

E-mail: rwportela@gmail.com

Vasco Azevedo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4775-2280>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

E-mail: vascoariston@gmail.com

Roberto Meyer

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4727-4805>

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Brasil

E-mail: meyer.roberto@gmail.com

Resumo

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), uma doença infecciosa crônica que afeta ovinos e caprinos. Numerosos testes sorológicos foram desenvolvidos para detectar a doença, sendo o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) um dos mais utilizados devido às suas vantagens de sensibilidade e especificidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar a reatividade de um painel de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos experimentalmente infectados com linhagens não formadoras e formadoras de biofilme. Foram utilizados 18 caprinos da raça Canindé sendo: grupo 1 - animais controle negativo, grupo 2 - caprinos infectados com bactéria não formadora de biofilme e grupo 3 - caprinos infectados com linhagem formadora de biofilme. Foram testados os antígenos recombinantes CP40 e PLD, antígenos de fração de membrana (F3) e antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis* (BHI). A sensibilidade e especificidade dos testes ELISA indireto para todos os antígenos

foram de 100%. No entanto, os valores de densidade óptica (DO) registrados no ELISA BHI foram menores que os encontrados nos outros testes ELISA, sugerindo que antígenos específicos podem apresentar melhor sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LC.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Imunodiagnóstico; Linfadenite caseosa; Caprinos.

Abstract

Corynebacterium pseudotuberculosis is the etiologic agent of caseous lymphadenitis (CL), a chronic infectious disease that affects sheep and goats. Numerous serological tests have been developed to detect the disease, being the Enzyme Immunoassay (ELISA) one of the most used due to its advantages of sensitivity and specificity. The present study aimed to evaluate the reactivity of a panel of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens in goats experimentally infected with non-forming and biofilm-forming strains. Eighteen Canindé goats were used: group 1 - negative control animals, group 2 - goats infected with non-biofilm-forming bacteria and group 3 - goats infected with a biofilm-forming strain. Recombinant antigens CP40 and PLD, membrane fraction antigens (F3) and *C. pseudotuberculosis* secreted antigens (BHI) were tested. The sensitivity and specificity of the indirect ELISA tests for all antigens were 100%. However, the optical density (OD) values recorded in the BHI ELISA were lower than those found in the other ELISA tests, suggesting that specific antigens may have better sensitivity and specificity in the diagnosis of CL.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Immunodiagnosis; Caseous lymphadenitis; Goats.

Resumen

Corynebacterium pseudotuberculosis es el agente etiológico de la linfadenitis caseosa (LC), una enfermedad infecciosa crónica que afecta a ovinos y caprinos. Se han desarrollado numerosas pruebas serológicas para detectar la enfermedad, siendo el Inmunoensayo Enzimático (ELISA) una de las más utilizadas por sus ventajas de sensibilidad y especificidad. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la reactividad de un panel de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en cabras experimentalmente infectadas con cepas no formadoras y formadoras de biopelículas. Se utilizaron dieciocho cabras Canindé: grupo 1 - animales de control negativo, grupo 2 - cabras infectadas con bacterias no formadoras de biopelículas y grupo 3 - cabras infectadas con una cepa formadora de biopelículas. Se analizaron los antígenos recombinantes CP40 y PLD, los antígenos de fracción de membrana (F3) y los antígenos secretados por *C. pseudotuberculosis* (BHI). La sensibilidad y especificidad de las pruebas ELISA indirectas para todos los antígenos fue del 100%. Sin embargo, los valores de densidad óptica (OD) registrados en el BHI ELISA fueron más bajos que los encontrados en las otras pruebas de ELISA, lo que sugiere que los antígenos específicos pueden tener una mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de LC.

Palabras clave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Inmunodiagnóstico; Linfadenitis caseosa; Cabras.

1. Introdução

A ovinocaprinocultura é considerada uma importante atividade econômica no país, com destaque para a Região Nordeste, detentora do maior rebanho nacional de caprinos e segundo em ovinos, concentrado nas zonas Árida e Semiárida (Brasil, 2010). Na caprinocultura, os Estados de maior representatividade são a Bahia, Pernambuco e Piauí (Alves, et al., 2007).

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença contagiosa, infecciosa e crônica causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Cp*) que afeta principalmente ovinos e caprinos e com elevada prevalência na Região Nordeste. Estima-se que grande parte dos rebanhos possuam animais infectados e que 30% destes apresentem a forma clínica da doença (Droppa-Almeida et al., 2016; Seyffert et al., 2010). O diagnóstico precoce da LC é crucial para evitar a disseminação da *C. pseudotuberculosis*, sendo a presença de granulomas superficiais sugestiva para a enfermidade. No entanto, por se tratar de uma doença crônica, o animal que não apresenta sinais clínicos evidentes pode disseminar a bactéria, o que levou ao desenvolvimento de numerosos testes sorológicos para o diagnóstico da forma subclínica desta enfermidade (Barral et. al., 2019; Farias et al., 2020).

Dentre os métodos sorológicos os testes imunoenzimáticos ELISA têm sido frequentemente usados para controlar a LC, pois detectam doenças subclínicas com níveis aceitáveis de sensibilidade e especificidade (Menzies, et al., 2004). Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a reatividade de um painel de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos experimentalmente infectados com linhagens não formadoras e formadoras de biofilme.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos éticos e local do experimento

Esse experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS-UFBA) sob o nº 123/2017.

Foram utilizadas 18 caprinos da raça Canindé, mantidos na Estação Experimental de Pequenos Ruminantes - UFBA de Salinas da Margarida, BA, localizada a latitude 12°52'16'' e longitude 38°45'52'', clima tropical úmido e temperatura média de 30 °C.

2.2 Linhagens 21 e 76 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Foram utilizados dois isolados de *C. pseudotuberculosis* provenientes de caprinos, sendo uma estirpe Cap 3W (21) - linhagem não formadora de biofilme; e a outra CapJ4 (76) - linhagem patogênica produtora de biofilme (Sá et al., 2012).

2.2.1 Cultivo bacteriano e contagem de células para inoculação em caprinos

As cepas foram cultivadas em 200 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), por 48 h em estufa a 37 °C. Após o cultivo, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 6.000 rpm, desprezando o sobrenadante e acrescentando 10 mL de solução salina estéril para ressuspender o pellet. Em seguida foi retirado 1 mL da suspensão bacteriana, lavado duas vezes com solução salina, centrifugando por 5 minutos a 5.000 rpm. Depois de desprezar o sobrenadante foi adicionado Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), diluído 1:20 e incubado por 20 min no escuro à temperatura ambiente. Após nova lavagem, a amostra foi ressuspensa com 1 mL de solução salina. Foram retirados 50 µL da suspensão bacteriana e acrescida 450 µL de solução salina, em tubos com Beads trucount (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) para realizar a contagem do inóculo por mensuração em Citometria de Fluxo. O estabelecimento da concentração bacteriana seguiu o seguinte cálculo:

$$\text{bactérias totais} = \frac{\text{número de eventos bacterias}}{\text{número de eventos beads} \times \text{número de e beads por } \mu\text{L}(\text{constate do lote})} \text{ (Sampaio et al., 2019).}$$

2.3 Separação dos grupos experimentais e inoculação das linhagens bacterianas

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle negativo (6 animais) - animais não desafiados; grupo 21 (6 animais) - animais desafiados pela linhagem 21 de *C. pseudotuberculosis* não produtora de biofilme (1×10^7 cel/mL); e grupo 76 (6 animais) - animais desafiados pela linhagem 76 de *C. pseudotuberculosis* produtora de biofilme (1×10^7 cel/mL). Os animais do grupo controle negativo receberam como placebo uma dose de solução salina estéril (PBS).

As inoculações (1×10^7 cel/mL) foram realizadas no dia zero do experimento, por via subcutânea, na região pré-escapular esquerda do animal. Os animais foram observados durante 90 dias após o desafio, período de duração do experimento. Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular nos dias 0, 7, 14, 28, 60 e 90 do experimento. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro foi retirado e estocado a -20 °C até a dosagem de imunoglobulinas por ELISA.

2.4 Avaliação antigênica

2.4.1 Produção dos antígenos

O antígeno secretado BHI foi obtido da linhagem atenuada T1 de *C. pseudotuberculosis* (Carminati et al., 2003, com adaptações). Já o antígeno de membrana F3 foi produzido a partir da linhagem virulenta VD57 de *C. pseudotuberculosis*, de acordo com trabalho realizado por Rebouças et al. (2020). Estas cepas fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (LABIMUNO-UFBA).

A produção dos antígenos recombinantes CP40 e PLD foi feita segundo protocolo do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) (Seyffert et al., 2014). Os genes que codificam para as proteínas recombinantes de *C. pseudotuberculosis* foram selecionados e submetidos ao desenho de versões sintéticas, com otimização de códons para expressão em sistemas heterólogos. A síntese dos genes foi realizada pela empresa DNA2.0® (Califórnia, USA), a qual realizou a clonagem dos mesmos no vetor pD444-NH. Este vetor fusiona seis resíduos de histidina à proteína heteróloga, possibilitando a sua purificação por cromatografia de afinidade (Ni-Sepharose). Os vetores recombinantes foram usados para transformar cepas de *Escherichia coli* (*E. coli* BL21(DE3)). As proteínas recombinantes foram expressas e purificadas por cromatografia de afinidade como previamente descrito (Simionatto et al., 2012).

2.4.2 ELISA

Para a triagem dos antígenos e padronização do ELISA, foi realizado um procedimento checkerboard no qual foram testadas em combinação: diferentes concentrações de antígeno, diferentes diluições das amostras de soros e dos anticorpos anti-IgG caprino (Farias et al., 2020).

Após a etapa de padronização, foram realizados testes ELISA indiretos com amostras de soros dos caprinos infectados, usando-se os diferentes antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Para tanto, placas poliestireno de 96 poços (GREINER Bio-One, São Paulo, Brasil) foram sensibilizadas com 100 µL dos antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis* (BHI) (1:100), das proteínas recombinantes CP40 e PLD (0,5 µg/mL) e da fração de membrana (F3) (0,5 µg/mL), diluídas em 0,05 M de tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6), e incubadas a 4 °C por 16 horas. As placas foram lavadas com PBS 0,01 M, 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 200 µL/poço de caseína (5%), por 2 horas. Após lavagens com PBS-T, foram adicionados 50 µL/poço dos soros animais diluídos 1:100 em PBS-T, contendo 1% de caseína e incubados a 37 °C, por 1 hora. Após novas lavagens (5 vezes), foi adicionado 50 µL/poço do anticorpo secundário anti-IgG caprino conjugado com peroxidase, diluído 1:20.000 (Bethyl, Montgomery, USA), em PBS-T contendo 1% de caseína, incubado a 37 °C, por 45 minutos. A revelação foi realizada com a adição de 50 µL/poço do substrato de 1:2-O-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), a 22 °C, ao abrigo da luz, por 15 minutos. A reação foi interrompida acrescentando-se 25 µL/poço de H₂SO₄ 4 N. A densidade óptica média (DO) a 492 nm foi determinada utilizando um leitor de placas de microtitulação (THERMO PLACA, Miami, USA).

Para cada modalidade de ELISA padronizado, foi feita a correção interplaca da densidade óptica (DO), multiplicando-se o fator de correção entre placas (Ftc) pela leitura da DO encontrada (Zwirner, 1996). A DO corrigida (DOc) foi obtida a partir da seguinte fórmula: $Ftc = \frac{\text{média da DO do positivo-padrão da placa de referência}}{\text{média da DO do positivo-padrão de cada placa}}$. Portanto, $DOc = \frac{DO}{Ftc}$.

2.5 Estudo estatístico e definição do ponto de corte

Para análise estatística foi feito o teste de frequência de distribuição Kolmogorov-Smirnov, que definiu que as amostras possuem distribuição normal, assim, foi escolhido o teste paramétrico ANOVA, com o pós-teste Tukey em nível de significância <0,05. O ponto de corte do ELISA definiu-se pela curva ROC ou curva operacional relativa. Esta análise tem como base uma curva onde são colocados os valores de corte que tem no eixo das ordenadas a sensibilidade e no eixo das abscissas a taxa de falso positivo (1 - especificidade).

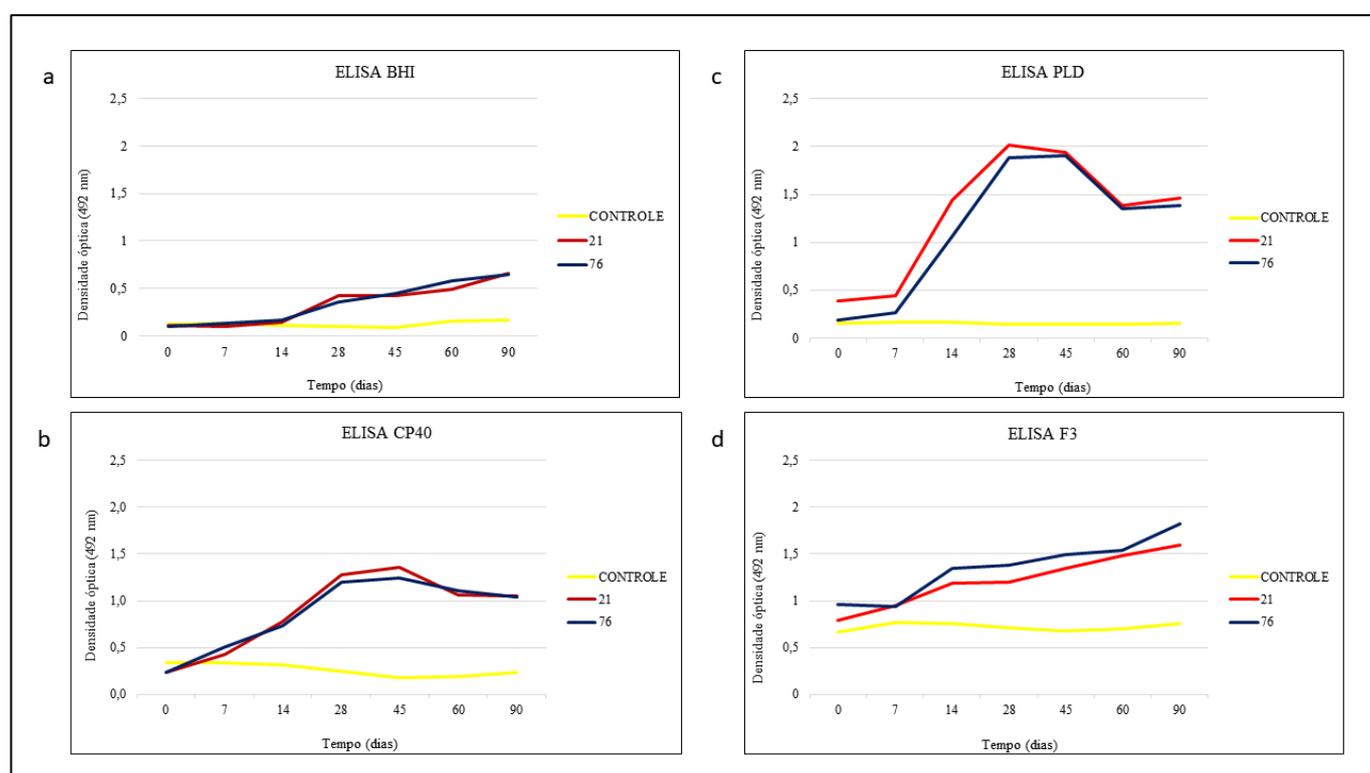
O ponto de corte considerado ideal é aquele que permite uma maior especificidade sem perda da sensibilidade. De acordo com Greiner, et al., (1995), esta análise deve ser utilizada para testes ELISA. Kaba, et al. (2001) utilizaram esta análise para desenvolvimento de um teste ELISA para diagnóstico da LC. Foram utilizados para as análises os programas GraphPad Prism versão 6 e SPSS versão 23 para Windows.

3. Resultados

3.1 Resultados do ELISA indireto Antígeno BHI

Observando a Figura 1a, constatamos que no ELISA BHI, os animais infectados com a cepa 21 (não formadora de Biofilme) e com a cepa 76 (formadora de Biofilme), apresentaram uma resposta humoral a partir do 7º dia de infecção. Notou-se que no 28º dia de infecção os caprinos do grupo Cap 21 apresentaram valores de D.O. maiores que os caprinos do grupo cap 76. Em contrapartida, a partir do tempo 45 até 60 dias os caprinos do cap 76 atingiram valores mais elevados de D.O. a partir dos 60 dias de infecção, tanto os caprinos do Cap 21, como do cap 76 se comportaram de forma crescente, quanto aos valores de D.O. Notou-se também para este ELISA que o grupo controle negativo apresentou valores de D.O. constantes durante os 90 dias de infecção.

Figura 1. Densidade média dos grupos ao longo do experimento.



Fonte: Autores.

3.2 Resultados do ELISA Indireto - Antígeno PLD

Os resultados obtidos com o ELISA Antígeno PLD, Figura 1c, neste experimento demonstraram que os animais do Cap 21 apresentaram valores de D.O superiores ao cap76 a partir do 7 dia de infecção, mantendo valores de D.O superiores ao grupo cap76 até os 45 dias de infecção.

Após os 28 dias de infecção, os grupos experimentais apresentaram declínio nos valores de D.O. O grupo Controle negativo se manteve constante, durante todo o experimento conforme Figura 1b.

3.3 Resultados do ELISA Indireto CP40

Observando o resultado do ELISA representado na Figura 1b, podemos observar que a partir do 7º dia de infecção, tanto o cap 21, como o cap 76 começaram a se soroconverter, demonstrando positividade ao longo de 90 dias de infecção experimental, mesmo apresentando uma redução nos níveis de D.O, a partir dos 45 dias.

No período de 28 a 45 dias os valores de D.O do Grupo cap 21 se apresentaram um pouco mais elevados que os valores de D.O do cap 76. O controle se manteve negativo ao longo dos 90 dias do experimento.

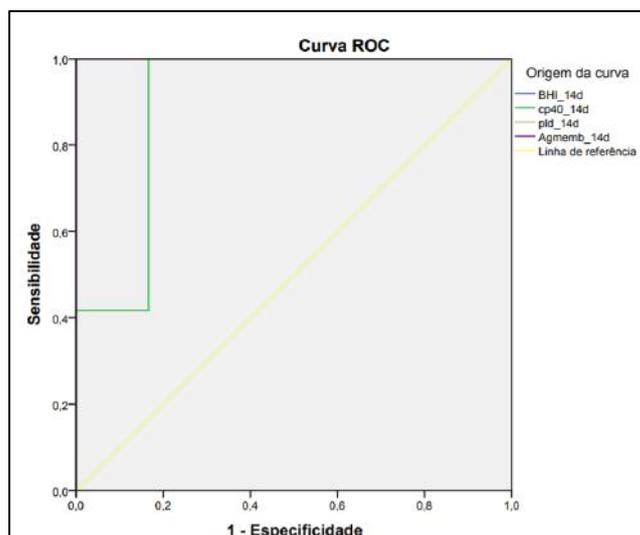
3.4 Resultado do ELISA antígeno de membrana F3

Observamos na Figura 1d, que o resultado do ELISA com antígeno de membrana F3 apresentou valores de D.O para o grupo cap 76 maiores que os demais grupos. A partir do 7 dia de infecção até os 90 dias os valores de D.O tanto do Grupo cap 21, como do cap 76 se mantiveram crescentes. O Grupo controle se manteve constante ao longo do experimento

3.5 Definição dos Pontos de Corte dos Testes ELISA

Os pontos de corte foram definidos através da curva ROC. Esta curva avalia a sensibilidade em função da especificidade. Vale ressaltar que a área delimitada pela curva do teste ELISA indireto CP40, nos 14 dias pós infecção, demonstrou uma menor especificidade comparado com o ELISA dos demais antígenos pertencentes a este trabalho. A área sob a curva dos antígenos BHI, PLD e antígeno de membrana foi de 1,000 cada, enquanto a área sob a curva do antígeno CP40 foi de 0,903. As curvas ROC dos testes ELISA estão demonstradas pela Figura 2. Já os valores de sensibilidade e especificidade dos testes ELISA de acordo com seus respectivos pontos de corte, considerando o tempo 14 pós infecção são demonstrados pela Tabela 1.

Figura 2. Curva ROC com todos os antígenos no dia 14 pós infecção.



Fonte: Autores.

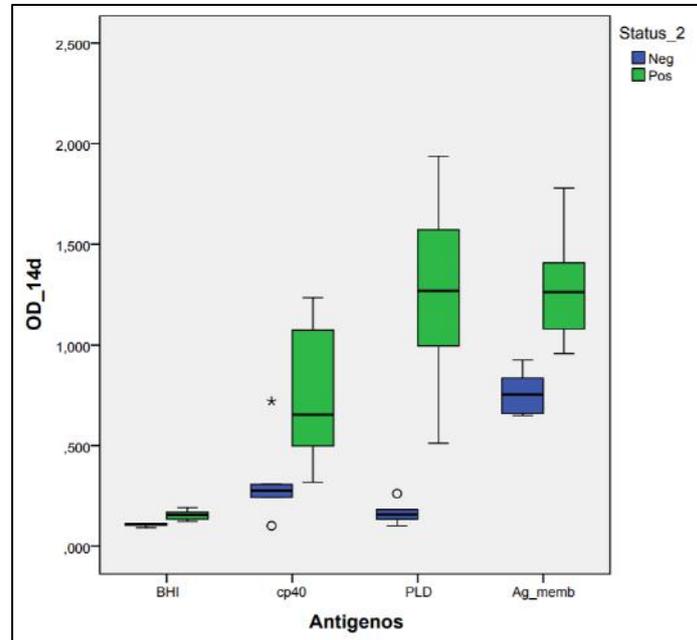
Tabela 1. Valores de Sensibilidade e especificidade para os testes ELISA.

	<i>Sensibilidade</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Cut-off</i>
ELISA indireto BHI	100%	100%	0,118
ELISA indireto CP40	100%	100%	0,312
ELISA indireto PLD	100%	100%	0,386
ELISA indireto F3	100%	100%	0,941

Fonte: Autores.

A Figura 3 demonstra a variação de D.O dos antígenos BHI, CP40, PLD e F3, aos 14 dias após infecção, onde pode-se perceber os valores de D.O considerando animais positivos e negativos para Biofilme.

Figura 3. Variação de D.O. ao longo de 14 dias após infecção.

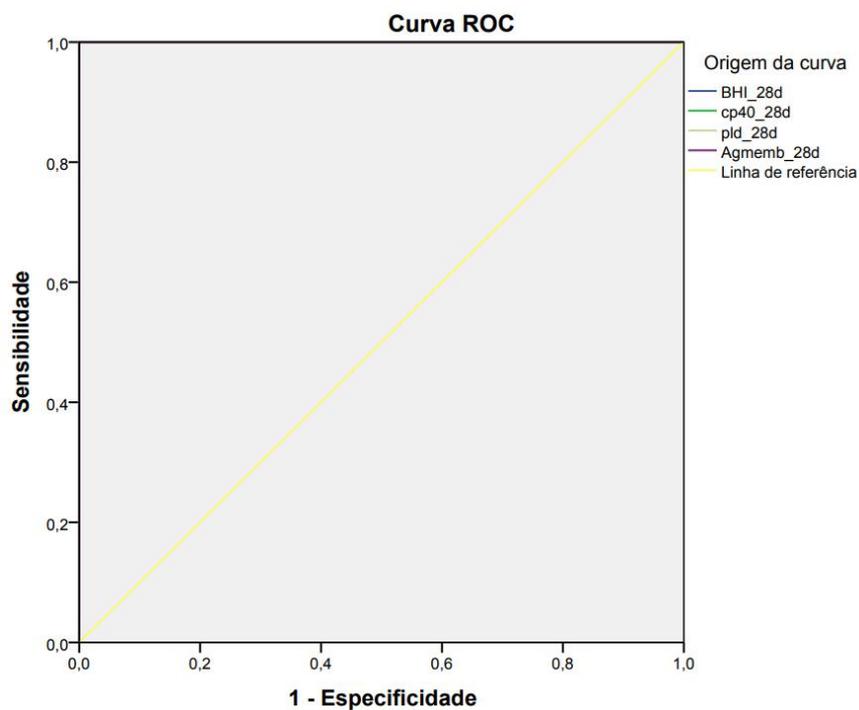


Fonte: Autores.

Os pontos de corte também foram definidos através da curva ROC, considerando 28 dias pós infecção. Ver Figura 4.

Observa-se nessa curva do teste ELISA indireto para todos os antígenos presentes nesse trabalho, no 28º. dia pós-infecção, que a área sob a curva dos antígenos BHI, PLD, CP40 e F3 foi igual para todos (Área 1,000) e os resultados de sensibilidade e especificidade se mantiveram iguais aos valores definidos no tempo de 14 dias pós-infecção (ver Tabela 2).

Figura 4. Curva ROC com todos os antígenos no dia 28 pós infecção.



Fonte: Autores.

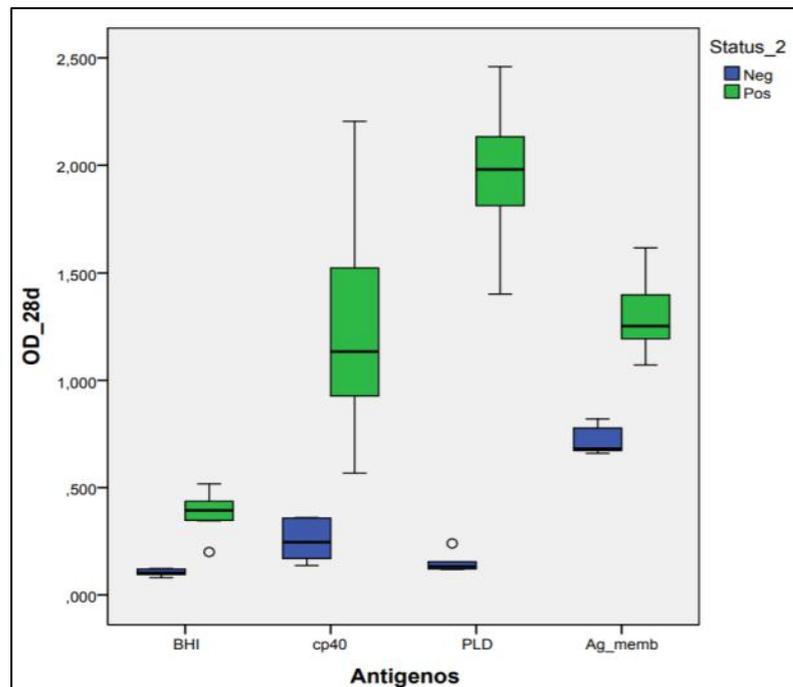
Tabela 2. Valores de Sensibilidade e especificidade para os testes ELISA definidos no tempo de 28 dias pós infecção.

	Sensibilidade	Especificidade	<i>Cut-off</i>
ELISA indireto BHI	100%	100%	0,161
ELISA indireto CP40	100%	100%	0,464
ELISA indireto PLD	100%	100%	0,821
ELISA indireto F3	100%	100%	0,946

Fonte: Autores.

Na Figura 5 podemos observar que o antígeno BHI teve pouca variação com relação aos valores de D.O

Figura 5. Variação de D.O. ao longo de 28 dias após infecção.



Fonte: Autores.

3.6 Diferenças estatísticas e coeficientes de correlação entre os testes BHI e os demais

Ao se avaliar pelo teste ANOVA as diferenças entre os diferentes grupos, nos diferentes tempos, encontrou-se os resultados apresentados na Quadro 1, evidenciando-se diferenças estatisticamente significantes entre todos os antígenos em todos os tempos. Empregando o teste Dunnett T bicaudal para a comparação dos pares (considerando o BHI como referência), foram encontradas as seguintes diferenças estatisticamente significantes:

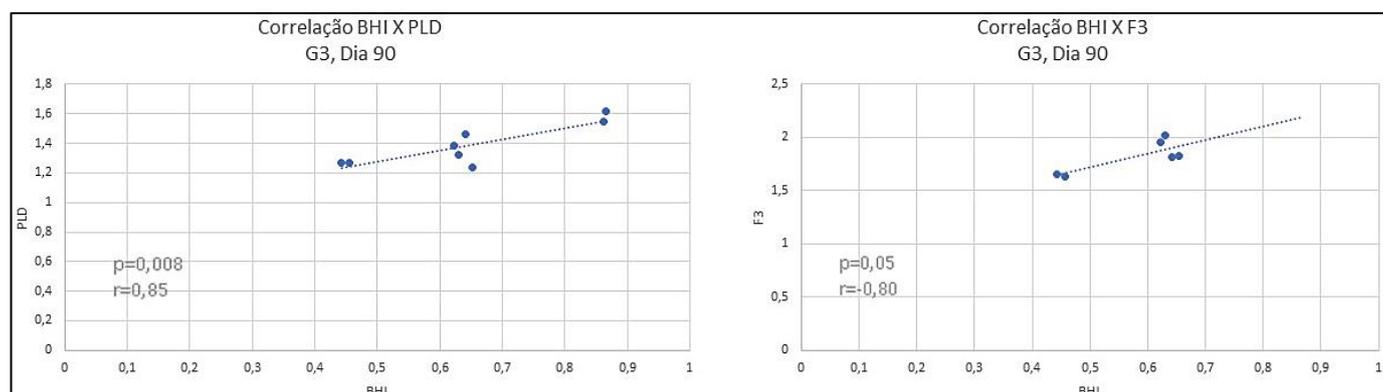
Quadro 1. Avaliação estatística evidenciando diferenças nos resultados obtidos entre BHI e demais antígenos nos diferentes tempos experimentais.

G1:	G2:	G3:
<u>Dia 0:</u> BHI X CP40 (p=0,003) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 0:</u> BHI X CP40 (p=0,010) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 0:</u> BHI X F3 (p=0,000)
<u>Dia 7:</u> BHI X CP40 (p=0,007) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 7:</u> BHI X PLD (p=0,026) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 7:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)
<u>Dia 14:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 14:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 14:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)
<u>Dia 28:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 28:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 28:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)
<u>Dia 45:</u> BHI X CP40 (p=0,003) BHI X PLD (p=0,028) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 45:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 45:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)
<u>Dia 60:</u> BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 60:</u> BHI X CP40 (p=0,000) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 60:</u> BHI X CP40 (p=0,001) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)
<u>Dia 90:</u> BHI X CP40 (p=0,010) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 90:</u> BHI X CP40 (p=0,017) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)	<u>Dia 90:</u> BHI X CP40 (p=0,014) BHI X PLD (p=0,000) BHI X F3 (p=0,000)

Fonte: Autores.

Levando-se em conta que a infecção foi mais intensa nos animais do grupo cap76, utilizou-se os resultados de DO encontrados nos testes ELISA para este grupo, com os quatro antígenos utilizados, para estabelecer os coeficientes de correlação entre estes resultados. Utilizando-se o teste para o coeficiente de correlação de Pearson, confrontou-se os resultados encontrados com o BHI e os três outros antígenos. Encontrou-se correlação positiva apenas entre os resultados obtidos pelo BHI x PLD e BHI x F3. Não houve correlação entre BHI e CP40 (Figura 6).

Figura 6. Gráfico representativo da correlação entre os resultados obtidos com os antígenos.



Fonte: Autores.

4. Discussão

O Antígeno BHI tem na sua composição antígenos secretados de *Cp* e também possui proteínas do meio de cultura que possivelmente interferem no resultado, pois nem todos tem a capacidade de induzir resposta imune. Essa característica de variabilidade de proteínas pode ser um bom parâmetro comparativo quando levamos em consideração antígenos específicos como constantes nesse trabalho.

Segundo Rebouças et al. (2020) o antígeno de membrana F3, possui apenas componentes de superfície de membrana presentes no *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Com ele obteve resultados de sensibilidade e especificidade superiores aos antígenos secretados BHI. Esse resultado é discordante daquele encontrado nesse trabalho, pois obteve-se resultados iguais de sensibilidade e especificidade quando comparamos o antígeno F3 e o antígeno BHI, entretanto, é bom que seja enfatizado, que apesar de se determinar neste trabalho os principais parâmetros que validam um teste sorológico, pois estes são necessários para possibilitar que se alcance os objetivos buscados, particularmente a maior segurança para a avaliação da cinética da produção de anticorpos que reconheçam estes antígenos ao longo de infecções de intensidades diferentes, este experimento utilizou uma pequena amostragem (n=6 por grupo), o que não invalida os resultados encontrados, mas indica, especialmente para os antígenos recombinantes que ainda não foram testados em amostras maiores de soros positivos e negativos, como o aquele com o BHI e com a fração F3, já testados em amostras que asseguram uma maior significação estatística.

Experimento ainda preliminar com 40 caprinos comprovadamente positivos e 40 caprinos negativos (Barral et al., 2019), apresenta valores para PLD e CP40, quando testados isoladamente pelo teste ELISA, valores de sensibilidade e especificidade de respectivamente de 92,5 e 97,5 (PLD) e 40 e 100% (CP40). Quando utilizadas juntas, estes valores foram, respectivamente, 95,0 e 97,5%. O teste ELISA, realizado nesse trabalho com antígeno CP40, se mostrou com sensibilidade e especificidade de (100%), superior quando comparado com o ELISA BHI já descrito na literatura por Carminatti et al. (2003).

A PLD é considerada como o principal fator de virulência desta bactéria (Hodgson et al., 1999; Lipsky, et al., 1982). Quando utilizada como antígeno específico no teste ELISA, apresentou resultados sensibilidade 100% e especificidade 100% que quando comparado aos mesmos parâmetros do antígeno BHI, já descrito na literatura com sensibilidade de 93,5% e especificidade de 100% segundo Carminatti et al. (2003), Para este autor, este teste também mostrou ser capaz de afastar animais que se mostrem falso positivo, além de se mostrar mais sensível.

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 (Braithwaite et al., 1993, Ellis, et al., 1991; 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 dos antígenos F3, os antígenos utilizados apresentaram uma resposta de positividade e negatividade diferenciando animais infectados com Cap 21 e Cap 76 dos animais não infectados.

Segundo Carminatti 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 LC em caprinos, obtiveram sensibilidade de 93,5% e 100% de especificidade. Resultados distintos foram obtidos no presente trabalho, onde se obteve sensibilidade de 100% e especificidade de 100% para o ELISA indireto com antígenos BHI, F3, PLD e CP40 em ensaios realizados individualmente.

Quanto maior a especificidade de um teste, maior a capacidade do teste positivo indicar a doença, pois diminui a probabilidade de falso positivo. A sensibilidade pode ser definida como a probabilidade de o teste ser positivo caso o animal esteja doente, enquanto especificidade seria a probabilidade do teste ser negativo no animal não doente (Xu, et al., 1997), os ensaios realizados no presente trabalho mostraram que os antígenos BHI, PLD, CP40 e F3, que obtiveram 100%, seguramente, pelas amostras conhecidas utilizadas, indicaram doença.

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, verificamos resultados superiores para sensibilidade em todos os antígenos utilizados, BHI, CP40, PLD, Ag. de membrana apresentaram 100% de sensibilidade.

Moura-Costa (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%. (Zerbinati et al., 2007), valores bastantes expressivos e muito próximos daqueles aqui encontrados, levando-se em conta que os resultados com o referido meio foram obtidos com uma grande amostra de caprinos positivos e negativos

No presente trabalho, constatou-se que os testes ELISA com antígeno de membrana F3, BHI e PLD e CP40 possuem uma capacidade maior de diferenciar os grupos infectados do grupo não infectado, concordando com os resultados obtidos por Paule et al. (2004), que trabalhou com um antígeno denominado de TPP.

No teste ELISA indireto, utilizando o antígeno BHI já padronizado e descrito na literatura para comparação com o antígeno CP40, obtiveram-se valores de D.O. nas amostras de caprinos com sintomatologia clínica para linfadenite caseosa com variação entre 0,3 a 1,3. 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 do antígeno CP40 utilizado para os testes ELISA indireto.

Da mesma forma que no teste ELISA indireto, utilizando o antígeno BHI já padronizado e descrito na literatura para comparação com o antígeno PLD, obtiveram-se valores de D.O. nas amostras de caprinos dos grupos G1 e G2 com sintomatologia clínica para linfadenite caseosa com variação entre 0,3 a 1,9. Os valores da absorbância nas amostras de soros negativos para a doença oscilaram entre 0,1 e 0,3.

Testou-se o coeficiente de correlação de Pearson, confrontando-se resultados obtidos com estes antígenos com os demais, nos animais do grupo 3 no 90º dia de infecção, portanto no grupo onde a infecção foi mais intensa e a doença já estava em sua fase crônica, obteve-se correlação positiva como antígeno PLD e F3 e não com o CP40, o que aponta uma maior similaridade de reconhecimento com os dois primeiros, que discorda parcialmente com os achados de Barral et al. (2019).

Os resultados obtidos com o teste ELISA realizado com a enzima SodC recombinante, embora preliminares, devido o número amostral limitado, apresentou resultados bem promissores no que se refere à capacidade de discriminar positivos e negativos, à sensibilidade e especificidade (ambas 100%) para um ponto de corte de 0,147 e uma boa distribuição dos valores de

DO abaixo e acima deste *cut off*. Infelizmente, pouco existe na literatura sobre a utilização desta molécula como diagnóstico, destacando-se o trabalho recente de Mina et al. (2017), que utiliza esta enzima recombinante em ensaio imunoenzimático ELISA para o diagnóstico de infecção humana pelo fungo *Scedosporium*.

5. Conclusões

Frente ao protocolo experimental desenvolvido e aos resultados obtidos, conclui-se que independentemente de ser ou não formadora de biofilme a resposta humoral para todos os antígenos testados se iniciou em tempos iguais.

A média dos valores de DO dos animais infectados com CAP 21 e CAP 76 não mostraram diferenças significativas quando testados com o antígeno CP40, demonstrando que apesar do antígeno ter um bom desempenho para diferenciar animais positivos de negativos, não demonstrou diferença significativa com relação aos animais infectados com CAP21 (não formadora de biofilme) e CAP76 (formadora de biofilme).

Os valores de DO dos animais infectados com CAP 21 quando testados com o teste ELISA PLD, foram maiores que os animais infectados com o CAP 76, o que nos leva a crer que cepas não produtoras de biofilme são mais sensíveis ao ELISA do antígeno PLD. Isso pode ocorrer porque o CAP 21 pode estar produzindo mais PLD ou porque a PLD esteja sendo mais bem apresentada pelas células apresentadoras de antígeno, tornando-as mais disponíveis.

Os Valores de DO registrados no ELISA BHI foram menores que os valores de DO dos outros testes ELISA realizados nesse trabalho com os antígenos PLD, CP40 e F3 (antígeno de membrana), sugerindo que antígenos mais específicos possuem uma melhor resposta para o desenvolvimento de testes de diagnóstico de *Cp*.

A enzima SodC de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, embora testada preliminarmente e em condições de infecções experimentais, com pequeno tamanho de amostras negativas, parece ser um antígeno promissor para identificar amostras positivas e negativas.

Os resultados apontam um caminho promissor para estudos mais detalhados frente a capacidade diagnóstica destes antígenos em separado ou associados em um mesmo teste diagnóstico, que podem vir a auxiliar na identificação de animais positivos e talvez no grão de infecção do animal.

Referências

- Alves, F. S. F., Santiago, L. B., & Pinheiro, R. R. (2007). *Linfadenite Caseosa: o Estado da Arte*. Documentos 74. Embrapa Caprinos.
- Barral, T. D., Mariutti, R. B., Arni, R. K., Santos, A. J., Loureiro, D., Sokolonski, A. R., Azevedo, V., Borsuk, S., Meyer, R., & Portela, R. D. (2019). A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Microbial Biotechnology*, 1-11. 10.1111/1751-7915.13454.
- Braithwaite, C. E., Smith, E. E., Songer, J. G., & Reine, A. H. (1993). Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 38, 59-70. 10.1016/0378-1135(93)90075-i
- Brasil. (2010) *Ovinocaprinocultura. Desenvolvimento Regional Sustentável: Série cadernos de propostas para atuação em cadeias produtivas*. (Vol. 7). Brasília, DF: Fundação Banco do Brasil.
- Carminati, R., Bahia, R., Moura-Costa, L. F., Paule, B. J. A., Vale, V. L., Regis, L., Freire, S. M., Nascimento, I., Schaer, R., & Meyer, R. (2003). *Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2(1), 88-93. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v2i1.4256>
- Dercksen, D. P., Brinkhof, J. M. A., Dekker-Nooren, T., Van Maanen, K., Bode, C. F., Baird, G., & Kamp, E. M. (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 75, 167-175. 10.1016/S0378-1135(00)00217-0
- Droppa-Almeida, D., Vivas, W. L. P., Silva, K. K. O., Rezende, A. F. S., Simionatto, S., Meyer, R., Lima-Verde, I. B., Delagostin, O., Borsuk, S., & Padilha, F. F. (2016). Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine*, 34, 1091-1096. 10.1016/j.vacina.2015.12.064
- Ellis, J. A., Hawk, D. A., Mills, K. W., & Pratt, D. L. (1991). Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 28, 289-301. 10.1016/0165-2427(91)90121-r

- Farias, A. P. F., Rocha Filho, J. T. R., Marchioro, S. B., Moreira, L. S., Marques, A. S., Sá, M. C. A., Oliveira, A. A. S., Alcântara, M. E., Mariutti, R. B., Arni, R. K., Trindade, S. C., & Meyer, R. (2020). rSodC is a potential antigen to diagnose *Corynebacterium pseudotuberculosis* by enzyme-linked immunoassay. *AMB Express*, 10(186), 1-8. 10.1186/s13568-020-01125-0
- Greiner, M., Sohr, D., & Göbel, P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *Journal of Immunological Methods*, 185, 123-132. 10.1016/0022-1759(95)00121-p
- Hodgson, A. L. M., Carter, K., Tachedjian, M., Krywult, J., Corner, L. A., McColl, M., & Cameron, A. (1999). Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine*, 17, 802-808. 10.1016/s0264-410x(98)00264-3
- Kaba, J., Kutschke, L., & Gerlach, G. F. (2001). Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Veterinary Microbiology*, 78, 155-163. 10.1016/s0378-1135(00)00284-4
- Lipsky, B. A., Goldberger, A. C., Tompkins, L. S., & Plorde, J. J. (1982). Infections caused by nondiphtheria *Corynebacteria*. *Reviews of infectious diseases*, 4, 1220-1235. 10.1093/clinfdecs/4.6.1220
- Menzies, P. I., Hwang, Y. T., & Prescott, J. F. (2004). Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*, 100, 129-137. 10.1016/j.vetmic.2004.01.012
- Mina, S., Staerck, C., Marot, A., Godon, C., Calenda, A., Bouchara, J. P., & Fleury, M. J. J. (2017). *Scedosporium boydii* CatA1 and SODC recombinant proteins, new tools for serodiagnosis of *Scedosporium* infection of patients with cystic fibrosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89(4), 282-287. 10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.013
- Moura-Costa, L. F. (2002). Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 3(1), 1-9. [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-brasileira-de-saude-e-producao-animal/3-\(2002\)-1/meio-sintetico-quimicamente-definido-para-o-cultivo-de-corynebacterium](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-brasileira-de-saude-e-producao-animal/3-(2002)-1/meio-sintetico-quimicamente-definido-para-o-cultivo-de-corynebacterium)
- Mouckle, C. A., Menzies, P. I., Li, Y., Hwang, T. Y., & Van Wesenbeeck, M. (1992). Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 30, 47-58. 10.1016/0378-1135(92)90093-9
- Paule, B. J. A., Meyer, R., Moura-Costa, L. F., Bahia, R. C., Carminati, R., Regis, L. F., Vale, V. L. C., Freire, S. M., Nascimento, I., Schaer, R., & Azevedo, V. (2004). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, 34(2), 311-316. 10.1016/j.pep.2003.12.003
- Rebouças, M. F., Loureiro, D., Barral, T. D., Seyffert, N., Raynal, J. T., Sousa, T. J., Figueiredo, H. C. P., Azevedo, V., Meyer, R., & Portela, R. W. (2020). Cell wall glycolipids from *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains with different virulences differ in terms of composition and immune recognition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 2101-2110. 10.1007/s42770-020-00343-9
- Sá, M. C. A., Veschi, J. L. A., Santos, G. B., Amanso, E. A., Oliveira, S. A. S., Mota, R. A., Veneroni-Gouveia, G., & Costa, M. M. (2012). Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(11), 1319-1324. http://www.pvb.com.br/portal/download_artigo/MTMxMnwyMDIyMDkxMDEyNTQ1NQ
- Sampaio, P. G., Vale, V. L. C., Moura-Costa, L. F., Fraga, R. E., Santos, H. H. M., Sá, M. C. A., Bastos, B. L., Rocha Filho, J. T. R., Trindade, S. C., & Nascimento, R. J. M. (2019). Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *Corynebacterium pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas. *PUBVET*, 13(11), 1-9. 10.31533/pubvet.v13n11a443.1-9
- Seyffert, N., Guimarães, A. S., Pacheco, L. G. C., Portela, R. W., Bastos, B. L., Dorella, F. A., Heinemann, M. B., Lage, A. P., Gouveia, A. M. G., Meyer, R., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2010). High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Research in Veterinary Science*, 88, 50-55. 10.1016/j.rvsc.2009.07.002
- Seyffert, N., Silva, R. F., Jardim, J., Silva, W. M., Castro, T. L. P., Tartaglia, N. R., Santana, K. T. O., Portela, R. W., Silva, A., Miyoshi, A., Le Loir, Y., & Azevedo, V. (2014). Serological proteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different hosts reveals novel candidates for prophylactics to control caseous lymphadenitis. *Veterinary Microbiology*, 174(1-2), 255-260. 10.1016/j.vetmic.2014.08.024
- Simionatto, S., Marchioro, S. B., Galli, V., Brum, C. B., Klein, C. S., Rebelatto, R., Silva, E. F., Borsuk, S., Conceição, F. R., & Dellagostin, O. A. (2012). Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35, 209-216. 10.1016/j.cimid.2012.01.007
- Xu, H., Lohr, J., & Greiner, M. (1997). 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*, 208, 61-64. 10.1016/S0022-1759(97)00128-2
- Zerbinati, J., Greve, I. C., Leal, R. F., Amorin, L. M. P. V., Silva, D. L., Viegas, S. R. A. A., Peixoto, A. P. C., Carminati, R., & Cerqueira, R. B. (2007). Produção e padronização de um antígeno para um teste ELISA indireto no diagnóstico da linfadenite caseosa em soros caprinos. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, 5(3), 285-293. 10.7213/cienciaanimal.v5i3.10116
- Zwirner, N. W. (1996). *Elisa*. In: Margni, R. A. *Imunologia e Imunoquímica*. (5a ed.). Panamericana.