

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento de um Teste Intradérmico de
Hipersensibilidade com antígenos secretados de
Corynebacterium pseudotuberculosis para o
diagnóstico subclínico da Linfadenite Caseosa em
pequenos ruminantes**

Camila Azevedo Antunes de Oliveira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Azevedo

CO-ORIENTADORA: Dra. Núbia Seyffert

Belo Horizonte
2011

Camila Azevedo Antunes de Oliveira

**Desenvolvimento de um Teste Intradérmico de
Hipersensibilidade com antígenos secretados de
Corynebacterium pseudotuberculosis para o
diagnóstico subclínico da Linfadenite Caseosa em
pequenos ruminantes**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética

Área de concentração: Genética Molecular, de Microrganismos e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Vasco Azevedo

Co-orientadora: Dra. Núbia Seyffert

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas - ICB - UFMG

2011

Oliveira, Camila Azevedo Antunes de

Desenvolvimento de um Teste Intradérmico de Hipersensibilidade com antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico subclínico da Linfadenite Caseosa em pequenos ruminantes. [manuscrito] / Camila Azevedo Antunes de Oliveira. – 2011.

81f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Vasco Azevedo. Co-orientadora: Núbia Seyffert.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* - Teses. 2. Linfadenite caseosa - Teses. 3. Testes intradérmicos – Teses. 4. Genética – Teses. 5. Genética molecular – Teses. 6. Genética microbiana – Teses. 7. Hipersensibilidade. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. II. Seyffert, Núbia. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. IV. Título.

CDU: 576.85.095.5



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais

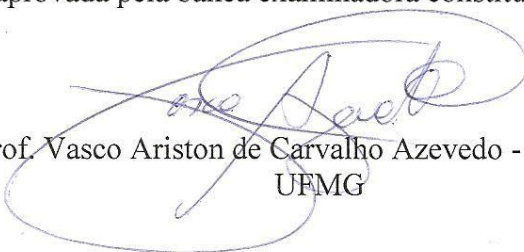
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



**"Desenvolvimento de um teste intradérmico de hipersensibilidade com
antígenos secretados de Corynebacterium pseudotuberculosis para o
diagnóstico sub-clínico de linfadenite caseosa em pequenos
ruminantes"**

Camila Azevedo Antunes de Oliveira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador
UFMG



Prof. Núbia Seyffert - Co-Orientadora
UFMG



Profa Aurora M. G. Gouveia
UFMG



Prof. Álvaro Cantini Nunes
UFMG



Prof. Sergio Costa Oliveira
UFMG

Belo Horizonte, 04 de novembro de 2011.

DEDICATÓRIA

Àquele que faz do acaso da vida um milagre, Deus.
Aos meus pais, por proporcionarem minha existência e à minha família por ser meu alicerce.
Ao Sandro Alves, pelo amor, companheirismo e incentivo incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais por ter aberto suas portas para o meu futuro.

Ao professor Vasco Azevedo, pela oportunidade, orientação, atenção, confiança e por estar sempre “me inoculando o micróbio da vontade de crescer”; o que está sendo fundamental para construção da minha carreira.

Ao professor Anderson Miyoshi por ter gentilmente contribuído para o meu despertar na genética de microrganismos através de seus ensinamentos.

À Dra. Núbia Seyffert, pela dedicação incondicional e orientação, companheirismo e amizade que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho e início de outros.

Ao Dr. Alessandro Guimarães pela grande colaboração na execução deste trabalho.

Aos professores Ricardo Portela, Marcos Xavier e Aurora Gouveia pela colaboração.

Ao senhor Maurício, que gentilmente cedeu suas cabras para a execução deste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Zoonoses da PBH, em especial Ivan Sonoda, Mariana Hilarino, José Carlos Nascimento e Adelaide Bessa pelo incentivo, coleguismo e pela colaboração com a flexibilidade de horários.

Aos amigos e colegas do LGCM: Wanderson Silva pelos ensinamentos, colaborações e pelas missões cumpridas até o fim. Ao Pablo Oliveira e à Flávia Souza pela recepção inicial e apoio sempre. À Fernanda Dorella pelo exemplo e orientações. Ao Thiago Castro pelos conselhos e simpatia. À Dayana Ribeiro, pela disposição e parceria. À Kátia, pela ajuda constante. Ao Rodrigo Dias pela amizade e parceria de estudos. À Camila Prospero, pelo compartilhamento de idéias. À Fernanda Lima pelo apoio inicial e coleguismo de turmas. À Fernanda Militão por sempre estar disposta a ajudar. À Sintia Silva e Aryane Magalhães pelos auxílios no projeto e atenção. À Daniela Pontes pelos conselhos e gentilezas. À Márcia Natália e Fernanda Magalhães pela simpatia e incentivo de ambas. Ao Alfonso Gala-García, pelas dicas importantes e simpatia. Às *lactis* Vanessa, Tessália, Pâmela, Meritxell, Clarissa, Marcela e aos bioinfos, Vinícius, Anderson, Luis, Eudes, Siomar, e todos do grupo, muito obrigada pelo carinho e atenção!

À minha família, e ao Sandro pelo amor e por estar ao meu lado, sempre compartilhando as escolhas certas.

A todos os amigos e aqueles que contribuíram e apoiaram a minha formação.

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria que causa a Linfadenite Caseosa (LC) em pequenos ruminantes, promovendo redução da produtividade dos animais infectados. A doença se caracteriza pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais e/ou órgãos internos. Vários métodos diagnósticos para a LC na forma subclínica foram desenvolvidos, mas nenhum deles com eficácia e praticidade satisfatórias. Assim, neste trabalho foi realizada a padronização de um Teste Intradérmico de Hipersensibilidade (TIH) com proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* para o diagnóstico subclínico da LC em pequenos ruminantes. Os animais utilizados nos experimentos foram avaliados através de exames clínicos e laboratoriais, e separados em dois grupos constituídos de 10 caprinos positivos (grupo A) e 10 caprinos negativos (grupo B) para a LC. Paralelamente, as proteínas secretadas da linhagem bacteriana MIC6 de *C. pseudotuberculosis* foram extraídas através da técnica de fracionamento em três fases (TPP) e quantificadas pelo método de Bradford. Posteriormente, o TIH foi padronizado e aplicado por via intradérmica na dose de 0,1mL na região cervical esquerda em uma área tricotomizada. Nos mesmos animais foi aplicado 0,1mL de Tris-HCl (pH 7,4) sem as proteínas secretadas, na região cervical direita para controle do experimento. As mensurações do TIH foram realizadas com cutímetro Hauptner, antes da inoculação e a cada 24h nos seis dias subsequentes. O grupo A apresentou a média geral dos valores do TIH em todos os dias avaliados, significativamente superior ao grupo B. Nas primeiras 24h houve um pico de reação, com maior evidência no grupo A, declinando até as 72h, com retorno à normalidade após 96h da aplicação do TIH. Todos os controles mantiveram seus valores semelhantes em ambos os grupos e ao decorrer dos dias avaliados. O TIH padronizado para diagnóstico subclínico da LC em caprinos demonstrou resultados promissores e será aprimorado para utilização no controle da LC.

Palavras-chave: Teste Intradérmico de Hipersensibilidade, Linfadenite Caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is a bacterium that can cause Caseous Lymphadenitis (CLA) in small ruminants and consequently reduce the productivity of infected animals. The disease is characterized by the formation of abscesses in superficial lymph nodes and / or internal organs. Several diagnostic methods for the subclinical form of CLA have been developed, but none of them with satisfactory efficiency and practicability. Thus, a standardized Intradermal Hypersensitivity Test (IHT) with proteins secreted by *C. pseudotuberculosis* for the diagnosis of subclinical CLA in small ruminants was developed in this study. The animals used in experiments were evaluated by clinical examination and laboratory assays and separated into two groups consisting of 10 positive goats (group A) and 10 negative goats (group B) for CLA. In parallel, proteins secreted from the bacterial strain MIC6 of *C. pseudotuberculosis* were extracted using the technique of three-phase partitioning (TPP) and quantified by the method of Bradford. Subsequently, the IHT has been standardized and applied intradermally at a dose of 0.1 mL in the left cervical region in a shaved area. In order to control the experiment it was applied 0.1 mL of Tris-HCl (pH 7.4) without the secreted proteins in the right cervical region in the same animals. The measurements of the IHT were performed with a Hauptner® cutimeter before inoculation and every 24 hours in six days. Group A showed the overall mean of the values of HIT on all days studied, significantly higher than in Group B. In the first 24 hours there was a peak of reaction, most obviously in group A, declining until 72h, tending to normality after 96 hours of application of HIT. All controls maintained their similar values in both groups during all days of evaluation. The standardized IHT for subclinical CLA diagnosis in goats showed promising results and will be improved for use in the control of the CLA.

Keywords: Intradermal Hypersensitivity Test, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Caseous Lymphadenitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da fazenda. Baias divisoras dos animais.	30
Figura 2. Coleta a vácuo de sangue por punção de jugular.	31
Figura 3. Região cervical tricotomizada.	32
Figura 4. Mensuração da espessura da dobra de pele com cutímetro de Hauptner®.	33
Figura 5. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores de DO. obtidos no ELISA.	36
Figura 6. Valores médios gerais do aumento da espessura da dobra de pele obtidos pela reação ao Teste Intradérmico de Hipersensibilidade em relação ao controle.	40
Figura 7. Valores médios relativos da espessura da pele dos caprinos após a aplicação do TIH nos dois grupos experimentais.	41
Figura 8. Valores médios relativos da espessura da pele de caprinos no local de aplicação do TIH sem as proteínas secretadas nos dois grupos experimentais.	43
Figura 9. Valores absolutos médios da espessura da pele de caprinos. Diferença entre os valores relativos do TIH e ct aplicados nos mesmos animais para os dois grupos experimentais.	45
Figura 10. Representação gráfica dos valores absolutos finais do aumento da espessura da pele em cada momento de leitura.	47
Figura 11. Ponto de corte estabelecido para 24h após a aplicação do TIH.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mensuração da espessura da pele de dez caprinos positivos para a Linfadenite Caseosa no ELISA antes e após a aplicação do Teste Intradérmico de Hipersensibilidade.	37
Tabela 2. Mensuração da espessura da pele de dez caprinos negativos no ELISA para a Linfadenite Caseosa antes e após a aplicação do Teste Intradérmico de Hipersensibilidade...	38
Tabela 3. Valores médios gerais do aumento da espessura de pele dos caprinos após aplicação do TIH	39
Tabela 4. Mensuração relativa da espessura de pele de caprinos após a aplicação do TIH nos dois grupos experimentais	41
Tabela 5. Mensuração relativa da espessura de pele de caprinos após a aplicação do TIH sem as proteínas secretadas nos dois grupos experimentais	42
Tabela 6. Mensuração absoluta da espessura de pele de caprinos após a aplicação do TIH nos dois grupos experimentais	44
Tabela 7. Mensuração absoluta final da espessura de pele de caprinos após a aplicação do TIH nos dois grupos experimentais	46
Tabela 8. Validação dos parâmetros do TIH em relação à triagem realizada por ELISA nos animais submetidos ao teste.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Albumina do soro bovino
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
g	Gramas
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
IgG	Imunoglobulina
kDa	<i>Kilodalton</i>
L	Litro
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with electrospray ionization</i>
LGCM	Laboratório de Genética Celular e Molecular
M	Molar
MALDI-TOF/TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry</i>
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
PBS-T	Tampão fosfato salina contendo Tween 20
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
U	Unidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Gênero <i>Corynebacterium</i>	13
1.1.1	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> : aspectos gerais e microbiológicos....	13
1.1.2	Fatores de virulência	14
1.1.3	Estudos com proteínas extracelulares de <i>C. pseudotuberculosis</i>	15
1.2	Linfadenite Caseosa	17
1.2.1	Epidemiologia e impactos	17
1.2.2	Patogênese.....	18
1.2.3	Tratamento e imunoprofilaxia.....	20
1.2.4	Diagnóstico	22
1.2.4.1	Diagnóstico padrão-ouro.....	22
1.2.4.2	Diagnóstico molecular	23
1.2.4.3	Diagnóstico sorológico	23
1.2.4.4	Teste Intradérmico de Hipersensibilidade.....	24
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Linhagens bacterianas e condições de cultivo	28
4.2	Obtenção das proteínas secretadas a partir da técnica de fracionamento em três fases (TPP)	28
4.2.1	Determinação da concentração protéica	28
4.3	Padronização do TIH.....	29

4.4	Seleção dos animais	29
4.4.1	Características da propriedade e rebanho.....	29
4.4.2	Exames clínicos	30
4.4.3	Exame sorológico.....	30
4.4.3.1	Coleta de sangue	30
4.4.3.2	ELISA	31
4.5	Aplicação do TIH	32
4.6	Monitoramento dos animais hipersensibilizados	32
4.6.1	Exames clínicos	32
4.6.2	Mensuração da espessura da pele.....	33
4.7	Análise estatística	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Proteínas secretadas extraídas e determinação da concentração e dose. 35	
5.2	Divisão dos grupos experimentais	35
5.2.1	Avaliação clínica dos animais.....	35
5.2.2	Triagem sorológica dos animais	35
5.3	Teste Intradérmico de Hipersensibilidade	36
5.4	Acurácia do TIH	47
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÕES	58
8	PERSPECTIVAS	59
	REFERÊNCIAS	60

ANEXO 1. Depósito do pedido de Patente	70
ANEXO 2. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal	77
ANEXO 3. Tabelas com a mensuração da espessura da pele de cada animal submetido aos testes.	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium* pertence ao grupo denominado CMNR inserido na classe das actinobactérias, o qual é composto pelos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Este grupo é caracterizado pela organização da parede celular baseada num grande complexo polimérico de peptidoglicano, arabinogalactano e ácido micólico, além de um alto conteúdo G+C no seu genoma (Dorella *et al.*, 2006).

Este gênero foi originalmente criado por Lehman & Neumann (1896) para acomodar o bacilo *C. diphtheriae* e algumas outras espécies patogênicas. Posteriormente, o grupo passou a acomodar diversas outras espécies de bactérias que diferiam em forma, patogenicidade e esporulação (Pascual *et al.*, 1995).

Corynebacterium glutamicum é altamente utilizada na produção de aminoácidos, como L-aspartato e L-lisina (Koffas & Stephanopoulos, 2005). Podem-se destacar ainda, *C. diphtheriae*, agente causador da difteria e *C. jeikeium*, microrganismo responsável por infecções nosocomiais em humanos (Tauch *et al.*, 2005). Outra espécie de destaque no gênero, devido a sua importância veterinária, é o microrganismo patogênico *C. pseudotuberculosis*, agente etiológico causador da Linfadenite Caseosa (LC).

1.1.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*: aspectos gerais e microbiológicos

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, parasita intracelular facultativa, exibe formas pleomórficas que variam desde cocóides a bastões filamentosos e medem 0,5µm a 0,6µm por 1µm a 3µm de tamanho. Possui fimbrias, é imóvel, não possui cápsula e não esporula (Jones & Collins, 1986).

O crescimento de *C. pseudotuberculosis* na superfície do ágar é inicialmente espaçado na superfície e, posteriormente, se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico e de coloração creme alaranjado; já em meio líquido, desenvolve-se como depósitos granulares. As condições ótimas de crescimento são a 37°C em pH entre 7,0 e 7,2, e a anaerobiose é facultativa (Dorella *et al.*, 2006). Outro aspecto microbiológico de relevância é a hemólise variável que ocorre quando a bactéria é crescida em meio ágar-sangue (Jones & Collins, 1986).

Além das características morfo-tintoriais, *C. pseudotuberculosis* pode ser caracterizada por provas bioquímicas que variam consideravelmente, principalmente quanto a suas habilidades de fermentação. Todas as linhagens produzem ácido, mas não gás, a partir de muitas fontes de carbono, incluindo glicose, frutose, galactose, manose e sacarose (Merchant & Packer, 1967; Buxton & Fraser, 1977; Holt *et al.*, 1994). A bactéria é fosfolipase D e catalase positiva, oxidase negativa e beta-hemolítica (Buxton & Fraser, 1977). A produção de nitrato redutase foi utilizada por Biberstein *et al.* (1971) para distinguir o biovar *equi* (isolado de equino e bovino; redução de nitrato positiva) do biovar *ovis* (isolado de ovino e caprino; redução de nitrato negativa).

1.1.2 Fatores de virulência

Com relação aos fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis*, o conhecimento é escasso sobre os mecanismos moleculares e as bases genéticas da virulência. No entanto, são crescentes os estudos a cerca da compreensão destes mecanismos.

Atualmente, apenas a exotoxina fosfolipase D e os lipídeos da parede celular são os fatores de virulência mais bem caracterizados.

A fosfolipase D (PLD) é considerada como o principal fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*, sendo caracterizada como uma potente exotoxina produzida por esta bactéria (Lipsky *et al.*, 1982; Hodgson *et al.*, 1999). Esta toxina auxilia a hidrólise de ligações éster de fosfolipídeos da membrana de células de mamíferos, atuando como um fator de permeabilidade que contribui para a dispersão da bactéria do sítio inicial de infecção para os sítios secundários do hospedeiro (Carne & Onon, 1978; Coyle & Lipsky, 1982; McNamara *et al.*, 1995). A disseminação da bactéria por ação da PLD pode ser explicada pela ação dermonecrótica que a mesma exerce danificando as células endoteliais. Isto promove o extravasamento de plasma dos pequenos vasos sanguíneos da derme e o acesso aos vasos linfáticos (Egen *et al.*, 1989; Songer, 1997). Essa exotoxina é considerada leucotóxica, o que contribui para as lesões e a destruição de macrófagos de caprinos durante infecção com *C. pseudotuberculosis* (Tashjian & Campbell, 1983). O papel da PLD na virulência da bactéria evidenciou-se após a geração de linhagens mutantes para o gene *pld* uma vez que não foram capazes de se disseminar e induziram uma resposta imunológica, apesar de não totalmente satisfatória contra *C. pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1992).

Os lipídeos da parede celular de *C. pseudotuberculosis* foram descritos como importantes fatores para a patogênese da doença e estão mais presentes nas linhagens mais virulentas do que nas linhagens atenuadas (Hard, 1972; Jolly, 1966). Estes lipídeos de superfície permitem a aderência dos microrganismos e promovem uma citotoxicidade local, além de formarem uma camada lipídica que protege contra a ação degradativa das enzimas presentes no fagolisossomo do hospedeiro (Alves *et al.*, 1997). A toxicidade do material lipídico extraído foi demonstrada pela indução de necrose hemorrágica após injeção intradérmica em cobaias (Jolly, 1966) e, segundo Muckle & Gyles (1982), há uma relação direta entre a porcentagem de lipídeos de superfície e a indução de abscessos crônicos.

Estudos demonstraram que um grupo de genes envolvidos com a absorção de ferro tem papel na virulência de *C. pseudotuberculosis* (Billington *et al.*, 2002). Os quatro genes neste provável operon foram identificados próximos ao gene *pld* no genoma de *C. pseudotuberculosis* e designados como genes *fag* A, B, C e D. Por ser responsável pela aquisição de ferro nesse microrganismo, esse operon representa um importante fator de virulência, por fornecer à bactéria uma maior capacidade de sobreviver à ambientes hostis, como o intracelular. Embora não haja alteração na utilização de ferro por um mutante para *fag* B(C) *in vitro*, este apresenta uma habilidade diminuída para sobreviver e causar abscessos em cabras infectadas experimentalmente (Billington *et al.*, 2002).

Além do conhecimento prévio destes fatores de virulência, pouco se sabe sobre as vias de patogenicidade deste organismo. Com o intuito de desvendar estas vias, o nosso grupo de trabalho vem estudando o controle da expressão gênica em *C. pseudotuberculosis* durante a infecção *in vitro* e *in vivo*, a fim de detectar novos genes provavelmente envolvidos com a virulência. Estes trabalhos estão concentrados principalmente no estudo de fatores sigma ECF (do inglês, *extracytoplasmic function*) da RNA polimerase bacteriana, que são responsáveis pela mudança do padrão de expressão gênica da bactéria em situações nas quais ela se depara com condições de estresse, como mudanças bruscas de temperatura ou de pH (Castro, 2009; Pacheco, 2009).

1.1.3 Estudos com proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis*

Os patógenos intracelulares, como *C. pseudotuberculosis* podem se adaptar a condições adversas ambientais, além de resistir à ação da resposta imunológica do hospedeiro. Para que isso ocorra, mudanças da expressão gênica e moléculas secretadas exercem um papel

importante para uma infecção de sucesso (Kazmierczak *et al.*, 2005). Assim, pesquisas no campo da proteômica abrangem estudos sistemáticos das proteínas expressas em organismos e auxiliam a compreensão dos mecanismos moleculares e bioquímicos que culminam com a instalação e progressão da doença (Matt *et al.*, 2008).

A secreção de moléculas efetoras é um dos principais mecanismos de interação dos patógenos intracelulares com as células hospedeiras. Portanto, as proteínas secretadas representam uma fração importante dos determinantes moleculares de virulência de diversas bactérias patogênicas. Quando estas colonizam células ou tecidos de mamíferos, suas proteínas secretadas medeiam a adesão ao hospedeiro, com destruição do tecido ou interferindo com o sistema imunológico. Nestas bactérias, variações de proteínas secretadas entre linhagens de determinadas espécies podem indicar seus papéis na evasão da resposta imunológica (Jankovic *et al.*, 2007).

Dessa forma, as proteínas secretadas bacterianas são essenciais para uma série de aplicações, desde a identificação de enzimas até o entendimento da virulência do organismo (Jankovic *et al.*, 2007); já que as mesmas estão envolvidas na adesão, invasão, multiplicação, evasão do sistema imune e danos ao hospedeiro (Wooldridge *et al.*, 2009). Caracterizam ainda o secretoma bacteriano, que compreende estudos de uma ampla gama de proteínas, como receptores, adesinas, transportadores, enzimas secretadas, toxinas e fatores de virulência, que são responsáveis pelas interações com o ambiente em que a bactéria se encontra (Hansmeier *et al.*, 2006; Hautefort *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2008).

Devido à grande importância das proteínas secretadas, diversos estudos com este tipo de proteína vêm sendo conduzidos em *C. pseudotuberculosis* com o objetivo de identificar possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico, além de caracterizar fatores de virulência que contribuem para a progressão e instalação da LC. Braithwaite e cols. (1993), ao extraírem proteínas do sobrenadante de uma cultura de *C. pseudotuberculosis*, realizaram um SDS-PAGE seguido de *Western blot*, que possibilitou a visualização de sete proteínas com pesos moleculares entre 14-64 kDa, das quais cinco reagiram com soros de caprinos infectados.

Através de uma idealização de nosso grupo de pesquisa na UFMG, juntamente com o grupo da UFBA, Paule *et al.* (2004) estabeleceram um protocolo eficiente para extração de proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* baseado na técnica de fracionamento em três fases (TPP). Esta técnica possui um procedimento simples e eficiente para purificar proteínas, em que a fração protéica é precipitada entre a interface aquosa e orgânica através da ação do

sulfato de amônio e butanol. Verificaram ainda que as proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* extraídas e concentradas pela técnica de TPP, reagiram com um pool de soros de caprinos com LC (Paule *et al.*, 2004) e induziram uma elevada produção de IFN- γ em sangue de caprinos infectados com essa bactéria (Meyer *et al.*, 2005).

A técnica de TPP, por apresentar uma boa escalabilidade, mostrou-se útil para a produção de antígenos protéicos de *C. pseudotuberculosis* para estudos com diversas abordagens, como estudos da patogenia, vacinas e diagnóstico da LC. Em 2009, Seyffert e colaboradores, identificaram 6 proteínas extracelulares reativas contra o soro de caprinos infectados por *C. pseudotuberculosis* através de estratégias de imunoproteômica, utilizando eletroforese bidimensional (2-DE), *Western blotting* e espectrometria de massa.

Em 2010, Santos e colaboradores fizeram a predição *in silico* de 95 e 107 proteínas extracelulares das linhagens 1002 e C231 de *C. pseudotuberculosis*, respectivamente. Para tanto, foi utilizado o *software* SurfG (Barinov *et al.*, 2009), onde a predição de proteínas extracelulares é baseada na presença de peptídeo sinal e de vias clássicas de secreção (*Sec*-dependente e *Sec*-independente) em análise da sequência genômica do organismo de interesse.

Neste contexto, Pacheco *et al.* (2011) caracterizaram o exoproteoma das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 (70 proteínas) e C231 (67 proteínas) que resultou em 93 proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis*. A caracterização foi realizada pelo método de extração de proteínas em três fases (TPP) seguido de espectrometria de massas TPP/LC-MS^E. No mesmo ano, Silva (2011), baseado na técnica de eletroforese bidimensional 2-DE associada à espectrometria de massa por MALDI-TOF-TOF, identificou 60 proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis*. Estes resultados validaram experimentalmente proteínas preditas anteriormente *in silico* e ampliaram o banco de dados de proteínas extracelulares do nosso grupo de pesquisa que detém 80 proteínas da linhagem 1002 e 74 da linhagem C231 caracterizadas experimentalmente.

1.2 Linfadenite Caseosa

1.2.1 Epidemiologia e impactos

A LC é uma enfermidade prevalente em diversos países que apresentam intensa atividade de ovino e caprinocultura, como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados

Unidos, Canadá e Brasil, (Williamson, 2001; Arsenault *et al.*, 2003; Paton *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2009). O Brasil é o 8º maior criador de ovinos e caprinos do mundo com cerca de 16 milhões e 10,3 milhões de cabeças respectivamente. Em 2004, o Brasil exportou para a União Européia 300 toneladas de peles de ovinos, contabilizando US\$ 524 mil (IEA, 2005).

Em relação à economia, a LC é responsável por perdas significativas relacionadas à redução da produtividade (lã, carne e leite), eficiência reprodutiva e condenação de carcaças e couro dos animais infectados, levando a grandes prejuízos econômicos no Brasil e no mundo (Dorella *et al.*, 2006, Guimarães *et al.*, 2009). Estima-se que 30% do rebanho nacional brasileiro esteja acometido pela doença. No Estado da Bahia, onde se concentra a maior parte do rebanho nacional de caprinos (33,7%), o prejuízo causado pela incidência da doença chega próximo de R\$ 4 milhões de reais por ano (Oliveira, 2007). Apesar do Estado de Minas Gerais possuir um rebanho reduzido, 84,3% dos produtores já relataram ter problemas como consequência da patologia e em análise soropidemiológica da enfermidade com 205 propriedades do Estado, foi constatada uma elevada soroprevalência da LC de 78,9% para caprinos e 75,8% para ovinos, demonstrando a necessidade do desenvolvimento de um teste diagnóstico precoce e eficiente (Guimarães *et al.*, 2009; Seyffert *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2011).

1.2.2 Patogênese

C. pseudotuberculosis é capaz de infectar diversos animais, como cabras, ovelhas, cavalos, alpacas, lhamas, búfalos, camelos, antílopes e primatas (Baird & Fontaine, 2007). Apesar de possuir essa capacidade ampla de infecção em animais, atribui-se a essa bactéria um baixo potencial zoonótico, uma vez que esteve associada à ocorrência de 25 casos de infecção humana até o ano de 2005 (Liu *et al.*, 2005).

Em caprinos ou ovinos a transmissão pode ocorrer por contato direto com secreções e por materiais contaminados pelo conteúdo caseoso de linfonodos ou de descargas nasais de animais com pneumonia. A entrada da bactéria no organismo é facilitada por lesões na pele, contudo, pode penetrar até mesmo na pele intacta (Williamson, 2001; Dorella *et al.*, 2006).

Após penetrar no organismo, a bactéria é fagocitada por macrófagos não ativados, incapazes de eliminá-la, que se degenerarão (Hard, 1972). Essa incapacidade de responder à infecção é atribuída à ausência de produção de óxido nítrico quando estimulados com componentes antigênicos de *C. pseudotuberculosis* (Bogdan *et al.* 1997). Conseqüentemente,

resistindo ao compartimento do fagolisossomo, as bactérias infectam outros macrófagos, e por causar a morte destas células do sistema imunológico, se espalham para o linfonodo drenante local ocasionando a formação de lesões necróticas (Jones *et al.*, 2000). A partir do início de um novo ciclo de replicação, as bactérias conseguem colonizar os linfonodos e sobreviver, podendo atingir diversos órgãos e células. A disseminação envolve a ação de um determinante de virulência, a exotoxina fosfolipase D (Airello *et al.*, 2001). Na tentativa de conter e eliminar o microrganismo, ocorre a formação de granulomas (Jones *et al.*, 2000).

Esta lesão se inicia pelo aparecimento de células epitelióides substituídas posteriormente por necrose caseosa, que vai sendo circundada por células epiteliais, linfócitos e por uma camada de tecido conjuntivo fibroso, respectivamente. Esse processo de formação do granuloma é crônico e se repete sucessivamente sobre a camada fibrosa, resultando no aspecto macroscópico desta patologia caracterizada por uma massa esférica laminada, como as camadas de uma cebola (Jones *et al.*, 2000). Este processo é dependente da imunidade adaptativa, que nesse caso é complexa e envolve tanto uma resposta humoral como uma resposta celular mediada por Linfócitos T (Paule, 2003).

Pépin e colaboradores (1994) observaram maior quantidade de linfócitos T CD8 em granulomas no sítio de inoculação em comparação com aqueles presentes em linfonodos drenantes. Esta subpopulação está relacionada com a atividade efetora/citotóxica, pode atuar como supressora e aumentar com o amadurecimento da lesão em relação a outras subpopulações de linfócitos, como os CD4. Em estudos realizados durante uma infecção experimental, o perfil de citocinas expressas permitiu uma correlação com as observações da proporção da subpopulação de linfócitos presentes no granuloma (Pépin *et al.* 1994). Foi constatado pelo autor que: (i) existe uma maior proporção de células T CD8 nos granulomas formados no sítio de inoculação em comparação aos observados nos linfonodos drenantes; (ii) o amadurecimento das lesões traduz-se pelo aumento relativo na proporção de células T CD8 e T γ em relação às células T CD4.

Nestas infecções é observada a predominância dos linfócitos T CD8, que atuam diretamente ou como células citotóxicas, ou como ativadoras de macrófagos via IFN- γ (Kaufmann, 1993).

Em relação ao perfil de citocinas expressas, há prevalência das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ principalmente no local da infecção (Ellis *et al.*, 1991; Pepin *et al.*, 1997). Pepin *et al.* (1997) demonstraram em um estudo que a estimulação de IFN- γ bem como a formação de granulomas são independentes da presença da PLD. Eles também

verificaram, em estudo experimental, que a expressão de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α foi elevada no sítio de inoculação, enquanto que a expressão de citocinas associadas às células T, como IL-2 e IL-4, eram mais elevadas no linfonodo drenante. Levando em conta os níveis de expressão de citocinas Pepin *et al.* (1997) sugeriram que a formação do granuloma pode estar diretamente relacionada aos dois tipos de resposta Th1 e Th2. E ainda, que citocinas inflamatórias, que apresentam níveis elevados no início da formação do granuloma, como IFN- γ , IL-2, IL-4, MCP-1 e TNF- α , são importantes fatores na diminuição da disseminação da bactéria.

A resposta humoral também tem sido investigada. Cameron & Engelbrecht (1978), demonstraram a proteção por anticorpos, através da imunização passiva em camundongos com soro de coelhos imunizados contra *C. pseudotuberculosis*. O efeito protetor foi associado à capacidade dos anticorpos atuarem contra a disseminação da bactéria. Em estudo realizado por Muckle *et al.* (1992) foi identificado através da técnica de *Western Blotting*, utilizando antígenos de parede celular, que anticorpos presentes no soro de animais infectados com *C. pseudotuberculosis* reconheceram uma grande quantidade de proteínas. Entretanto apesar das evidências de exacerbada resposta humoral, esta não foi capaz de eliminar a infecção. Yozwiak & Songer (1993), observaram que a presença de anticorpos anti-fosfolipase D antes da infecção, exercem um efeito protetor, dificultando a disseminação da bactéria para os linfonodos.

1.2.3 Tratamento e imunoprofilaxia

O tratamento da LC pode ser realizado através do uso de antibióticos, como também pela drenagem e extirpação dos linfonodos superficiais acometidos, no entanto ambas as estratégias não são eficientes. Na primeira, as drogas administradas não conseguem penetrar na cápsula dos abscessos e na segunda, além de não se obter êxito na eliminação da totalidade das bactérias, quando os linfonodos e órgãos internos estão acometidos, esta estratégia não se aplica (Williamson, 2001). Como consequência da aplicação desses métodos de tratamentos, pode ocorrer contaminação ambiental com o patógeno, pois um único abscesso pode ser capaz de infectar todo o rebanho devido à grande quantidade de bactéria que o mesmo pode conter. Portanto, o controle e a prevenção podem ser considerados como estratégias mais viáveis (Guimarães *et al.*, 2009).

Como não há um tratamento efetivo contra a LC, é preconizado o uso de medidas profiláticas com o objetivo de tentar conter essa doença. Assim, é importante a identificação dos animais infectados, impedindo que os mesmos tenham contato com os animais saudáveis (Williamson, 2001, Dorella *et al.*, 2006). Os procedimentos de manejo devem incluir a higienização de todos os instrumentos e ambientes para evitar a disseminação bacteriana (galpões, troncos de tosquia e baias) (Guimarães *et al.*, 2009). Na aquisição dos animais, deve-se levar em consideração o histórico livre da patologia e a realização da quarentena dos mesmos (Airello *et al.*, 2001).

Considerando os fatos mencionados, e que o tratamento da LC pode ser de alto custo e ineficaz, uma medida preventiva ideal com um bom custo-benefício seria a imunização, impedindo a entrada e a disseminação do microrganismo nos rebanhos (Dorella *et al.*, 2006).

Atualmente, não há uma vacina capaz de conferir proteção contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*. Existem algumas vacinas disponíveis no mercado nacional e internacional, no entanto, as mesmas apresentam aspectos relevantes a serem considerados quanto à possibilidade de sua utilização. Nem todas as vacinas licenciadas para ovinos têm, por exemplo, a mesma eficiência para caprinos e, por não se adequarem a todos os casos, normalmente é necessário ajustar o programa de vacinação a cada caso (Williamson, 2001). Os problemas do processo de imunização podem também estar associados ao uso incorreto das vacinas pelos criadores. Vários estudos mostram diferentes estratégias que vêm sendo testadas na busca por uma vacina eficiente, como o uso de bactérias atenuadas, mortas, frações contendo antígenos da parede bacteriana, do sobrenadante de cultura bacteriana, uma mistura de componentes celulares e sobrenadantes e ainda existem as vacinas de DNA (LeaMaster *et al.*, 1987, Holstad, 1989, Ellis *et al.*, 1991, Eggleton *et al.*, 1991; Costa *et al.*, 2011). Todas as preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais e naturais; contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis.

No Brasil, existem algumas vacinas disponíveis para uso, como a vacina viva atenuada produzida a partir da cepa 1002 da *C. pseudotuberculosis*, desenvolvida pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A (EBDA) e a vacina Biodectin (Pfizer) que contém toxóides purificados de *Clostridium septicum*, agente etiológico do edema maligno, *Cl. novyi* Tipo B (hepatite necrótica), *Cl. tetani* (tétano), *Cl. perfringens* tipo D (enterotoxemia) e culturas inativadas de *Cl. chauvoei* (carbúnculo sintomático) e uma fração do *C. pseudotuberculosis* e um anti-helmíntico (moxidectina). No entanto, todas essas vacinas ainda necessitam de uma

avaliação quanto à sua eficácia nos rebanhos de caprinos e ovinos. A baixa frequência de vacinação reflete a pouca disponibilidade comercial das mesmas (Guimarães *et al.*, 2011 e Seyffert *et al.*, 2011). Com a baixa frequência de vacinação em MG (Guimarães *et al.*, 2009) infere-se que a soropositividade é indicativa de infecção do microrganismo.

Recentemente, Dorella *et al.* (2006), por meio de mutagênese aleatória utilizando o sistema de transposição baseado no TNFuZ, identificaram 34 mutantes de *C. pseudotuberculosis*. Após experimentos de imunização observou que um desses mutantes (CP13) apresentou 81% de proteção em modelo murino, após o desafio com a linhagem selvagem, o que demonstra ser um alvo promissor para a obtenção de uma nova vacina viva atenuada contra a LC (Dorella, 2009). Estes dados de proteção estão sendo confrontados com dados de testes pilotos realizados em caprinos, com o objetivo de verificar a manutenção dos índices de proteção, bem como o surgimento de efeito colateral ocasionado pela imunização (Dorella *et al.*, 2011).

1.2.4 Diagnóstico

1.2.4.1 Diagnóstico padrão-ouro

O diagnóstico clínico da LC é baseado essencialmente na observação macroscópica dos abscessos superficiais externos. O teste definitivo considerado como padrão-ouro, atualmente é realizado a partir do isolamento da bactéria diretamente do conteúdo caseoso dos linfonodos acometidos e cultivo bacteriológico, seguido por testes bioquímicos (Ribeiro *et al.*, 2001; Williamson, 2001). O teste bioquímico bem estabelecido para a identificação de bactérias corineformes é o sistema API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme lês Grottes, France). Esse método consiste de uma bateria de 21 testes bioquímicos que podem ser realizados entre 24 e 48 h. O sistema contém 20 tubos contendo substratos que permitem testes para 11 enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil arilamidase, β -galactosidase, fosfatase alcalina, α -glucosidase, N-acetilglucosaminidase, β -glucoronidase, redução de nitrato e hidrólise de esculina e uréia) e 8 testes de fermentação de carboidratos (glucose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sucrose e glicogênio).

1.2.4.2 Diagnóstico molecular

Na busca por estratégias envolvendo o diagnóstico preciso da LC através de técnicas moleculares, em 2002, Çetinkaya e cols. propuseram um teste baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar isolados de *C. pseudotuberculosis* através da amplificação parcial da sequência do gene do RNA ribossômico 16S (16S rRNA), que é muito utilizado em estudos taxonômicos microbianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de LC em caprinos e ovinos, no entanto o teste apresentou algumas limitações: (i) dependência da cultura bacteriológica e (ii) incapacidade de distinguir *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans*. Este fato pode ser atribuído a alta similaridade genômica entre estas duas bactérias.

Nesse contexto, o nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) desenvolveu um ensaio de multiplex PCR, com o intuito de obter um diagnóstico mais rápido e eficiente. A principal vantagem deste ensaio é a utilização de genes específicos para distinguir *C. pseudotuberculosis* de outras bactérias filogeneticamente similares e, além disso, este teste possibilita a utilização do DNA extraído diretamente de amostras clínicas. Os genes alvos da reação são: 16S rRNA, que é um gene conservado em gêneros bacterianos, o *rpoB*, gene relacionado a estudos filogenéticos de microrganismos dos gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* e o gene *pld* que codifica a exotoxina PLD, principal fator de virulência de *C. pseudotuberculosis* (Pacheco *et al.*, 2007).

Este teste demonstrou boa especificidade analítica sendo capaz de distinguir *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans* e obteve uma sensibilidade de 94,%, demonstrando a eficácia diagnóstica (Pacheco *et al.*, 2007). No entanto, apesar deste novo método de diagnóstico ter tido sucesso, o mesmo apresenta limitações por não detectar o microrganismo em amostras sorológicas, não sendo utilizado no diagnóstico subclínico da LC.

1.2.4.3 Diagnóstico sorológico

Diversas estratégias sorológicas foram desenvolvidas para estabelecer um diagnóstico subclínico no combate a LC. No século XX, vários trabalhos científicos foram publicados, relacionados a novos métodos de identificação, tanto de proteínas bacterianas quanto de proteínas do sistema imunológico, provenientes da relação parasita-hospedeiro.

Um dos primeiros testes foi o de soroneutralização em ovinos para a identificação de antitoxinas de *C. pseudotuberculosis* nesses animais (Carne, 1940). Em seguida, surgiram as

primeiras provas de soro-aglutinação que foram sendo aperfeiçoadas no decorrer dos anos (Cameron & McOmie, 1940; Awad, 1960; Kestintepe, 1976; Burrel, 1978; Shigidi 1979; Lund *et al.* 1982), bem como diversas técnicas já existentes que foram adaptadas para o diagnóstico da LC. Dentre elas, a Imunodifusão em gel (Shigidi, 1974; Burrel, 1980b; Nain *et al.* 1984), Hemaglutinação indireta passiva (Shigidi, 1978), Fixação de Complemento (Shigidi, 1979) e Inibição da hemólise em tubo (Burrel, 1980a).

Com a finalidade de avaliar algumas técnicas de diagnósticos mencionadas, alguns estudos comparativos foram realizados, porém os resultados foram pouco conclusivos. Shigidi (1979) verificou que o teste de inibição da hemólise era menos sensível do que a hemaglutinação indireta. Lund *et al.* (1982) observou alta correlação entre o teste de Soro-aglutinação e Inibição da Hemólise Sinérgica.

Os primeiros testes ELISA para a detecção de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis*, começaram a ser empregados no diagnóstico da LC nos anos 80, (Shen *et al.*, 1982; Johnson *et al.*, 1987), já sendo constatada uma maior sensibilidade quando comparado com o teste de Inibição da Hemólise (Maki *et al.*, 1985). A técnica foi aprimorada, através da utilização de vários antígenos. Estudos envolvendo ELISAs indiretos contendo componentes da célula bacteriana e proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* foram relatados por serem relativamente eficazes em programas de controle da enfermidade (Binns *et al.* 2007; Carminatti *et al.*, 2003). Um teste de ELISA sanduíche com PLD foi desenvolvido, a fim de aprimorar a acurácia do teste em relação aos demais já estabelecidos (Ter Laak *et al.* 1992; Dercksen *et al.*, 2000).

Já no século XXI, foi desenvolvida uma variação da técnica de ELISA, voltada para detectar interferon gama (IFN- γ) como um marcador de imunidade mediada por células contra *C. pseudotuberculosis* (Paule *et al.*, 2003; Menzies *et al.*, 2004). Esta técnica pareceu ser mais sensível do que o ELISA convencionalmente utilizado na detecção de anticorpos, além de não parecer ser afetado pela vacinação dos animais (Dorella *et al.* 2006), o que poderia ser uma saída para diagnosticar a LC de forma mais precisa se não fosse o seu elevado custo.

1.2.4.4 Teste Intradérmico de Hipersensibilidade

Nesse contexto de imunidade mediada por células, alguns antígenos, quando injetados na intraderme, induzem uma resposta inflamatória de desenvolvimento lento, denominada hipersensibilidade retardada, ou tipo IV, mediadas por interações com as células

apresentadoras de antígenos e linfócitos T. As reações de hipersensibilidade retardada podem ser consideradas como uma forma especializada de inflamação direcionada contra organismos que são resistentes à eliminação por processos inflamatórios convencionais (Tizard, 2008). Atualmente é bem padronizado o uso de um teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose em bovinos e experimentalmente em caprinos e ovinos contendo como antígeno a tuberculina PPD (proteína derivada purificada) (Cyrillo, 2009; Silva *et al.*, 2006; MAPA, 2004).

Apesar de atualmente não haver Teste Intradérmico de Hipersensibilidade (TIH) para o diagnóstico da LC, padronizado e aplicado em campo como o teste tuberculínico para a tuberculose, desde o início do século XX, vários pesquisadores realizaram estudos visando a elaboração de um TIH.

Os primeiros antígenos foram elaborados utilizando filtrados de cultura de *C. pseudotuberculosis* e testados primeiramente em cobaias (Cesari, 1930) e posteriormente em ovinos infectados e não infectados pelo microrganismo, demonstrando positividade entre 48 e 72h (Cassamagnaghi, 1931; Cameron & McOmie, 1940; Farid & Mahmud, 1960). Carne (1932) desenvolveu uma pseudotuberculina para o diagnóstico da Linfadenite ovina na Austrália, a partir do procedimento de elaboração da tuberculina de Koch (1932). Em seguida, após vários testes em animais de campo, observou baixa especificidade nos antígenos contidos na pseudotuberculina padronizada e conseqüentemente pouca adequação para o diagnóstico da LC. Costa Filho (1978) utilizou como antígenos do TIH, uma suspensão de cultura bacteriana de *C. pseudotuberculosis* e *C. pyogenes* em caprinos com lesões típicas da LC. Posteriormente, Renshaw *et al.* (1979) e Brown *et al.* (1986) elaboraram um alérgeno a partir de bactérias fragmentadas por sonicação. Langenegger *et al.* (1987) prepararam um alérgeno com proteína hidrossolúvel extraída de bactérias lavadas de *C. pseudotuberculosis*. Alves & Olander (1999) avaliaram o uso de um TIH em caprinos experimentalmente vacinados e infectados com *C. pseudotuberculosis*, porém seus resultados foram condizentes com os resultados de Brown *et al.* (1986), evidenciando a necessidade de purificação dos antígenos utilizados como reagente do teste .

Apesar da praticidade e de ser potencialmente o ideal para um diagnóstico subclínico da enfermidade, os TIH desenvolvidos até então além de não possuírem sensibilidade e especificidade suficientes, ainda não apresentaram uma aplicabilidade comprovada. Assim, o desenvolvimento de um método mais rápido e mais específico para detectar *C. pseudotuberculosis* pode ser de grande valor no diagnóstico da LC.

2 JUSTIFICATIVA

A criação de ovinos e caprinos no Brasil tem se desenvolvido em larga escala nos últimos anos, sendo classificado como 8º maior criador de caprinos e ovinos no mundo. O rebanho efetivo de ovinos em 2010 foi de 17,4 milhões de cabeças, com crescimento de 3,4% frente aos 16,8 milhões de cabeças de 2009 e o rebanho efetivo de caprinos foi de 9,3 milhões de cabeças, com crescimento de 1,6% comparado aos 9,2 milhões de cabeças de 2008. (IBGE, 2010)

A prevalência da LC nos rebanhos brasileiros gera grandes prejuízos econômicos, pois é estimado que 30% do rebanho nacional estejam acometidos pela doença (Ribeiro *et al.*, 2001).

Devido à inexistência de um método diagnóstico satisfatório para LC, principalmente na fase subclínica, o manejo eficaz dos animais é comprometido, o que contribui para a disseminação da doença. O diagnóstico ideal para prevenir a proliferação da enfermidade em um rebanho deve ser sensível e específico o suficiente para detecção da mesma em fase inicial. Com a finalidade de identificar candidatos para o desenvolvimento de testes de diagnóstico, marcadores moleculares e produção de vacinas para combater a LC, nosso grupo de pesquisa do LGCM tem desenvolvido trabalhos utilizando diversas abordagens: genômicas, transcriptômicas e proteômicas. A partir desta última abordagem, Seyffert e colaboradores (2009) desenvolveram um trabalho baseado em imunoproteômica com objetivo de identificar antígenos extracelulares que fossem reativos contra o soro de caprinos infectados por *C. pseudotuberculosis*. Através de eletroforese bidimensional (2-DE), *Western blotting* e espectrometria de massa foram identificados proteínas extracelulares antigênicas de *C. pseudotuberculosis*. As proteínas secretadas foram descritas primeiramente a partir de estudos envolvendo as técnicas de *Western blot* e ensaios de IFN- γ (Paule *et al.*, 2003, Paule *et al.*, 2004, Meyer *et al.*, 2005; Rebouças *et al.*, 2011). Como esses antígenos foram detectados com o uso de soro de caprinos infectados e induziram uma produção elevada de IFN- γ *in vitro*, concluímos que estas proteínas poderiam ser utilizados na elaboração de testes para o diagnóstico subclínico da LC.

Dessa forma, através deste trabalho avaliamos e padronizamos um TIH com proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* para diagnóstico subclínico da LC em caprinos, de fácil aplicação, para a utilização em programas de controle e erradicação dessa enfermidade nos rebanhos de pequenos ruminantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e padronizar um Teste Intradérmico de Hipersensibilidade (TIH) com proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* para o diagnóstico subclínico da LC em caprinos.

3.2 Objetivos específicos

- Obter as proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* através do método TPP;
- Padronizar a concentração e a dose das proteínas secretadas a serem utilizadas no TIH;
- Monitorar os animais através de testes clínicos;
- Mensurar a resposta de hipersensibilidade dos animais ao TIH padronizado;
- Comparar os resultados obtidos no TIH com o ELISA utilizado como teste padrão de referência;
- Estabelecer o ponto de corte do TIH e sua acurácia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

A linhagem bacteriana selvagem e virulenta MIC 6 de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* fornecida pelo Dr. Roberto Meyer do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia foi utilizada nesse projeto. A referida linhagem foi cultivada sob agitação 37° C em caldo “Infusão Cérebro-Coração” (BHI) e em placas de BHI contendo 1,5% de ágar bacteriológico, conforme Pacheco *et al.* (2007).

4.2 Obtenção das proteínas secretadas a partir da técnica de fracionamento em três fases (TPP)

Para a extração das proteínas extracelulares, a linhagem MIC 6 de *C. pseudotuberculosis* foi pré-cultivada de 12-18h, re-inoculadas (1:100) em 500 mL de meio BHI e incubadas por 24h, sob leve agitação à 37°C. As culturas foram distribuídas em 10 tubos de 50 mL e centrifugadas à 4°C por 20min a 4000rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para um recipiente tipo Erlenmeyer, mantidos no gelo e os precipitados bacterianos foram descartados. Aproximadamente 20mL das amostras foram filtradas com membranas de 0.22µm e transferidos para novos tubos. Em seguida, foram adicionados 6g de sulfato de amônio na concentração de 30% (p/v), o pH da mistura ajustado para 4.0 e 20mL de n-butanol foi adicionado. As soluções foram homogeneizadas em vortex, incubadas à temperatura ambiente por 1h, e centrifugadas à 4°C, a 2000rpm por 10min para a separação em três fases. A precipitação interfacial foi coletada e dissolvida em 0,5 mL de TrisHCl 20 mM (pH 7,4) acrescido de coquetel inibidor de proteases diluído 100X (Sigma) (Paule *et al.*, 2003). O extrato protéico foi concentrado através da ultrafiltração por diafiltração em água destilada, com membranas de 10kDa (Millipore) por 48h, e armazenado em freezer -20°C.

4.2.1 Determinação da concentração protéica

A quantificação das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), através da interação do corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e as macromoléculas protéicas (Sambrook *et al.*, 1989). Para o ajuste da curva padrão foi utilizada soroalbumina (BSA). O teste foi realizado em triplicata e a leitura da absorbância foi feita a 595nm, em espectrofotômetro modelo Labtech.

4.3 Padronização do TIH

Doses de 0,1mL nas concentrações de 1 mg/mL, 0,5mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,05mg/mL de proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* diluídas em solução de Tris-HCl 20mM (pH 7,4) foram elaboradas para realização de um teste piloto em cabras. O objetivo desse teste foi determinar a concentração das proteínas secretadas na dose de 0,1mL a ser utilizada para a validação do TIH em animais. Da mesma forma, as doses de 0,1mL foram testadas nos animais somente com a solução diluente das proteínas secretadas.

4.4 Seleção dos animais

4.4.1 Características da propriedade e rebanho

Os caprinos (*Capra hircus*) testados nesse projeto pertencem a uma fazenda destinada à produção de leite, situada na cidade de Bonfim em Minas Gerais. Os animais e as instalações presentes na propriedade foram gentilmente cedidos pelo produtor para que o TIH fosse testado. O rebanho não tinha histórico de vacinação contra a LC.

A fazenda possui organização e disposição adequadas aos animais, os quais são separados por idade em baias com espaço apropriado para a retirada do leite. O capril localiza-se em um terreno mais alto da fazenda, ensolarado, com fornecimento de água potável. O galpão de abrigo é de madeira, com piso ripado e elevado, evitando que os animais machuquem as patas e proporcionando o trânsito de funcionários para a retirada de dejetos dos animais, respectivamente (figura 1).

Foram avaliadas um total de 128 caprinos adultos, todos adultos, do sexo feminino e da raça Saanen, devidamente identificadas através de correntes numeradas.



Figura 1. Estrutura da fazenda. Baias divisoras dos animais.

4.4.2 Exames clínicos

Todos os animais foram submetidos ao exame clínico, com avaliação do estado geral, coloração de mucosas conjuntivais e funções vitais (Silva *et al.*, 2006).

4.4.3 Exame sorológico

4.4.3.1 Coleta de sangue

Com o auxílio de um funcionário da fazenda imobilizando as cabras, foram coletados 5mL de sangue em tubos à vácuo sem anticoagulante através de punção da jugular (figura 2). Os 128 tubos contendo as amostras de todos os animais e corretamente identificados foram armazenados em caixa de isopor em posição inclinada para facilitar o processo de coagulação sanguínea, com temperatura estável. Em seguida, as amostras foram transportados para Belo Horizonte, por cerca de 1 hora e no laboratório, foram centrifugadas por 10 min a 3.000 rpm para a separação total do soro e do coágulo. Os soros foram retirados e aliquotados em duplicata de microtubos de 2mL, corretamente identificados e armazenados em freezer à - 80°C para a realização dos exames sorológicos.



Figura 2. Coleta a vácuo de sangue por punção de jugular.

4.4.3.2 ELISA

Para a triagem dos animais, foi utilizado o método imunoenzimático ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) com o objetivo de realizar o diagnóstico sorológico da LC, conforme protocolo de Carminati *et al.* (2003) adaptado por Seyffert *et al.* 2010.

Microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Nunc-Immuno™ Plate PolySorp™ Surface, NUNCTM Brand Products) foram sensibilizadas com proteínas secretadas diluídas 1:100 em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 e mantidas a 4°C por 15h. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com tampão salino fosfato pH 7,4 acrescido de Tween 20 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com leite em pó desnatado 0,25% por 1h a 37°C. Após três lavagens com PBS-T, os soros coletados dos animais na triagem foram diluídos 1:100 em PBS-T e adicionados às placas em duplicata. As amostras foram incubadas por 1h a 37°C e, após nova lavagem das placas, foi adicionado o soro anti-igG total de caprinos conjugado com peroxidase (Sigma) diluído em PBS-T, 1: 30.000 e incubado por mais 1h a 37°C. Após cinco lavagens com PBS-T, foram adicionados 50µL da solução reveladora, contendo o substrato ELISA-OPD (ortofenilenodiamina) Peroxidase (Sigma), tampão Citrato - Fosfato e peróxido de hidrogênio a 30%. A placa foi em seguida incubada por 15min à temperatura ambiente em local escuro. Em seguida, foi adicionado 25 µL de solução de parada, composta de ácido

sulfúrico 5%. A leitura da densidade óptica foi realizada à 490nm em espectrofotômetro – Labtech LT-4000.

4.5 Aplicação do TIH

Os TIH foram aplicados em todos os animais selecionados por via intradérmica, na concentração de 0,1 mg/mL de proteínas totais hidrossolúveis, em dose de 0,1 mL na região cervical esquerda, em área previamente tricotomizada com cerca de 4 cm² e higienizada com álcool 70% (Figura 3) O TIH foi inoculado no centro da área tricotomizada com seringas Macclintock® utilizadas para tuberculinização em bovinos. Nos mesmos animais, foi aplicado 0,1mL do tampão diluente sem as proteínas secretadas na região cervical direita para controle do experimento. Todos os procedimentos foram realizados sob certificado número 160/07 do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (anexo).



Figura 3. Região cervical tricotomizada

4.6 Monitoramento dos animais hipersensibilizados

4.6.1 Exames clínicos

Após a aplicação do TIH, todos os animais foram submetidos ao exame clínico novamente, com avaliação do estado geral, coloração de mucosas conjuntivais e funções vitais (Silva *et al.*, 2006).

4.6.2 Mensuração da espessura da pele

A leitura da espessura da dobra de pele foi realizada com um cutímetro de mola, marca Hauptner® antes da inoculação e a cada 24h por 6 dias consecutivos após aplicação do TIH na região cervical esquerda e do teste controle na região cervical direita (Figura 4).



Figura 4. Mensuração da espessura da dobra de pele com cutímetro de Hauptner®

4.7 Análise estatística

Para avaliar a influência do momento de leitura (intragrupo) como o tratamento proposto em relação a cada distinção dos grupos conforme diagnosticado pelo ELISA, os dados foram submetidos inicialmente à análise de variância com o teste pós ANOVA, Kruskal-Wallis, usado para comparar várias amostras independentes. Para avaliar a influência para ambos os grupos para cada momento de leitura (intergrupo), os dados foram submetidos à análise de variância com o teste pós teste t, Man-Whitney que é utilizado para a comparação de dois grupos independentes.

Para os resultados de distribuição foi considerado o nível de significância de 5% de acordo com Sampaio (2002). Os dados foram tabulados e processados no programa Microsoft Office Excel 2007 e Graph Pad-Prism 5 Demo.

Foram estabelecidos os intervalos de confiança de 95% para todos os tempos da leitura (0h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h), em cada tratamento para avaliar as respostas de hipersensibilidade tardia do tipo IV do TIH e as reações mecânicas provocadas pelo teste controle, com o objetivo de padronizar os valores da espessura da pele esperados para os Grupos A e B.

O cálculo do ponto de corte foi adaptado de Rebouças *et al.* (2011) para um intervalo de confiança de 95% e para um “n” amostral de 10 animais por grupo.

5 RESULTADOS

5.1 Proteínas secretadas extraídas e determinação da concentração e dose

A média do rendimento da extração de proteínas secretadas através da técnica de fracionamento em três fases (TPP) foi de 4,5 mg/L de meio líquido BHI.

No experimento piloto foi estabelecido um TIH constituído de uma menor concentração reagente, que foi a de 0,1 mg/mL de proteínas totais hidrossolúveis em Tris-HCl, em dose de 0,1 mL por teste (MAPA, 2004). Uma vez que foi utilizado para suspensão das proteínas utilizadas no TIH, o Tris-HCl passou a ser aplicado como teste controle, uma vez que não foram observadas reações adversas quando o mesmo foi inoculado intradermicamente nos animais.

5.2 Divisão dos grupos experimentais

5.2.1 Avaliação clínica dos animais

Durante o experimento, os animais testados não apresentaram alterações notáveis nas mucosas aparentes ou no estado geral. As funções vitais mantiveram-se dentro dos limites fisiológicos de variação estabelecidos para a espécie caprina em todo o período do estudo (Silva *et al.*, 2006). As lesões típicas da LC não foram observadas nos animais externamente.

5.2.2 Triagem sorológica dos animais

Dos 128 animais testados pelo ELISA, 73 foram diagnosticados como soropositivos para LC, representando uma taxa de 57,1% na fazenda testada. Na figura 5 estão representados as médias e desvios padrão dos valores de Densidade Óptica (DO) obtidos no ELISA para os animais diagnosticados como positivos e negativos (Ponto de corte: 0,316) (Rebouças *et al.*, 2011).

Para compor o Grupo A, foram selecionados aleatoriamente 10 animais que apresentaram o resultado positivo no ELISA (margem de erro de 20% acima do valor de ponto

de corte) e para compor o Grupo B foram selecionados aleatoriamente 10 animais daqueles que apresentaram o resultado negativo no ELISA.

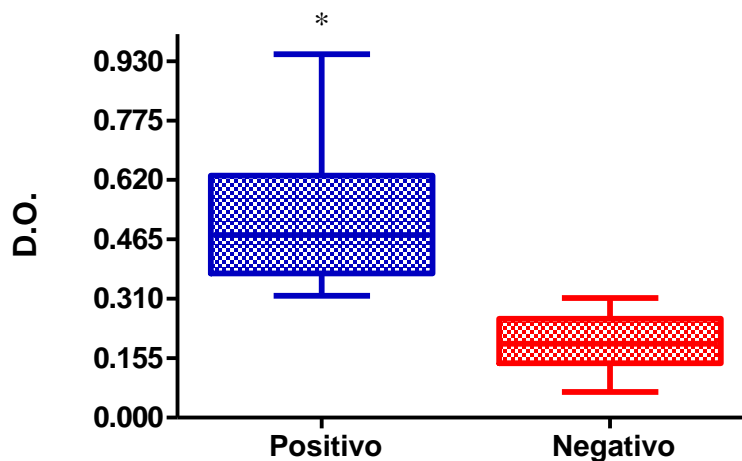


Figura 5. Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores de DO. obtidos no ELISA. Os valores das médias e desvios padrão foram de " 0.516 ± 0.165 " para os 73 animais soropositivos e " 0.197 ± 0.065 " para os 55 animais soronegativos. *($P < 0,05$). Programa: GraphPad Prism Demo5.

5.3 Teste Intradérmico de Hipersensibilidade

Os resultados do Teste Intradérmico de Hipersensibilidade realizados nos grupos A e B estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Mensuração da espessura da pele de dez caprinos positivos para a Linfadenite Caseosa no ELISA antes e após a aplicação do Teste Intradérmico de Hipersensibilidade.

		Teste Intradérmico de Hipersensibilidade																
GRUPO		0h		24h		48h		72h		96h		120h		144h		TIH f	ct f	Resultados
		(a.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)				
		TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct			
A	Média	2,71	2,63	5,21	2,81	4,13	2,69	3,25	2,65	2,59	2,46	2,52	2,46	2,58	2,41	2,50	0,18	2,32
	DP	0,50	0,52	0,82	0,34	0,59	0,16	0,37	0,16	0,25	0,25	0,30	0,27	0,30	0,23	1,01	0,34	0,99
	IC i															1,46	-0,17*	1,30
	IC s															3,54	0,53	3,34

IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

DP = desvio padrão.

a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, antes da inoculação.

p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, após a inoculação.

TIH = Teste Intradérmico de Hipersensibilidade – com as proteínas do secretoma de *C. pseudotuberculosis*

ct = controle – Solução tampão TrisHCl aplicada na região cervical direita como controle do teste.

TIH f = diferença final da espessura da pele em mm (entre 24h e 0h), no local da aplicação do TIH.

ct f = diferença final da espessura da pele em mm (entre 24h e 0h), no local da aplicação da solução controle.

* Valores negativos são estatisticamente iguais à zero.

h= horas

Tabela 2. Mensuração da espessura da pele de dez caprinos negativos no ELISA para a Linfadenite Caseosa antes e após a aplicação do Teste Intradérmico de Hipersensibilidade.

		Teste Intradérmico de Hipersensibilidade																
GRUPO		0h		24h		48h		72h		96h		120h		144h		TIH f	ct f	Resultado
		(a.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)				
		TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct			
	Média	2,46	2,44	3,70	2,56	3,27	2,60	2,77	2,44	2,35	2,35	2,30	2,34	2,36	2,39	1,14	0,16	0,98
B	DP	0,18	0,11	0,57	0,36	0,54	0,21	0,56	0,19	0,14	0,16	0,09	0,10	0,13	0,14	0,63	0,35	0,78
	IC i															0,69	-0,09*	0,42
	IC s															1,59	0,41	1,54

IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

DP = desvio padrão.

a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, antes da inoculação.

p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, após a inoculação.

TIH = Teste Intradérmico de Hipersensibilidade – com as proteínas do secretoma de *C. pseudotuberculosis*

ct = controle – Solução tampão TrisHCl aplicada na região cervical direita como controle do teste.

TIH f = diferença final da espessura da pele em mm (entre 24h e 0h), no local da aplicação do TIH.

ct f = diferença final da espessura da pele em mm (entre 24h e 0h), no local da aplicação da solução controle.

* Valores negativos são estatisticamente iguais à zero.

h= horas

A reação de hipersensibilidade mensurada após a aplicação do TIH revelou um aumento da espessura da pele estatisticamente diferente nos grupos avaliados. Houve uma maior reação de hipersensibilidade, com aumento significativo de mensuração da espessura da pele no grupo de cabras diagnosticadas sorologicamente como positivas para a LC (grupo A), em relação ao grupo de cabras diagnosticadas sorologicamente como negativas para a LC (grupo B) (Tabelas 1 e 2).

Quando comparamos a reação de hipersensibilidade ocasionada pelo TIH com a reação provocada pela inoculação da solução controle (ct) nos mesmos animais, observamos que os grupos (A e B) apresentaram o aumento da espessura da pele após a aplicação do TIH estatisticamente significativo quando comparado às reações mecânicas provocadas pela inoculação da solução controle (ct) em todos os animais (Tabelas 1 e 2).

Os valores médios dos aumentos da espessura de pele de todos os caprinos após a aplicação do TIH e pelo ct estão apresentados na Tabela 3 e representados na Figura 6.

Tabela 3. Valores médios gerais do aumento da espessura de pele dos caprinos após aplicação do TIH

Grupo		TIH (mm)	ct (mm)
A	Média	3,38 ^a	2,58 ^b
	IC i	3,17	2,46
	IC s	3,59	2,70
B	Média	2,79 ^b	2,46 ^b
	IC i	2,63	2,36
	IC s	2,94	2,56

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Grupo A: animais diagnosticados como soropositivos para a LC no ELISA – Grupo B: animais diagnosticados como soronegativos para a LC no ELISA

TIH= Teste Intradérmico de Hipersensibilidade

IC i = intervalo de confiança inferior (95%);

IC s = intervalo de confiança superior (95%).

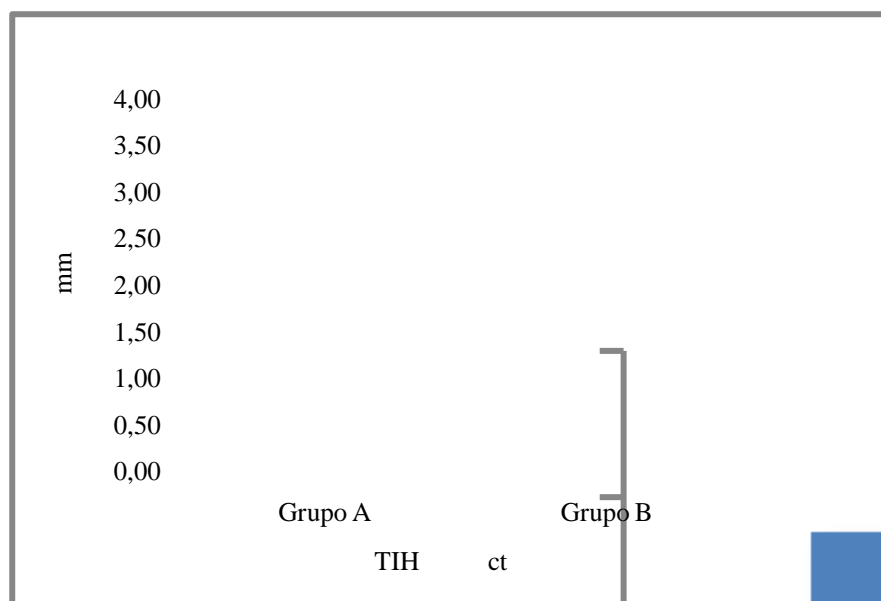


Figura 6. Valores médios gerais do aumento da espessura da dobra de pele obtidos pela reação ao Teste Intradérmico de Hipersensibilidade em relação ao controle. Grupo A: caprinos soropositivos para LC; Grupo B: caprinos soronegativos para LC ($p < 0,05$).

Quando consideramos as reações de hipersensibilidade ocasionadas pela aplicação do TIH em relação aos momentos de leitura, no grupo A foi evidente o aumento relativo da espessura da pele com magnitude máxima às 24h, após a aplicação do TIH, e permanência até 48h após a aplicação do TIH. Entre os demais momentos de leitura neste mesmo grupo (0h, 72h, 96h, 120h, 144h), não houve diferença significativa nas leituras. No Grupo B, houve uma mensuração relativa mais evidente após 24h da aplicação do TIH e não houve diferença significativa entre os demais momentos de leituras (Figura 7 e Tabela 4).

Ao compararmos as mensurações obtidas pela reação ao TIH de ambos os grupos, em cada momento de leitura, observamos que há diferença significativa entre os valores obtidos entre 24h, 48h e 96h após a aplicação do teste. Nos demais momentos, 0h, 120h e 144h, não houve diferença significativa da mensuração do teste entre os grupos avaliados (Figura 7 e Tabela 4).

Tabela 4. Mensuração relativa da espessura de pele de caprinos após a aplicação do TIH nos dois grupos experimentais

Grupo	Teste Intradérmico de Hipersensibilidade						
	0h (a.i.)	24h (p.i.)	48h (p.i.)	72h (p.i.)	96h (p.i.)	120h (p.i.)	144h (p.i.)
A	2,71±0,50 ^{a,B}	5,21±0,82 ^{a,A}	4,13±0,59 ^{a,A}	3,25±0,37 ^{a,A,B}	2,59±0,25 ^{a,B}	2,52±0,30 ^{a,B}	2,58±0,30 ^{a,B}
B	2,46±0,18 ^{a,B,C}	3,70±0,57 ^{b,A}	3,27±0,54 ^{b,A,B}	2,77±0,56 ^{b,A,C}	2,35±0,14 ^{b,C}	2,30±0,09 ^{a,C}	2,36±0,13 ^{a,C}

Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro do momento de leitura ($p < 0,05$).

Médias com letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).

Grupo A: animais diagnosticados como soropositivos para a LC no ELISA – Grupo B: animais diagnosticados como soronegativos para a LC no ELISA.

h: hora

a.i.: antes da inoculação do TIH

p.i.: após a inoculação do TIH

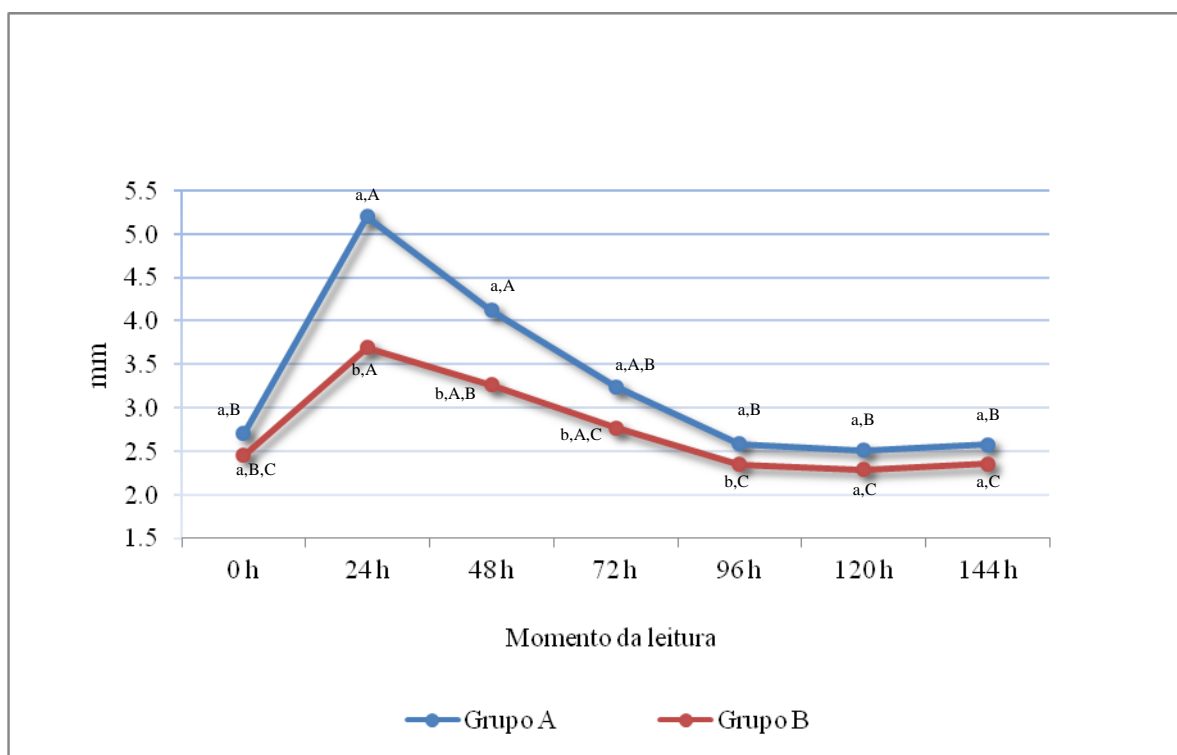


Figura 7. Valores médios relativos da espessura da pele dos caprinos após a aplicação do TIH nos dois grupos experimentais. Grupo A: caprinos soropositivos para LC; Grupo B: caprinos soronegativos para LC. Médias com letras minúsculas diferentes, comparando as linhas vermelha e azul, indicam diferença estatística entre os grupos dentro do momento de leitura ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes, nas linhas de mesma cor, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).

Ao avaliarmos os valores do aumento relativo da espessura da pele após a aplicação do teste controle (ct) observamos que não houve diferença significativa no aumento da espessura da pele em todos os momentos de leitura avaliados nos grupos experimentais (Figura 8 e Tabela 5).

Quando consideramos as mensurações entre os grupos diferentes para cada momento de leitura, também não houve diferença significativa entre as mensurações após a aplicação do teste controle (ct) (Figura 8 e Tabela 5).

Tabela 5. Mensuração relativa da espessura de pele de caprinos após a aplicação do TIH sem as proteínas secretadas nos dois grupos experimentais

Grupo	Momento de leitura - ct						
	0h (a.i.)	24h (p.i.)	48h (p.i.)	72h (p.i.)	96h (p.i.)	120h (p.i.)	144h (p.i.)
A	2,63±0,52 ^{a,A}	2,81±0,34 ^{a,A}	2,69±0,16 ^{a,A}	2,65±0,16 ^{a,A}	2,46±0,25 ^{a,A}	2,46±0,27 ^{a,A}	2,41±0,23 ^{a,A}
B	2,44±0,11 ^{a,A}	2,56±0,36 ^{a,A}	2,60±0,21 ^{a,A}	2,44±0,19 ^{a,A}	2,35±0,16 ^{a,A}	2,34±0,10 ^{a,A}	2,39±0,13 ^{a,A}

Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro do momento de leitura ($p < 0,05$).

Médias com letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).

Grupo A: animais diagnosticados como soropositivos para a LC no ELISA – Grupo B: animais diagnosticados como soronegativos para a LC no ELISA.

h: hora

a.i.: antes da inoculação do TIH sem as proteínas secretadas

p.i.: após a inoculação do TIH sem as proteínas secretadas

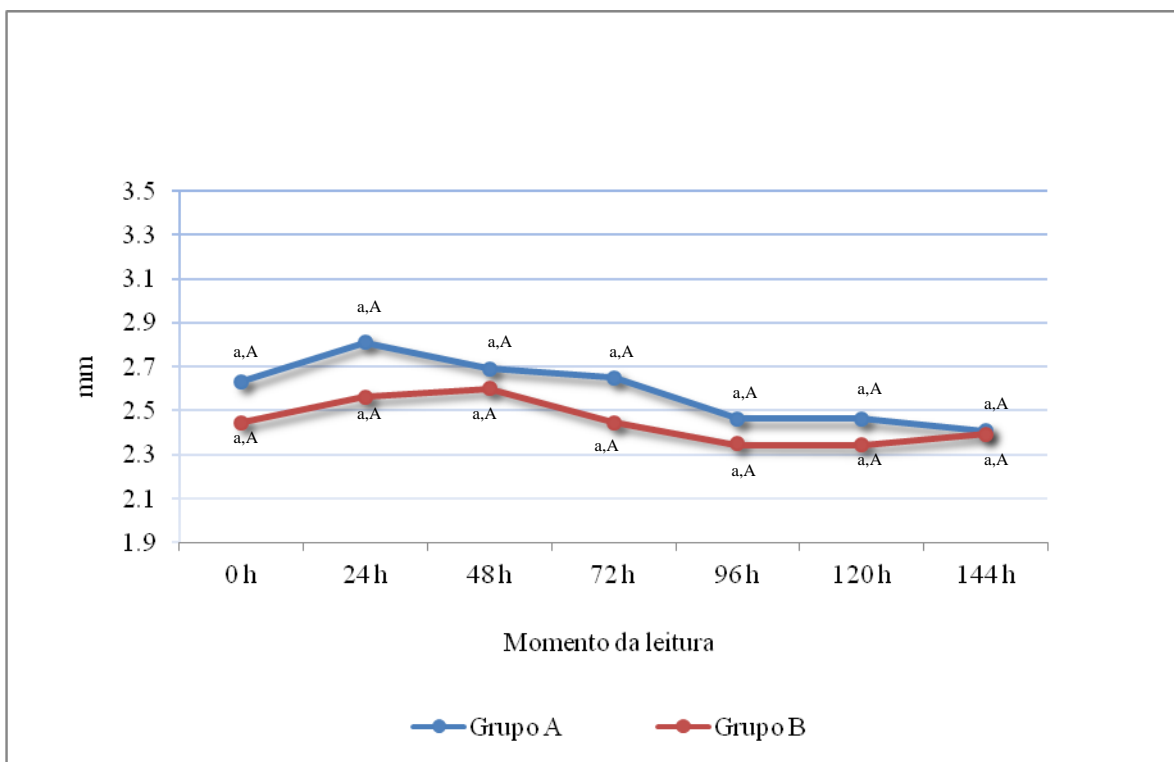


Figura 8. Valores médios relativos da espessura da pele de caprinos no local de aplicação do TIH sem as proteínas secretadas nos dois grupos experimentais. Grupo A: animais soropositivos para a LC. Grupo B: animais soronegativos para a LC. Médias com letras minúsculas diferentes, comparando as linhas vermelha e azul, indicam diferença estatística entre os grupos dentro do momento de leitura ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes, nas linhas de mesma cor, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).

Como o Teste Intradérmico de Hipersensibilidade (TIH) e o teste controle (ct), foram aplicados nos mesmos animais dos dois grupos experimentais, foi possível obter os valores absolutos médios das diferenças entre os testes aplicados (Tabela 6 e Figura 9).

Tabela 6. Mensuração absoluta da espessura de pele de caprinos após a aplicação do TIH nos dois grupos experimentais

Grupo	Momento de leitura - Diferença entre TIH e ct						
	0h (a.i.)	24h (p.i.)	48h (p.i.)	72h (p.i.)	96h (p.i.)	120h (p.i.)	144h (p.i.)
A	0,08±0,14 ^{a,B}	2,40±1,00 ^{a,A}	1,44±0,60 ^{a,A}	0,60±0,31 ^{a,A,B}	0,13±0,27 ^{a,B}	0,06±0,20 ^{a,B}	0,17±0,27 ^{a,B}
B	0,03±0,15 ^{a,B,C}	1,01±0,72 ^{b,A}	0,72±0,39 ^{b,A,B}	0,30±0,43 ^{a,A,C}	0,02±0,18 ^{a,C*}	0,05±0,10 ^{a,C*}	0,03±0,12 ^{a,C*}

Nota: Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro do momento de leitura ($p < 0,05$).

Médias com letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).

Grupo A: animais diagnosticados como soropositivos para a LC no ELISA – Grupo B: animais diagnosticados como soronegativos para a LC no ELISA

* Valores negativos são estatisticamente iguais à zero

h: hora

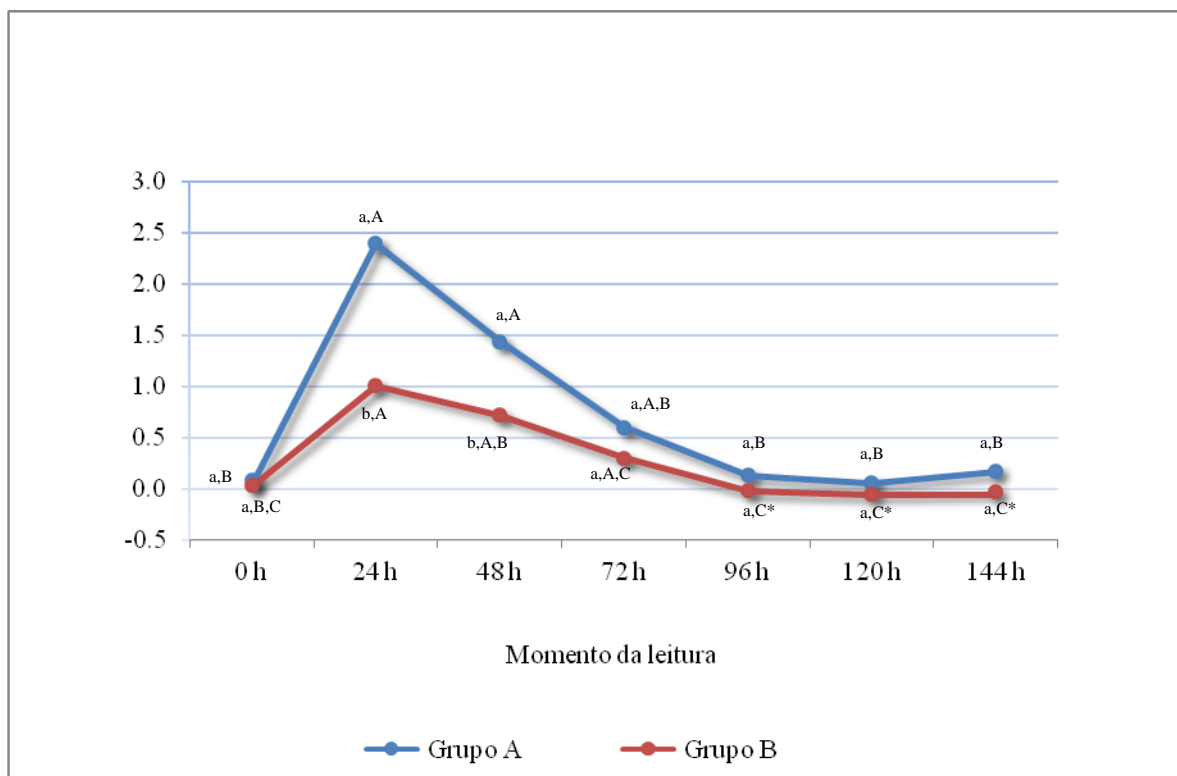


Figura 9. Valores absolutos médios da espessura da pele de caprinos. Diferença entre os valores relativos do TIH e ct aplicados nos mesmos animais para os dois grupos experimentais. Grupo A: animais soropositivos para a LC. Grupo B: animais soronegativos para a LC. Médias com letras minúsculas diferentes, comparando as linhas vermelha e azul, indicam diferença estatística entre os grupos dentro do momento de leitura ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes, nas linhas de mesma cor, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).

Para obtenção dos valores absolutos finais da mensuração do aumento da espessura da pele, os valores obtidos com a subtração do TIH e controle (Tabela 6 e Figura 9) foram subtraídos do valor da mensuração da espessura da pele antes da aplicação do teste (0h).

Tabela 7. Mensuração absoluta final da espessura de pele de caprinos após a aplicação do TIH nos dois grupos experimentais

Grupo	Momento de leitura - Diferença entre TIH e ct e 0h					
	24h (v.f.)	48h (v.f.)	72h (v.f.)	96h (v.f.)	120h (v.f.)	144h (v.f.)
A	2,32 ± 0,99 ^{a,A}	1,36 ± 0,54 ^{a,A}	0,52 ± 0,31 ^{a,A,B}	0,05 ± 0,20 ^{a,B}	-0,02 ± 0,15 ^{a,B*}	-0,09 ± 0,22 ^{a,B*}
B	0,98 ± 0,78 ^{b,A}	0,69 ± 0,36 ^{b,A}	0,27 ± 0,36 ^{a,A,B}	-0,05 ± 0,16 ^{a,B*}	-0,08 ± 0,13 ^{a,B*}	-0,06 ± 0,15 ^{a,B*}

Nota: v.f.= valor final da diferença entre THI e ct e valores p.i. e a.i.

Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os grupos dentro do momento de leitura (p<0,05).

Médias com letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo (p<0,05).

Grupo A: animais diagnosticados como soropositivos para a LC no ELISA – Grupo B: animais diagnosticados como soronegativos para a LC no ELISA

* Valores negativos são estatisticamente iguais à zero

h: hora

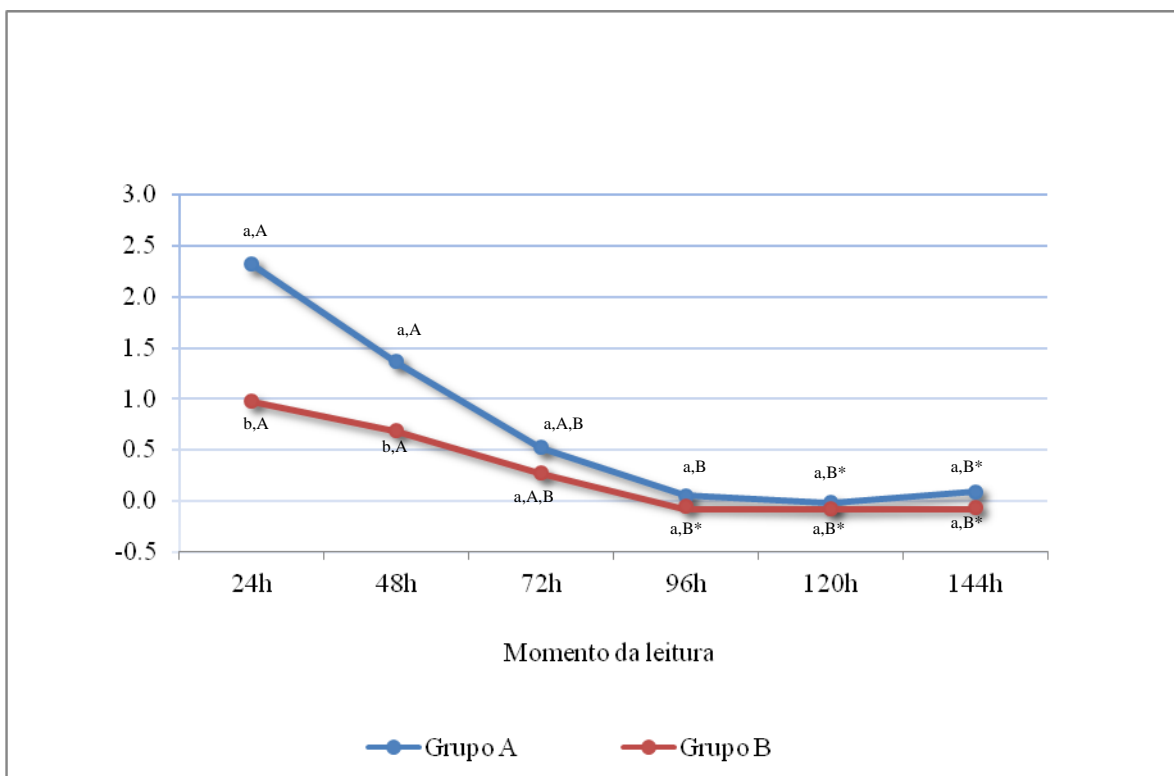


Figura 10. Representação gráfica dos valores absolutos finais do aumento da espessura da pele em cada momento de leitura. Cálculo a partir da diferença entre o valor absoluto das mensurações da espessura da pele (TIH – ct) de cada momento de leitura e a média do valor da espessura da pele antes da inoculação (a.i.) do TIH. Médias com letras minúsculas diferentes, comparando as linhas vermelha e azul, indicam diferença estatística entre os grupos dentro do momento de leitura ($p < 0,05$). Médias com letras maiúsculas diferentes, nas linhas de mesma cor, indicam diferença estatística entre os momentos de leitura dentro de cada grupo ($p < 0,05$).

5.4 Acurácia do TIH

O ponto de corte foi estabelecido para o momento de leitura de 24h, o qual apresentou valores de maior diferença significativa após a aplicação do teste. Este cálculo foi realizado a partir do valor absoluto final da espessura da pele (Tabela 7 e Figura 10) e baseado em Rebouças *et al.*, (2011) e instruções normativas para o Teste Cervical Simples Tuberculínico (MAPA, 2004).

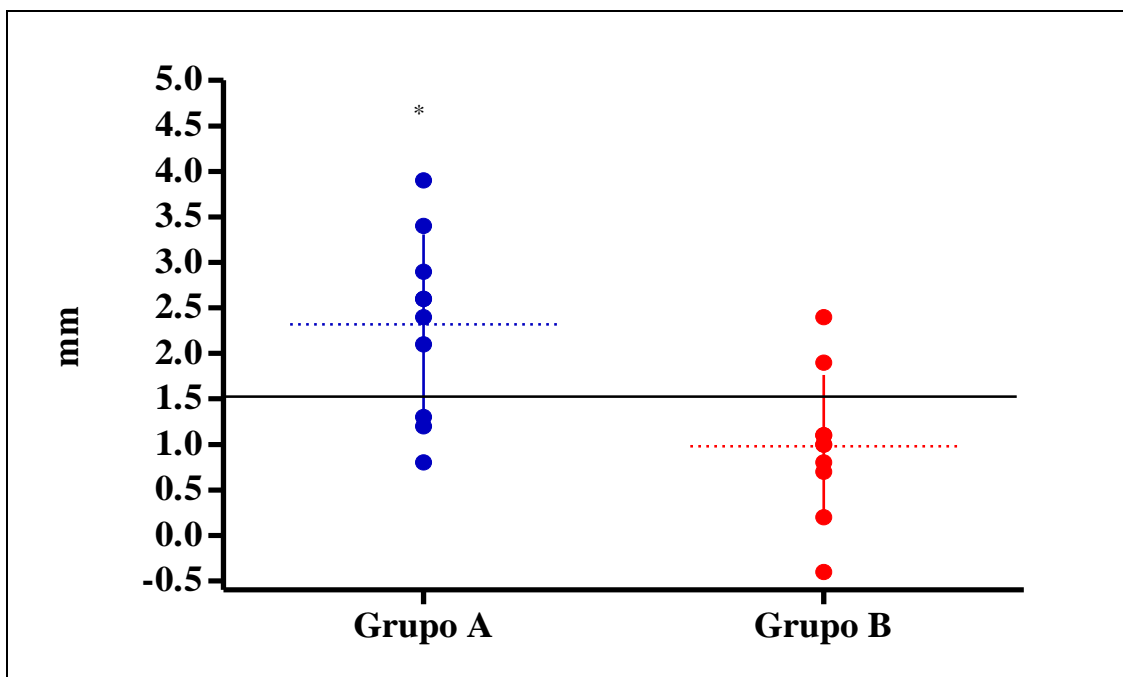


Figura 11. Ponto de corte estabelecido para 24h após a aplicação do TIH. (Grupo A: animais diagnosticados como positivos para a LC no ELISA – Grupo B: animais diagnosticados como negativos para a LC no ELISA). A linha contínua indica o ponto de corte calculado para o TIH em 24 horas (1,50 mm). *P<0,05.

Com o estabelecimento do ponto de corte de 1,50mm, a partir do valor absoluto final da espessura da pele, dos 10 animais do Grupo A, diagnosticados como positivos para a LC através do ELISA, 7 animais foram diagnosticados como positivos para a LC no TIH. Já para o Grupo B, dos 10 animais diagnosticados como negativos para a LC através do ELISA, 8 animais foram diagnosticados como negativos para a LC através do TIH, apresentando mensurações da pele inferiores ao ponto de corte estabelecido (Figura 12).

O TIH apresentou 70% de sensibilidade e 80% de especificidade, em relação ao diagnóstico sorológico por ELISA, com 3 resultados falso-positivos e 2 resultados falso-negativos, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Validação dos parâmetros do TIH em relação à triagem realizada por ELISA nos animais submetidos ao teste.

Parâmetros	Resultado por cabra
TIH verdadeiros positivos	7
TIH verdadeiros negativos	8
TIH falso positivos	3
TIH falso negativos	2
Ponto de corte	1,5mm
Sensibilidade	70%
Especificidade	80%
Total de animais testados	20

6 DISCUSSÃO

O TIH é baseado no princípio de que, quando alguns antígenos são injetados na pele, induzem uma resposta inflamatória de desenvolvimento lento, denominada hipersensibilidade retardada, ou tipo IV, mediada por interações com as células apresentadoras de antígenos e linfócitos T. Estas respostas podem ser consideradas como uma forma especializada de inflamação direcionada contra organismos que são resistentes à eliminação por processos inflamatórios convencionais (Tizard, 2008). Testes baseados em reações cutâneas positivas de hipersensibilidade retardada podem ser obtidos em quaisquer doenças infecciosas, nas quais a imunidade mediada por células tem um papel significativo.

Os estudos para o diagnóstico subclínico da LC através do TIH começaram na França, quando Cesari (1930) inoculou 0,2mL do filtrado de “culturas velhas” de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (antigamente denominado bacilo de Preisz-Nocard) no coxim plantar de cobaias, que foram anteriormente infectados com o mesmo microrganismo vivo. Em seguida, uma reação de hipersensibilidade local semelhante à reação de hipersensibilidade provocada pela tuberculina foi verificada em cobaios com tuberculose. O alérgeno inoculado foi denominado pelo autor como “Preisznocardina” e sugeriu que este teste fosse utilizado para diagnosticar a LC em ovinos. Posteriormente, diversos TIH foram elaborados para o diagnóstico da LC em pequenos ruminantes, como mencionado no item 1.2.4.4, porém esses estudos não apresentaram acurácia e aplicabilidade comprovadas. Para esses pesquisadores, os antígenos protéicos e os métodos de extração eficazes foram um desafio na elaboração do TIH.

No desenvolvimento de um TIH para o diagnóstico subclínico da LC, os reagentes dos testes intradérmicos descritos por Cassamagnaghi (1931) e Carne (1932) foram obtidos com a utilização de vela de Chamberland L3 para filtrar a cultura de *Corynebacterium pseudotuberculosis* após longo período de incubação. Esta mesma vela foi testada por Linhares (1944) em um estudo com a lepra murina, e foi concluído que o agente causador desta enfermidade, *Mycobacterium leprae* que possui de 0,2µm a 0,5µm de largura por 1 a 8µm de tamanho (Goulart *et al.*, 2002), foi capaz de passar por esta vela utilizada como filtro.

Camerom & McOmie (1940) e Farid & Mahmoud (1960) apesar de terem utilizado o filtro Seitz EK, capaz de filtrar diâmetros entre 0,5 e 0,8µm (Seitzschenk, 2002), também utilizaram um longo período de incubação de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Nestes estudos relatados, os antígenos utilizados no TIH podem apresentar produtos decorrentes do catabolismo bacteriano gerado pelo longo período de incubação a que são submetidos, assim

como toxinas e fragmentos citoplasmáticos e da parede bacteriana (Langenegger *et al.*, 1987) que provavelmente não foram retidos pelos métodos de filtração empregados.

Costa Filho (1978) utilizou como antígenos do TIH, uma suspensão bacteriana de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Corynebacterium pyogenes* fenolisada a 5% com $1,2 \times 10^8$ de bactérias, evidenciando uma inespecificidade do teste quanto à distinção da linhagem causadora da LC e à metodologia aplicada.

Langenegger *et al.* (1987) desenvolveram um antígeno para um TIH, denominado por Linfadenina, que consistia de proteínas hidrossolúveis, extraídas a partir de células lavadas de *C. pseudotuberculosis*, obtidas através de cultura de 5 dias em caldo de soja tríplica. A massa bacteriana foi suspensa em água destilada, em seguida foi autoclavada e centrifugada. O sobrenadante foi precipitado para a concentração final de 4% em solução de ácido tricloroacético e posteriormente concentrado por sifonagem após decantação e centrifugação. A massa de proteína foi dissolvida com ácido tricloroacético e hidrogenofosfato de potássio. Em seguida, foi redissolvida em solução de fosfato de sódio com pH 9,0 e diluída em tampão glicero-fenicado com pH 7,0. Este tampão de diluição não foi testado sozinho nos animais para que fosse avaliada sua reatividade. Similarmente, a tuberculina preparada por Koch (1932) também possuía glicerina, que foi retirada atualmente da preparação contendo derivado protéico purificado (PPD) (Bubniak, 2000). Em um teste piloto realizado pelo nosso grupo de pesquisa, Dorella e colaboradores (dados não publicados) utilizaram uma solução a base de glicerol em um teste de imunização, mas o mesmo foi descartado por causar forte reação na pele dos caprinos testados.

Alves & Orlander (1999) utilizaram a mesma metodologia de Brown *et al.* (1986) para a obtenção de antígenos a serem utilizados no TIH. Esta metodologia foi baseada no cultivo de *C. pseudotuberculosis* por 48h em meio BHI seguido da centrifugação à 6000 rpm por 30 minutos. Porém, ao invés de utilizarem o sobrenadante filtrado como nos outros trabalhos, utilizou o pellet aquecido à 100°C, suspenso em salina e adicionado azida sódica. Posteriormente, a solução foi sonicada em prensa celular Francesa a 20.000 psi até que se tornasse viscosa. Ambos os trabalhos evidenciaram a ineficiência do reagente utilizado no TIH, devido aos compostos de células fragmentadas de *C. pseudotuberculosis* contendo uma vasta quantidade de antígenos como componentes da parede celular e citoplasma. Relataram ainda a presença de reações inespecíficas, sugerindo a purificação dos antígenos a serem utilizados no teste de pele.

No presente trabalho foi utilizada a técnica de fracionamento em três fases (TPP). Essa metodologia está bem padronizada para a obtenção de proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis*, que são utilizadas como antígeno no ELISA indireto para o diagnóstico da LC, em ensaios de interferon gama e em estudos de identificação e caracterização do secretoma de *C. pseudotuberculosis* (Paule *et al.*, 2003; Carminati *et al.*, 2003; Seyffert *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2011). Através deste trabalho, as proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* foram pela primeira vez utilizadas na padronização de um TIH e apresentaram resultados promissores, como desencadeadoras da reação de hipersensibilidade (Tabela 3 e Figura 6), quando comparadas com antígenos utilizados em outros TIH anteriormente desenvolvidos.

Os caprinos que foram testados experimentalmente com o TIH e com a solução controle não apresentaram alterações em suas funções vitais normais. Este comportamento pode ser atribuído ao fato de o TIH ser baseado em uma reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV), que geralmente não apresenta manifestações sistêmicas, sendo caracterizada somente por uma resposta inflamatória no local da aplicação do teste (Tizard, 2008).

Após um experimento piloto em caprinos para a determinação da quantidade de proteínas secretadas a ser utilizada no TIH, a menor concentração que obteve reação significativa foi selecionada (0,1mg/mL) e a dose estabelecida foi de 0,1mL, equivalendo ao que é preconizado pelo MAPA (2004) para o teste tuberculínico. Com relação à quantificação das proteínas do TIH, de todos os trabalhos realizados, somente Langenengger *et al.* (1987) quantificaram e compararam duas concentrações dos antígenos utilizados, 0,25mg e 0,12mg a cada mL de solução de suspensão. O mesmo grupo utilizou a concentração de 0,25mg/mL em um trabalho posterior (Langenengger & Langenengger, 1991).

O volume da dose padronizada encontra-se dentro dos parâmetros adotados para os testes tuberculínicos, que não devem ultrapassar 0,2mL (OIE, 2009) e com outros trabalhos já realizados para a tentativa de padronização de um TIH para o diagnóstico subclínico da LC (Cassamagnaghi, 1931; Costa Filho, 1978; Brown *et al.*, 1986; Langenengger *et al.*, 1987; Langenengger & Langenengger, 1991; Alves & Orlander, 1999).

Quanto à padronização de um teste controle do TIH, objetivando averiguar possíveis reações inespecíficas causadas pela solução de diluição dos antígenos do teste, de todos os estudos já citados, somente o de Costa Filho (1978) testou a solução salina fenolisada à 5%, utilizada para ressuspender os antígenos do TIH. No entanto, o teste só foi realizado em animais de um grupo com caprinos saudáveis, não sendo analisada a ausência da reação do TIH

em animais diagnosticados com a LC (Costa Filho, 1978). Como ainda não há um TIH para o diagnóstico subclínico da LC disponível no mercado, a avaliação de todas as condições experimentais supracitadas são de extrema importância para o desenvolvimento de um teste eficiente.

A padronização da solução controle deste presente estudo foi realizada somente com o tampão de suspensão das proteínas secretadas, Tris-HCl 20mM na dose de 0,1mL. Conforme as análises, os animais de ambos os grupos não demonstraram reações estatisticamente significativas a esta solução (Tabela 3), somente uma pequena reação mecânica foi observada. Quando inoculado sozinho nos animais, o Tris-HCl 20mM causou uma reação significativamente menor do que a reação de hipersensibilidade provocada pelo TIH e estatisticamente equivalente em todos os momentos de leitura e nos diferentes grupos avaliados (Tabela 5).

As médias gerais das reações do TIH mensuradas através do aumento da espessura da pele mostraram-se condizentes com o diagnóstico prévio realizado pelo ELISA utilizado na distinção dos grupos A e B (Tabela 3 e Figura 6). Segundo essas análises, os animais que foram diagnosticados sorologicamente como positivos para a LC através do ELISA (Grupo A) apresentaram valores do TIH estatisticamente superiores àqueles animais diagnosticados sorologicamente como negativos para a LC através do ELISA (Grupo B).

Ao compararmos os valores relativos obtidos em cada momento de leitura entre os grupos A e B, as diferenças estatísticas foram maiores no grupo A do que no grupo B para os valores da espessura da pele mensurados em 24h, 48h e 72h após a aplicação do TIH. Já os mensurados nos momentos 0h, 96h, 120h e 144h após a aplicação do TIH, não apresentaram diferença estatística entre os grupos A e B (Tabela 4 e Figura 7), evidenciando a resolução da reação de hipersensibilidade aos valores normais da espessura da pele.

Considerando os momentos de leituras após a inoculação do TIH (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h), no Grupo A, a maior magnitude atingida foi às 24h ($5,21 \pm 0,82\text{mm}$), não apresentando uma diferença estatística em relação à observada em 48h após a inoculação do teste (Tabela 4 e Figura 7). Após 72h da inoculação do TIH, o valor da espessura da pele apresentou-se intermediário entre os momentos de 48h e 96h. A evolução da intensidade dessa reação está em concordância com as afirmações de Tizard (2008), caracterizada por uma resposta inflamatória que poderia atingir a sua maior intensidade entre 24 e 72h após o desencadeamento da reação de hipersensibilidade do tipo IV. No Grupo B, a maior magnitude atingida foi às 24h em relação aos momentos de leituras após a inoculação do TIH. Após 48h,

o aumento da espessura da pele mostrou-se intermediário ao momento de leitura anterior à aplicação do teste e após 24h, com valores estatisticamente equivalentes a ambos os momentos, evidenciando a regressão da reação (Tabela 4 e Figura 7).

Apesar de não terem sido realizadas análises de variação entre as mensurações obtidas para cada momento de leitura e não terem dispostos de equipamentos de precisão para a mensuração da espessura da pele, Cassamagnaghi (1931), Carne (1932) e Farid & Mahmoud (1960), realizaram a mensuração do TIH em ovinos somente após 48h e Camerom & McOmie (1940) após 72h. Por outro lado, Costa Filho (1978), Langenengger *et al.* (1987) e Langenengger & Langenengger (1991), Brown *et al.* (1986) e Alves & Orlander (1999) utilizaram paquímetro para leitura da espessura da pele antes das inoculações e com 24, 48 e 72h após as injeções em caprinos, entretanto, somente Langenengger & Langenengger (1991) informaram o melhor tempo de leitura utilizado, que foi de 48h após a aplicação do teste.

Como ambos os testes, o TIH e o teste controle (ct) foram aplicados nos mesmos animais de ambos os grupos experimentais (A e B), foi possível obter os valores médios absolutos do aumento da espessura da pele com avaliação do desenvolvimento da reação. Para isso, foram subtraídos os valores da espessura da pele de cada momento de leitura, antes (0h) e após suas aplicações (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h), entre o TIH e o teste controle (ct), para ambos os grupos (Tabela 6 e Figura 9). Ao compararmos os momentos de leitura do grupo A, observamos uma maior magnitude da reação às 24h, que não apresentou diferença significativa em relação à observada em 48h após a inoculação do teste. Neste mesmo grupo, a leitura obtida às 72h após a inoculação do teste apresentou um valor intermediário entre os momentos de leitura 48h e 96h. A comparação entre os demais momentos de leitura do grupo A (0h, 72h, 96h, 120h e 144h) não apresentou diferença significativa (Tabela 6 e Figura 9). As mesmas comparações foram realizadas para o grupo B, que apresentaram resultados condizentes ao grupo A, com exceção do momento de leitura de 48h, que foi estatisticamente equivalente ao momento anterior à inoculação do teste (0h), demonstrando que a resolução da reação de hipersensibilidade neste grupo foi mais rápida em relação ao grupo A (Tabela 6 e Figura 9).

Em analogia ao Teste Cervical Simples, utilizado no diagnóstico da Tuberculose (MAPA, 2004), para obtenção de um valor absoluto final do aumento da espessura da pele, foi almejado considerar somente a influência das proteínas secretadas como antígenos desencadeadores da resposta de hipersensibilidade do tipo IV gerada. Para tanto foi considerado o resultado absoluto obtido através da diferença das mensurações da espessura da

pele de cada momento de leitura entre o TIH e o ct (Tabela 6 e Figura 9). Em seguida, estes resultados absolutos obtidos para cada momento de leitura foram subtraídos do valor da espessura da pele no momento anterior à aplicação do teste (0h), correspondendo à aferição do aumento da espessura real da pele. Assim, foram estabelecidos os valores absolutos finais para cada momento de leitura (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h), para ambos os grupos (A e B) (Tabela 7 e Figura 10).

Da mesma forma que ocorreu para o resultado do valor absoluto da mensuração da espessura da pele que foi citado anteriormente, mas sem considerarmos o momento de leitura de 0h, ao compararmos os momentos de leitura do grupo A, houve uma reação mais significativa às 24h, que não apresentou diferença significativa em relação às 48h. O valor mensurado às 72h foi intermediário entre os momentos de leitura 48h e 96h, e a comparação entre os demais momentos de leitura do grupo A (72h, 96h, 120h e 144h) não apresentou diferença significativa (Tabela 7 e Figura 10). Estas mesmas comparações foram realizadas para o grupo B, que apresentou resultados condizentes ao grupo A (Tabela 7 e Figura 10).

Assim, foi estabelecido 24h como o melhor tempo de leitura, por ter apresentado uma magnitude máxima do aumento da espessura da pele após a inoculação do TIH. Neste momento de leitura foram apresentados valores absolutos finais com média de 2,32mm e desvio padrão 0,99 no grupo A e média de 0,98mm e desvio padrão 0,78 no grupo B (Tabela 7 e Figura 10).

A acurácia do TIH foi avaliada baseada no estabelecimento de um ponto de corte adaptado de Rebouças *et al.* (2011) para um “n” amostral de 10 animais por grupo a partir do valor absoluto final do aumento da espessura de pele calculados para o melhor tempo de leitura (24h). Como resultado, foi considerado um valor absoluto de 1,50mm de espessura da pele como ponto de corte para a identificação dos animais positivos e negativos para o teste, sendo condizentes com o valor para determinação de positividade ao TIH apresentado por Langenengger & Langenengger (1991). Em relação aos já citados, o trabalho de Langenengger & Langenengger (1991) foi o único que determinou uma pontuação de corte para o TIH. Estabeleceram valores de até 1mm de aumento da espessura da pele para animais negativos, entre 1 a 1,4mm para animais suspeitos e iguais ou superiores à 1,5mm considerados como positivos ao teste. No entanto, neste trabalho de Langenengger & Langenengger (1991), que utilizou 26 caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*, o TIH foi correlacionado grosseiramente com o teste da inibição da hemólise sinérgica (IHS) e o aparecimento de abscessos. Os critérios utilizados para o

estabelecimento do ponto de corte e os valores de sensibilidade e especificidade do teste não foram apresentados (Langenengger & Langenengger, 1991).

A precisão do diagnóstico de um teste é definida principalmente em termos de sua sensibilidade e especificidade, os quais são calculados respectivamente, a partir da proporção de animais infectados e não infectados que são corretamente diagnosticados (Rua-Domenech *et al.*, 2006). O TIH desenvolvido pelo nosso grupo apresentou uma sensibilidade de 70% e uma especificidade de 80% em relação ao diagnóstico por ELISA, que foi utilizado como teste padrão de referência (Tabela 8).

Farid & Mahmoud (1960) basearam na divisão de grupos contendo ovinos diagnosticados como positivos e negativos para a LC somente através da observação de lesões aparentes nos animais, sem diagnóstico sorológico. Segundo os autores, apesar do TIH ter apresentado um resultado promissor com 80 a 90% de reação nos animais com lesões aparentes, o mesmo não se aplicou para o grupo de animais sem lesões aparentes. Estes resultados foram atribuídos ao fato de os ovinos com lesões terem sido confinados juntamente com aqueles sem lesões e à necessidade de necrópsia para a confirmação do acometimento dos órgãos internos.

Langenengger & Langenengger (1987) utilizaram grupos experimentais com uma maior quantidade de caprinos, sendo os grupos positivos com 40 e 22 animais, e o negativo com 40 animais. Os animais diagnosticados como positivos pelos autores foram referenciados como infectados naturalmente e portadores de lesões para LC, porém os testes diagnósticos realizados não foram relatados. Já os animais pertencentes ao grupo negativo, foram relatados como provenientes de criação livre de LC e testes sorológicos para diagnóstico subclínico da enfermidade não foram realizados. Neste estudo, Langenengger & Langenengger (1987) concluíram que dentre as duas concentrações da Linfadenina testadas, 12mg/mL e 0,25mg/mL, esta última pareceu ser mais adequada, demonstrando boa sensibilidade e suficiente especificidade. No entanto, os cálculos realizados e valores de sensibilidade e especificidade não foram revelados.

Costa Filho (1978) aplicou um TIH em 15 animais, divididos em 3 grupos, onde 5 animais foram diagnosticados positivamente para a LC através de exame bacteriológico e os outros 10 foram adquiridos de zonas indenes, também sem a realização de diagnóstico sorológico. O autor concluiu que o grupo de caprinos com LC apresentou reação à inoculação intradérmica, com aumento considerável em milímetros da espessura da pele, o que não ocorreu com os grupos de animais sadios adquiridos de zonas indenes. Entretanto, não foi

feita análise estatística dos resultados apresentados e o paquímetro utilizado não possuía precisão. Dentre os TIH realizados, o último e mais recente, desenvolvido por Alves & Orlander (1999) utilizou a mesma metodologia de Brown *et al.*(1986) e da mesma forma, encontraram reações inespecíficas em caprinos soronegativos e recomendaram que fosse alterado o preparo dos antígenos utilizados no TIH.

Os animais utilizados no presente trabalho não apresentavam lesões aparentes da LC, sendo impossível a coleta de material caseoso para o isolamento de *C. pseudotuberculosis* e caracterização bioquímica para a realização do diagnóstico que é considerado padrão-ouro. Assim, o ELISA indireto com proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* já padronizado (Carminati *et al.* 2003) foi utilizado para a triagem dos animais. Esse ensaio possui alta sensibilidade e especificidade em relação a outros ensaios de ELISA e ao teste padrão-ouro (Carminati, 2005). Além disso, tem sido amplamente utilizado em estudos de prevalência e triagem sorológica para LC (Seyffert *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2009; Rebouças *et al.* 2011). Com o êxito na padronização e acurácia do TIH desenvolvido no presente estudo, resolvemos fazer o pedido de depósito de patente ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Almejamos que o mesmo seja implementado a fim de suprir algumas desvantagens existentes no ELISA. Por exemplo, o custo dos insumos laboratoriais do ELISA (Rua-Domenech *et al.*, 2006) que impossibilita uma transferência acessível aos produtores rurais; além disso, para realização deste ensaio existe a necessidade da coleta de amostras dos animais e encaminhamento laboratorial das mesmas.

Uma futura implantação deste teste diagnóstico subclínico da LC em campo contribuirá no controle e erradicação desta enfermidade na ovinocaprinocultura nacional.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste presente trabalho nos permite concluir que:

- O TIH padronizado para diagnóstico subclínico da LC em caprinos demonstrou resultados promissores e será aprimorado em sua sensibilidade e especificidade para utilização no controle da enfermidade.
- O pedido de patente do TIH padronizado neste estudo foi realizado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar novos testes com o TIH em rebanhos de pequenos ruminantes e avaliar a produção de interferon gama, correlacionando com dados obtidos por ELISA.
- Testar o TIH em rebanhos de ovinos.
- Utilizar o TIH em trabalhos epidemiológicos e de controle da LC em rebanhos de pequenos ruminantes
- Produzir proteínas recombinantes a partir de *ORFs* já identificadas de *C. pseudotuberculosis* e avaliá-las no TIH
- Transferir o produto final à indústria para ser comercializado com um baixo custo, favorecendo os produtores rurais.

REFERÊNCIAS

- AIRELLO, S.; MAYS, A.; OLIVEIRA, P.M.A. Manual Merck de Veterinária. Editora ROCA, São Paulo, 8.ed. 2001.
- ALVES, F.S.F. & OLANDER, H. J. Teste de pele em caprinos vacinados e infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Pesq. Agropec. Bras., v. 34, p. 21-27, 1999.
- ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; PIRES, P.C. Linfadenite caseosa: patogenia-diagnóstico-controle, Artigo Técnico. Documento nº 27, Embrapa Sobral CE, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1997.
- ARSENAULT, J.O.; GIRARD, C. ; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D. O.; GALARNEAU, J.-R.; BOISCLAIR, J., SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada, Prev. Vet. Med., v. 59 , p. 67–81, 2003.
- AWAD F.J. Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. I. Agglutination test. Am. J. Vet. Res., v.81, p. 251-253, 1960.
- BAIRD G.J. & FONTAINE M.C., *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. J. Comp. Path. v. 137, n. 4, p. 179-210, set, 2007.
- BARBAS, C. F., DENNIS, R. B., SCOTT, J. K., SILVERMAN, G. J. Phage Display A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1 ed. NY, 2001.
- BARINOV A, LOUX V, HAMMANI A, NICOLAS P, LANGELLA P, EHRLICH D, MAGUIN E AND GUCHTE M . Prediction of surface exposed proteins in Streptococcus pyogenes, with a potential application to other Gram-positive bacteria. Proteomics, 9, 61–73, 2009.
- BIBERSTEIN, E.L. & HIRSH, D.C. 2003. Corynebactérias; *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*; *Rhodococcus equi*. In: Hirsh D.C. & Zee Y.C. (Ed.), Microbiologia Veterinária. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2.ed. p.119-126, 1971.
- BILLINGTON, S.J.; ESMAY, P.A.; SONGER, J.G.; JOST, B.H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, FEMS Microbiol. Lett., v. 208, p. 41–45, 2002.
- BINNS S. H., GREEN L. E., BAILEY M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. Vet. Microbiol. 123, 169–179, 2007.
- BOGDAN, J. R.; NEWLANDS-MONTEITH, C.F.; ELLIS, J.A.; Nitric oxide production following *in vitro* stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 56, p. 299-310, 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochemistry. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAITHWAITE C.E., SMITH E.E., SONGER J.G., REINE A.H., Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*., Vet. Microbiol. 38. 59-70, 1993.

BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; BIBERSTEIN, E.L.; MORSE, S.M. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Am. J. Vet. Res., v. 47, p. 1116–1119, 1986.

BUBNIAK, F. Diagnóstico Epidemiológico da Tuberculose na Espécie Bovina no Estado de Santa Catarina. Centro de Ciências Agroveterinárias. Universidade do Estado de Santa Catarina. 78p, 2000.

BURREL, D.H. A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. Res. Vet. Sci. v. 28, p. 190-194, 1980a.

BURREL, D.H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *C. ovis* antitoxin. Res. Vet. Sci. v.28, p. 234-237, 1980b.

BURREL, D.H. Non-specific agglutination of *C. ovis* by precolostral and young lamb sera. Res. Vet. Sci. v.25, p. 373-375, 1978.

BUXTON, A. & FRASER, G. *Corynebacterium*, in: Buxton A., Fraser G. (Eds.), Animal Microbiology, Blackwell Scientific Publications, Edinburgh. p. 177–183, 1977.

CAMERON, C. M; & ENGELBRECHT, M. M. Mechanism of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice using inactivated vaccine. Onderstepoort J. Vet. Res. v.38, p.73-82, 1978.

CAMERON, H.S. & McOMIE, W.A. The agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. Cornell Vet. v.30, p. 41-46, 1940.

CARMINATTI, R. Estudo da Sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. Tese. Salvador. 80p. 2005.

CARMINATTI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.F.; PAULE, B.J.A.; VALE, V.L.; REGIS, L.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R. AND MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. R. Ci. Méd. Biol. 2, 88-93, 2003.

CARNE, H.R. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents, Aust. Vet. J. v.8, p. 42-47, 1932.

CARNE, H.R. & ONON, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels, Nature, v. 271, p. 246-248, 1978.

CASSAMAGNAGHI, A. Le diagnostic de la lympho-adenite caseéuse des moutons par L'intradermo-reação a la Preisz-Nocardine. Bull. Acad. Vet. France, v.4, p. 330-333. 1931.

CESARI, E. Sur le diagnostic de la lymphadénie caséense par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. Bull. Acad. Vét. France n.3 vol. 6 p. 291-295, 1931.

CASTRO, T.L.P., Avaliação da Expressão Diferencial de Genes Codificadores de Fatores Sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em Resposta a Agentes Geradores de Estresse Nitrosativo. Tese. Belo Horizonte. 128p. 2009.

CHEDID, L.; CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; SACKS, J. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs, *Am. Vet. Res.*, v. 51, p. 200-202, 1990.

COSTA FILHO, G.A. Diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos através da intradermo-reação. *An. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife*, 161-170, 1978.

COYLE, M.B. & LIPSKY, B.A. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects, *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 3, p. 227–246, 1982.

COSTA, M. P ; MCCULLOCH, J.A; ALMEIDA; S. S.; DORELLA, F. A.; FONSECA, C. T; OLIVEIRA, D. M.; TEIXEIRA, M. F.S.; LASKOWSKA' E.; LIPINSKA; B.; MEYER' R.; PORTELA, R. W; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis hsp60-hsp10* operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by *hsp60* DNA vaccination in mice. *BMC Research Notes* 4:243 2011.

CESARI, E. Sur Le diagnostic de la lymphadénie caséense par l'intradermo-réaction à la Preiz-Nocardine. *BULL. Acad. Vét. France*. n.3, v.6, p. 291-295, 1930

CYRILLO, F.C. Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos (*Ovis Áries*).2006.92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.

ÇETINKAYA B., KARAHAN M., ATIL E., KALIN R., DE BAERE T., VANEECHOUTTE M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR, *Vet. Microbiol. V.* 2359. p. 1–9, 2002.

DERCKSEN D.P., BRINKHOF J.M.A., DEKKER- NOOREN T., VAN MAANEN K., BODE C.F., BAIRD G., KAMP E.M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats, *Vet. Microbiol.* 75, p. 167–175, 2000.

DORELLA, F.A. Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Tese) Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. 191 p. 2009.

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, *Vet. Res.*, v. 37, p. 201–218, 2006.

EGEN, N.B.; CUEVAS, W.; McNAMARA, P.J.; SAMMONS, D.W.; HUMPHREYS, R.; SONGER, J.G. Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing, *Am. J. Vet. Res.*, v. 50, p. 1319–1322, 1989.

EGGLETON, D.G.; MIDDLETON, H.D.; DOIDGE, C.V.; MINTY, D.W. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells, Aust. Vet. J., v. 68, p. 317-319, 1991.

ELLIS, J.A.; HAWK, D.A.; MILLS, K.W.; PRATT, D.L. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate, Vet. Immunol. Immunopathol., v. 28, p. 303-316, 1991.

FARIA, G.A.; MORAIS, O.R.; GUIMARÃES, P.H.S. Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Sebrae. Relatório técnico [on-line]. Disponível:<www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere_para_crescer/geor/diagnostico/ovino/aprinocultura.pdf> Acesso em 20 mai 2010.

FARID, A.; MAHMOUD, A.H. Primary trials on the diagnosis of caseous lymphadenitis in Egypt by means of intradermal inoculation of allergic material. Vet. Med. J., v. 7, p.253-258, 1960.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da Hanseníase: A complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. Rev. Soc. Brás. Méd. Trop, v. 35, n. 4, p. 365-375 jul/aug, 2002.

GUIMARAES, A. S.; Carmo, F.B.; PAULETTI, R. B.; SEYFFERT, N ; RIBEIRO D.; Lage, A.P.; HEINEMANN, M. B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. The IIOAB journal, v. 2, p. 33-43, 2011.

GUIMARÃES, A. S.; SEYFFERT, N.; BASTOS, B.; PORTELA, R. W. ; MEYER, R.; CARMO, F. B.; L.S., V.; CRUZ, J. C. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. Small Ruminant Research, v. 87, p. 86-91, 2009.

HANSMEIER, N.; CHAO, T.C.; KALINOWSKI, J.; PÜHLER, A.; TAUCH, A. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. Prot., v. 6, p. 2465-76, 2006.

HARD, G.C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*, J. Med. Microbiol., v. 5, p. 483–491, 1972.

HAUTEFORT, I.; THOMPSON, A.; ERIKSSON-YGBERG, S.; PARKER, M.L.; UCCHINI, S.; DANINO, V.; BONGAERTS, R.J.; AHMAD, N.; RHEN, M.; HINTON, J.C. During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. Cell Microbiol., v. 10, p. 958-84, 2008.

HODGSON, A.L.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L.A.; McCOLL, M.; CAMERON, A. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D, Vaccine, v. 17, p. 802–808, 1999.

HODGSON, A.L.M.; KRYWULT, J.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; RADFORD, A.J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle, *Infect. Immun.*, v. 60, p.2900–2905. 1992.

HOLSTAD, G. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. IX. The effect of vaccination against natural infection, *Acta Vet. Scand.*, v. 30, p. 285-293, 1989.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (Eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 593, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias - Brasil - 2009-2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab01.pdf. Acesso em 15 mar. 2011.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (IEA) Disponível em <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4136>. Acesso em: 15 mar. 2011.

JANKOVIC, D.; COLLETT, M. A.; LUBBERS, M.W.; Rakonjac, J. Direct selection and phage display of a Gram-positive secretome. *Genome Biol.*, v. 8, R266, 2007.

JOHNSON, E.H.; OLIVEIRA, S.C.; RIBEIRO, O.C.; SILVA, J.A. Serological detection of abscesses caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* using the DIG-ELISA. *Proc. IV Int. Conf. Goats*, Brasília, p. 1358, 1987.

JOLLY, R.D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*, *J. Appl. Bacteriol.*, v. 29, p. 189–196, 1966.

JONES, D. & COLLINS, M. D.. Irregular, nonsporing gram-positive rods, section 15. pages 1261–1579 in *bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG (Eds.). Williams & Wilkins, Co., Baltimore, MD, 1986.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia Veterinária*. Ed. Manole, 6ª ed. 2000.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol*, v. 11, p. 129-63, 1993.

KAZMIERCZAK M.J., WIEDMANN M. E BOOR K.J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* v. 69. p. 527-43, 2005.

KESTINTEPE H. Stabilization of *Corynebacterium ovis* antigens for serum agglutination test. *Firat Univ. Vet. Fak., Dergisi.* v. 3, 84-93, 1976.

KOCH, R. The etiology of tuberculosis 1882. *American Review of Tuberculosis.* v. 3, p.221-230, 1932.

KOFFAS, M. AND STEPHANOPOULOS, G. Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16: 361-366, 2005.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; COSTA, SG. Alérgeno para o diagnostico da linfandeiite caseosa em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.7, n.2, p.27-32, 1987.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; SCHERER, P. O. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesq. Vet. Bras.*, v.11, n.1 p.1-7, 1991.

LEAMASTER, B.R.; SHEN, D.T.; GORHAM, J.R.; LEATHERS, C.W.; WELLS, H.D. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis, *Am. J. Vet. Res.*, v. 48, p. 869-872, 1987.

LEHMAN, K. B.; NEUMANN, R.. Atlas und grundriss der bakeriologie und lehrbuch der speziellen bakteriologischen diagnostik. 1st ed. . J.F. Lehmann, Munchen, 1896.

LINHARES, H. Contribuição ao estudo da patologia da lepra murina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v.37 n.4, 1944.

LIPSKY, B.A.; GOLDBERGER, A.C.; TOMPKINS, L.S.; PLORDE, J.J. Infections caused by nondiphtheria corynebacteria, *Rev. Infect. Dis.*, v. 4, p. 1220–1235, 1982

LIU, D.T.; CHAN, W.M.; FAN, D.S.; LAM, D.S. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Br. J. Ophthalmol.*, v. 89, p. 245–246, 2005.

LUND, A.; ALMLID, T.; LARSEN, H.J. & STEINE, T. Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. *Acta Vet. Scand.*, v.23, 473-482, 1982.

MAKI, L.R.; SHEN, S.; BERGSTROM, R.C. & STETZENBACH, L.D. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* v.46, p. 212-214, 1985.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa DAS n. 6 de 8 de janeiro de 2004. Regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, 2004.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa DAS n. 87 da secretaria de Defesa Agropeduária, de 10 de dezembro de 2004. Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO) 2004.

MATT, P.; FU, Z.; FU Q.; VAN EYK, J.E. Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. *Physiol Genomics.*, v. 33, p 7-12, 2008.

McNAMARA, P.J.; CUEVAS, W.A.; SONGER, J.G. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology, *Gene*, v. 156, p. 113–118, 1995.

MENZIES, P.I.; HWANG, T.-I.; PRESCOTT, J.F. Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats, *Vet. Microbiol.*, v. 100, p.129–137, 2004.

MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. The Genus *Corynebacterium*, in: Merchant I.A., Packer R.A. (Eds.), *Veterinary bacteriology and virology*, The Iowa State University Press, Iowa, pp. 425–440, 1967.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA L.; SCHAEER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 107, 249-54, 2005.

MUCKLE, C.A.; MENZIES, P.I.; Li, u.; HWANG, T.; VAN WESENBEECK, M. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, n.30, p.47-58, 1992.

MUCKLE, C.A. & GYLES, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Can. J. Comp. Med.*, v. 46, p. 206–208, 1982.

NAIN, S.P.S.; GARG, D.N. & CHANDIRAMANI, N.K. An agar-gel-immunoprecipitation test for the detection of *Corynebacterium ovis* antibodies in sheep and goats sera. *Indian. J. Comp. Microbiol. Infect. Dis.*, v.5, p. 93-96, 1984.

OLIVEIRA, G. C. Atividades da Rede Genoma de Minas Gerais no biênio 2006-2007-apoio à Agroindústria: Sequenciamento do genoma da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Disponível em: <<http://bioinfo.cpqrr.fiocruz.br/files>> acesso em: 24 mar. 2011.

PACHECO, L. G. C., SLADE, S. E., SEYFFERT, N., SANTOS, A. R., CASTRO, T. L. P., SILVA, W. M., SANTOS, A. V., SANTOS, S. G., FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A. R., PIMENTA, A. M. C., MEYER, R., SILVA, A., SCRIVENS, J. H., OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, A., DOWSON, C. G. AND AZEVEDO, V. A combined approach for comparative exoproteome analysis of corynebacterium pseudotuberculosis *BMC Microbiol.*, v. 11, p.12, 2011.

PACHECO L.G.C. Avaliação do papel dos fatores sigma ECF da *Corynebacterium pseudotuberculosis* na virulência e na regulação da expressão gênica. Tese. 2009.

PACHECO L.G.C., PENA R.R., CASTRO T.L.P., DORELLA F.A., BAHIA R.C., CARMINATI R., FROTA M.N.L., OLIVEIRA S.C., MEYER R., ALVES F.S.F., MIYOSHI A., AZEVEDO V. Multiplex PCR Assay for Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Pure Cultures and for Rapid Detection of this Pathogen in Clinical Samples. *J. Med. Microbiol.* v. 56, p. 480-486, 2007.

PASCUAL, C., LAWSON, P. A., FARROW, J. A., GIMENEZ, M. N. AND COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16s rrna gene sequences *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45: 724-728, 1995.

PATON, M.W.; ROSE, I.R. HART, R.A.; SUTHERLAND, S.S.; MERCY, A.R., ELLIS, T.M.; DHALIWAL, J.A. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production, Aust. Vet. J., v. 71, p. 47–49, 1994.

PATON, M.W.; WALKER, S.B.; ROSE, I.R.; WATT, G.F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks, Aust. Vet. J., v. 81, p. 91–95, 2003.

PAULE, B. J. A. Estudos de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e de suas interações com o hospedeiro caprino. Tese, Doutorado em Imunologia, Instituto de Ciências da saúde da UFBA. 138p. 2003.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C. R.; VALE, V. L. C.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; GOES, A. M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting, Vet. Immunol. Immunopathol., v. 96, p. 129-139, 2003.

PAULE, B.J.A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L.F.; BAHIA, C.R.; CARMINATI, R.; REGIS, L.F.; VALE, V.L.C.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Protein Expr. Purif., v.34, p. 311-166, 2004.

PEPIN, M.; PITTET, J.C.; OLIVER, M.; GOHIN, I. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. J. Leukoc. Biol., v. 56, p. 666-670, 1994.

PEPIN, M.; SEOW, H.F.; CORNER, L.; ROTHHEL, J.S.; HODGSON, A.L.; WOOD, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. Vet Res., v. 28, p. 149-163, 1997.

REBOUÇAS, M.F; PORTELA, R. W.; LIMA, D. D.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; VALE, V. V.; MYIOSHI, A. AZEVEDO, V. MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific interferon-gamma production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. J Vet Diagn Invest, v. 23, 2011.

RENSHAW, H.W.; GRAFF, V.P. & GATES, N.L. Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: Isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Moraxella* spp from internal abscesses in emaciated ewes. Am. J. Vet. Res. v.40, 1110-1114, 1979.

RIBEIRO, M.G.; JÚNIOR, J.G.D.; PAES, A.C.; BARBOSA, P.G.; JÚNIOR, G.N.; LISTONI, F.J.P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina, Arq. Inst. Biol., v. 68, p. 23-28, 2001.

RUA-DOMENECH, R.; GODCHILD, A.T.; VORDEMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFTON-HADLEY, R.S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic technique. Research in Veterinary Science. v.81, p. 190-210, 2006.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 3ed. Cold Spring Harbor, CSHL Press. 1989.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002.

SEITZSCHENK. The technology leader in depth filters. Palm corporation. Maryland, 2002.

SEYFFERT, N. *et al.*. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Res. Vet. Sc. v. 88. p. 50-55, 2010.

SEYFFERT, N. Isolamento, identificação e análise molecular do gene *cpsec39* codificador de uma proteína exclusiva de *Corynebacterium pseudotuberculosis*: perspectivas no desenvolvimento de métodos profiláticos para o controle da linfadenite caseosa. 97p. Tese. 2009.

SHEN, D.T.; JEN, L.W. & GORHAM, J.R. The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Proc. 3rd Int. Conf. Goat Prod. Dis., Tucson, Arizona, p. 445-448, 1982.

SHIGIDI, M.T.A. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Brit. Vet. J. v. 135, p 172-177, 1979.

SHIGIDI, M.T.A. An indirect haemagglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Res. Vet. Sci. v.24, p. 57-60, 1978.

SHIGIDI, M.T.A. Antigenic relationship of various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Bull. Epizootic Dis. Africa. v.22, p. 263-269, 1974.

SILVA, P. E. G.. PINHEIRO, S. R.; LEAL, M. L. R.; BERTAGNON, H. G.; MOTTA, P. M. P. C.; SINHORINI, I.L.; VASCONCELLOS, S. A.; BENESI, F. J. Teste da tuberculinização em caprinos (*Cabra hircus*) experimentalmente sensibilizados. Ciência Rural, v.36, n.3, p. 880-886, 2006.

SONGER, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence, Trends Microbiol., v. 5, p. 156–160, 1997.

TASHJIAN, J.J.; CAMPBELL, S.G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study, Am. J. Vet. Res., .v. 44, p. 690–693, 1983.

TAUCH, A., KAISER, O., HAIN, T., GOESMANN, A., WEISSHAAR, B., ALBERSMEIER, A., BEKEL, T., BISCHOFF, N., BRUNE, I., CHAKRABORTY, T., KALINOWSKI, J., MEYER, F., RUPP, O., SCHNEIKER, S., VIEHOEVER, P. AND PÜHLER, A. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen corynebacterium jeikeium k411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora *J. Bacteriol.*, 187: 4671-4682, 2005.

TER LAAK, E.A.; BOSCH, J.; BIJL, G.C.; SCHREUDER, B.E. Double-antibody sandwich enzymelinked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1125–1132, 1992.

TIZARD, I.R. *Veterinary immunology*. 8.ed. Philadelphia: Saunders, 379 p. 2008.

PPD TUBERCULINA BOVINA. Dr.Ricardo Spacagna Jordão- CRMVSP14.743. São Paulo. Bula de uso veterinário. 1994.

WILLIAMSON, L.H. Caseous Lymphadenitis en Small Ruminants. *Veterynary Clinics of North America: Food Animal Praticce*. n. 2,v.17, p.359-371, 2001.

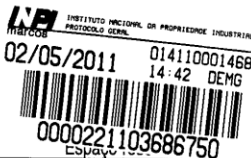
WOOLDRIDGE, K. *et al.* Bacterial secreted proteins secretory mechanisms and role in pathogenics, 512p. 2009.

YEN, Y.T.; BHATTACHARYA, M.; STATHOPOULOS, C. Genome-wide in silico mapping of the secretome in pathogenic *Yersinia pestis* KIM. *FEMS Microbiol Lett.* v.279, p.56-63, 2008.

YOZWIAK, M. L; & SONGER, J. G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* n.54, p.3392-3397, 1993.

ANEXO 1. Depósito do pedido de Patente

UFMG

	<p style="text-align: center;">< Uso exclusivo do INPI ></p> <p style="text-align: right;">Espaço para etiqueta</p>
---	---

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 1.2 Qualificação: INST. DE ENSINO E PESQUISA
 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
 1.4 Endereço Completo: AV ANTÔNIO CARLOS, 6627. PAMPULHA
 1.5 CEP: 31270-901 1.6 Telefone: 31 3409-4774 1.7 Fax: 31 3409-6423
 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **PATENTE DE INVENÇÃO**

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

"Teste de pele para diagnóstico da linfadenite caseosa subclínica em caprinos e ovinos"

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº _____ Data de Depósito: _____

- 5. Prioridade:** interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Asinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
 6.2 Qualificação: Professor 6.3 CPF: 283.171.225-49
 6.4 Endereço completo: Rua Padre Leopoldo Mertens, Bairro São Francisco, Belo Horizonte/MG
 6.5 CEP: 31255-200 6.6 Telefone: 31 3409-4774 6.7 Fax: 31 3409-6425
 6.8 E-Mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: 2 nº de CDs ou DVDs (original e cópia).

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: 2 fl.

Listagem de seqüências em formato impresso: fls.

Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):


(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	33 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	2 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	1 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) anexo 1, CNPJ, Portaria				7 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 49 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

BM, 02/05/11
Local e Data


Assinatura e Carimbo

Prof. Marco Aurélio Romano-Silva
Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa/UFMG
Nomeação DOU nº 4.415/2010

Anexo 1

6. Inventor

6.9 Nome: Alessandro de Sá Guimarães

6.10 Qualificação: Médico Veterinário

6.11 CPF: 985.489.646-34

6.12 Endereço: Rua Santos, 80, Apto 302, Bairro Jardim América – Belo Horizonte - MG

6.13 CEP: 30.460-700

6.14 Telefone: (31) 3409-4774

6.15 FAX: (31) 3409-6430

6.16 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

6.17 Nome: Camila Azevedo Antunes de Oliveira

6.18 Qualificação: Biomédica

6.19 CPF: 076.755.436-10

6.20 Endereço: Rua Guilherme de Almeida, 521, Apto 202, Bairro Santo Antônio – Belo Horizonte - MG

6.21 CEP:

6.22 Telefone: (31) 3409-4774

6.23 FAX: (31) 3409-6430

6.24 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

6.25 Nome: Núbia Seyffert

6.26 Qualificação: Bióloga

6.27 CPF: 000.834.780-86

6.28 Endereço: Rua Alameda dos Coqueiros, 690, Apto 12, Bairro São Luiz – Belo Horizonte - MG

6.29 CEP:

6.30 Telefone: (31) 3409-4774

6.31 FAX: (31) 3409-6430

6.32 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

6.33 Nome: Fernanda Alves Dorella

6.34 Qualificação: Bióloga

6.35 CPF: 013.392.266-93

6.36 Endereço: Rua dos Bandolins, 215, Apto 602, Bairro Conjunto Califórnia I – Belo Horizonte - MG

6.37 CEP:

6.38 Telefone: (31) 3409-4774

6.39 FAX: (31) 3409-6430

6.40 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

6.41 Nome: Sintia Sila de Almeida

6.42 Qualificação: Bióloga

6.43 CPF: 424.765.262-15

6.44 Endereço: Rua das Bandeiras, 321, Bairro Indaiá – Belo Horizonte - MG

6.45 CEP: 31.270-090

6.46 Telefone: (31) 3409-4774

6.47 FAX: (31) 3409-6430

6.48 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

6.49 Nome: Anderson Miyoshi
6.50 Qualificação: Professor
6.51 CPF: 034.357.036-01
6.52 Endereço: Rua Hélio de Senna Figueiredo, 112, Apto 101, Bairro Serrano – Belo Horizonte - MG
6.53 CEP: 30.882-600
6.54 Telefone: (31) 3409-4774 **6.55 FAX:** (31) 3409-6430
6.56 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

6.57 Nome: Aurora Maria Guimarães Gouveia
6.58 Qualificação: Médica Veterinária
6.59 CPF: 186.143.026-49
6.60 Endereço: Rua Dr Alípio Goulart, 136, Bairro Serra – Belo Horizonte - MG
6.61 CEP:
6.62 Telefone: (31) 3409-4774 **6.63 FAX:** (31) 3409-6430
6.64 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



DA785100F7FE6045

Campo 2



CC457FF3308A4A56

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: skin test.txt
- Data de Geração do Código: 26-04-2011
- Hora de Geração do Código: 14:50:11
- Código de Controle:
 - Campo 1: DA785100F7FE6045
 - Campo 2: CC457FF3308A4A56



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
GABINETE DO REITOR

PORTARIA Nº 042, DE 31 DE MARÇO DE 2010

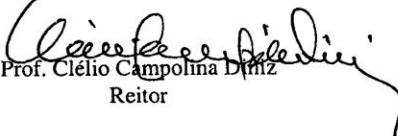
O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, no uso de suas atribuições e, de acordo com o disposto nos artigos 11 e 12 do Decreto-Lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1967,

RESOLVE:

Delegar competência ao **PRÓ-REITOR DE PESQUISA**, professor **RENATO DE LIMA SANTOS**, e ao seu substituto eventual, para, no âmbito da Pró-Reitoria de Pesquisa:

- a) autorizar a realização de despesas dentro dos limites orçamentários da Unidade 153273;
- b) autorizar a concessão de suprimento de fundos a servidores da Unidade, bem como determinar a baixa de responsabilidade;
- c) requisitar passagens e transportes em geral, por quaisquer vias, nos limites da dotação orçamentária da Unidade Gestora 153273;
- d) autorizar viagens de servidores, a serviço da Unidade, arbitrando-lhes as respectivas diárias, obedecidas as disposições legais pertinentes;
- e) assinar termos de outorga, convênios de cooperação e contratos com a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG, Federação das Indústrias e suas filiadas, Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico – CNPq, Financiadora de Estudos e Projeto – Finep e do Ministério da Ciência e Tecnologia;
- f) assinar contratos, decorrentes de licitação, de sua dispensa ou inexigibilidade, no âmbito da Pró-Reitoria de Pesquisa.
- g) assinar todo e qualquer documento necessário para depósito, processamento, adição, retificação, substituição, modificação, ampliação e resposta de relatórios referentes a objeto de proteção de Propriedade Intelectual junto aos órgãos competentes, em âmbito nacional e internacional.

Belo Horizonte, 31 de março de 2010.


Prof. Clélio Campolina Damázio
Reitor

//ma

L:\Document\Portaria\p10-042

Avenida Antônio Carlos, 6627 - 31270-901 - Belo Horizonte - Minas Gerais
Tel: (31) 3409-4127 - Fax: (31) 3409-4130 - adm@gabinete.ufmg.br - Home page: www.ufmg.br



Nº 4.440-Autorizar o afastamento da sala de servidora ZÉLIA INÊS PORTELA LODOATO, Professora Associada, no período de 17/07/2010 a 26/07/2010, para participar do "21º International Pig Veterinary Society Congress" em Vancouver/Canadá, com ênfase limitado. Processo nº 23071024239/2010-15.

O Reitor da Universidade Federal de Minas Gerais, no uso de atribuição conferida pelo artigo 3º, inciso II do Decreto nº 228, de 11/01/91, tendo em vista o artigo 24 do Estatuto da UFMG, resolve:

Nº 4.415-Nomear o servidor MARCO AURÉLIO ROMANO SILVA, inscrição UFMG nº 206957, matrícula SIAPE nº 211330, CPF nº 618.220.606-30, ocupante do cargo de Professor Titular, para exercer o cargo em comissão de Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa, código CD-3, a partir de 03/07/2010.

O Reitor da Universidade Federal de Minas Gerais, no uso de atribuição conferida pelo artigo 3º, inciso II do Decreto nº 228, de 11/01/91, tendo em vista o artigo 24 do Estatuto da UFMG, resolve:

Nº 4.436-Nomear a servidora LÍGIA MARIA MOREIRA DUMONT, inscrição UFMG nº 21126-3, matrícula SIAPE nº 6315967, CPF nº 277.551.606-20, nomeada para o cargo de Professor Titular, para exercer o cargo em comissão de Diretora de Cooperação Institucional, código CD-4, a partir de 01/07/2010.

O Reitor da Universidade Federal de Minas Gerais, no uso de atribuição conferida pelo artigo 3º, inciso II do Decreto nº 228, de 11/01/91, tendo em vista o artigo 46 do Estatuto da UFMG, resolve:

Nº 4.438-Nomear a servidora BEATRIZ VALADARES CENDÓN, inscrição UFMG nº 14478-9, matrícula SIAPE nº 1227884, CPF nº 280.347.296-00, ocupante do cargo de Professor Associado, Nível 02,

para exercer, em caráter "pro tempore", o cargo em comissão de Diretora da Escola de Ciência da Informação, código CD-3, a partir de 01/07/2010, em virtude de exoneração, a pedido, de servidora Lígia Maria Moreira Dumont.

O Reitor da Universidade Federal de Minas Gerais, no uso de suas atribuições, resolve:

Nº 4.435 - Exonerar, a pedido, do cargo em comissão de Diretora da Escola de Ciência da Informação, código CD-3, a partir de 01/07/2010, a servidora BEATRIZ VALADARES CENDÓN, inscrição UFMG nº 21126-3, matrícula SIAPE nº 6315967, ocupante do cargo de Professor Associado, Nível 02, nomeada pela Portaria nº 2694, de 12/09/2006.

Nº 4.437 - Exonerar, do cargo em comissão de Vice-Diretora da Escola de Ciência da Informação, código CD-4, a partir de 01/07/2010, a servidora BEATRIZ VALADARES CENDÓN, inscrição UFMG nº 14478-9, matrícula SIAPE nº 1227884, ocupante do cargo de Professor Associado, Nível 02, nomeada pela Portaria nº 2694, de 12/09/2006, em virtude de sua nomeação para o cargo em comissão de Diretora da referida Escola.

CLÉLIO CAMPOLINA DINIZ

DEPARTAMENTO DE ADMINISTRAÇÃO DE PESSOAL

PORTARIA Nº 4.414, DE 16 DE JULHO DE 2010

O Diretor-Geral do Departamento de Administração de Pessoal da Universidade Federal de Minas Gerais, no uso de atribuição conferida pela Portaria de Delegação de Competências nº 046, de 31/03/2010, do Magnífico Reitor, resolve:

Dispensar da função de Chefe do Departamento de Saúde Mental, código FG-3, a partir de 30/06/2010, o servidor MARCO AURÉLIO ROMANO SILVA, inscrição UFMG nº 206957, matrícula SIAPE nº 211330, CPF nº 618.220.606-30, ocupante do cargo de Professor Titular, lotado na Faculdade de Medicina, designado pela Portaria nº 6018, de 14/12/2009.

GILMAR LIMA GUIMARÃES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO PRO-REITORIA DE ADMINISTRAÇÃO PORTARIA Nº 545, DE 16 DE JULHO DE 2010

O Pró-Reitor de Administração da Universidade Federal de Ouro Preto, no uso de competência que lhe foi delegada pela Portaria nº 540, de 03/08/94, considerando: As Portarias Normativas Interministeriais MPOC/MEC nº 22, de 30/04/2007, publicada no D.O.U. de 02/05/2007 e nº 24, de 21/07/2007, publicadas no D.O.U. de 24/07/2007; o Processo UPOP de concessão de licença nº 2.820/2010 e o Processo UPOP de nomeação nº 3.812/2010, resolve:

Art. 1º - Nomear, em caráter efetivo, nos termos do artigo 9º, inciso II da Lei nº 112, de 11 de dezembro de 1990, Cristiano de Carvalho Lima, inscrito em concurso público de provas e títulos (Edital PRAD nº 91, de 30 de março de 2010, publicado no DOU de 31/03/2010), homologado pelo RAS/UFOP nº 4.850, de 24 de junho de 2010, publicado no DOU de 30/06/2010, para o cargo de Professor de 2ª Grau, classe Assunto, nível I, do carreira de magistério superior do quadro de pessoal desta instituição, em regime de trabalho de 40 horas semanais com dedicação exclusiva, em vaga de código 0321216, proveniente da exoneração de João Fernando Martins Higazi, conforme Portaria PRAD nº 261, de 05 de abril de 2010, publicada no DOU de 07/04/2010. Fungéria única: O servidor deverá ser lotado no Departamento de Geografia da Escola de Minas/UFOP.

Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação no DOU.

ANDRÉ LUIS DOS SANTOS LANA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PORTARIAS DE 16 DE JULHO DE 2010

O Reitor da Universidade Federal de Santa Catarina, no uso de suas atribuições estatutárias e regimentais, tendo em vista o que consta no Memorando nº 109/PRDHS/2010, de 12/7/2010, resolve:

Nº 936 - Alterar parcialmente, a partir de 12/7/2010, o Anexo I da Portaria nº 321/GR/97, publicada no DOU de 21/01/97, Seção II, páginas 473 e 477, na forma abaixo:

Table with 2 columns: COD. and DENOMINAÇÃO DO FG. It lists various functional groups like 'Seção de Atenção à Saúde Suplementar do Departamento de Atenção Social e à Saúde do Pessoal da Pró-Reitoria de Desenvolvimento Humano e Social'.

O Reitor da Universidade Federal de Santa Catarina, no uso de suas atribuições estatutárias e regimentais, resolve:

Nº 967 - DISPENSAR, a partir de 19/6/2010, LEONOR DE QUEIROZ LIMA, Médico, MANSIS nº 120221, SIAPE nº 633948, em exercício das funções de Chefe do Serviço de Engenharia de Segurança do Trabalho do Departamento de Desenvolvimento de Atenção Social e à Saúde da Pró-Reitoria de Direção e Funções Gratiificadas, de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97, para as quais havia sido designada pela Portaria nº 683/GR/2008, de 4/6/2008. (Ref. Memorando nº 014/DDAS/2010)

Nº 968 - DISPENSAR, a partir de 19/6/2010, PAULO EDUARDO BOTELHO, Assistente em Administração, MANSIS nº 140974, SIAPE nº 1659568, em exercício das funções de Chefe da Divisão de Saúde e Segurança do Trabalho do Departamento de Desenvolvimento de Atenção Social e à Saúde da Pró-Reitoria de Desenvolvimento Humano e Social, código FG-3, integrante do Quadro Distributivo de Cargos e Direção e Funções Gratiificadas, de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97, para as quais havia sido designado pela Portaria nº 638/GR/2009, de 19/5/2009. (Ref. Memorando nº 014/DDAS/2010)

Nº 969 - DESIGNAR, a partir de 19/6/2010, PAULO EDUARDO BOTELHO, Assistente em Administração, CPF nº 607.692.899-31, MANSIS nº 140974, SIAPE nº 1659568, para exercer as funções de Chefe da Divisão de Saúde Suplementar do Departamento de Desenvolvimento de Atenção Social e à Saúde da Pró-Reitoria de Direção e Funções Gratiificadas, de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97, para um mandato de dois anos. (Ref. Memorando nº 014/DDAS/2010)

Nº 970 - DESIGNAR, a partir de 19/6/2010, LEONOR DE QUEIROZ LIMA, Médico, CPF nº 607.692.899-32, MANSIS nº 120221, SIAPE nº 633948, para exercer as funções de Chefe da Divisão de Saúde e Segurança do Trabalho do Departamento de Desenvolvimento de Atenção Social e à Saúde da Pró-Reitoria de Direção e Funções Gratiificadas, de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97, para um mandato de dois anos. (Ref. Memorando nº 014/DDAS/2010)

Nº 971 - DESIGNAR, a partir de 19/6/2010, LUCIANO FERREIRA FARIAS, Técnico em Segurança do Trabalho, CPF nº 377.914.179-15, MANSIS nº 109228, SIAPE nº 1160040 para exercer as funções de Chefe do Serviço de Engenharia de Segurança do Trabalho do Departamento de Desenvolvimento de Atenção Social e à Saúde da Pró-Reitoria de Direção e Funções Gratiificadas, de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97. (Ref. Memorando nº 014/DDAS/2010)

Nº 972 - DESIGNAR, a partir de 17/8/2010, ARIODALDO DOLZAN, Professor Associado, CPF nº 036.897.238-32, MANSIS nº 63232, SIAPE nº 1157862, para exercer as funções de Chefe do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico, código FG-1, integrante do Quadro Distributivo de Cargos e Direção e Funções Gratiificadas de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97, para um mandato de dois anos. (Ref. Memorando nº 014/EQA/2010)

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico http://www.in.gov.br/ufsc/edcds.html, pelo código 00022010071900033

Nº 976 - DESIGNAR, a partir de 17/8/2010, SILVANA DE GASPARI, Professora Adjunta, CPF nº 027.841.598-92, MANSIS nº 103080, SIAPE nº 1159750, para exercer as funções de Chefe do Departamento de Língua e Literatura Estrangeira do Centro de Comunicação e Expressão, código FG-1, integrante do Quadro Distributivo de Cargos e Direção e Funções Gratiificadas de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97, para um mandato de dois anos. (Ref. Memorando nº 230/CCCE/2010)

Nº 978 - DISPENSAR, a partir de 17/7/2010, ANA LÍDIA CAMPOS BRIZOLA, Assistente em Administração, MANSIS nº 81714, SIAPE nº 1158700, em exercício das funções de Chefe do Serviço de Expediente do Museu Universitário da Secretaria de Cultura e Arts, código FG-4, integrante do Quadro Distributivo de Cargos e Direção e Funções Gratiificadas de que trata a Portaria nº 16001/97, de 16/01/97, para as quais havia sido designada pela Portaria nº 089/GR/2009, de 2/2/2009. (Ref. Memorando nº 28/MU/2010)

Nº 982 - DISPENSAR, a partir de 12/7/2010, TASSIANE CASTAMANN ALGAYER, Assistente em Administração, MANSIS nº 141725, SIAPE nº 1668759, para exercer as funções de Chefe da Seção de Atenção à Saúde Suplementar do Departamento de Desenvolvimento de Atenção Social e à Saúde do Pessoal da Pró-Reitoria de Desenvolvimento Humano e Social, código FG-3, integrante do Quadro Distributivo de Cargos e Direção e Funções Gratiificadas, de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97, para as quais havia sido designada pela Portaria nº 457/GR/2010, de 19/4/2010. (Ref. Memorando nº 109/PRDHS/2010)

Nº 983 - DESIGNAR, a partir de 12/7/2010, TASSIANE CASTAMANN ALGAYER, Assistente em Administração, MANSIS nº 141725, SIAPE nº 1668759, para exercer as funções de Chefe da Seção de Expediente da Pró-Reitoria de Desenvolvimento Humano e Social, código FG-3, integrante do Quadro Distributivo de Cargos e Direção e Funções Gratiificadas, de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97. (Ref. Portaria nº 936/GR/2010 e Memorando nº 109/PRDHS/2010)

Nº 984 - DESIGNAR, a partir de 12/7/2010, MARCO PADILANO VASSELAI, Assistente em Administração, CPF nº 845.671.439-1, MANSIS nº 140900, SIAPE nº 1660229, para exercer as funções de Chefe do Serviço de Recepção e Atendimento ao Servidor da Pró-Reitoria de Desenvolvimento Humano e Social, código FG-4, integrante do Quadro Distributivo de Cargos e Direção e Funções Gratiificadas, de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97. (Ref. Memorando nº 109/PRDHS/2010)

Nº 988 - DESIGNAR, a partir de 17/8/2010, CÉLIA REGINA VENDRAMINI, Professora Associada, CPF nº 516.498.239-87, MANSIS nº 116534, SIAPE nº 431152, para exercer as funções de Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Educação do Centro de Ciências da Educação, código FG-1, integrante do Quadro Distributivo de Cargos e Direção e Funções Gratiificadas de que trata a Portaria nº 0321/GR/97, de 16/01/97, para um mandato de dois anos. (Ref. Memorando nº 131/CCED/2010)

Nº 991 - DESIGNAR, a partir de 19/6/2010, DILNEY CARVALHO DA SILVA, Operador de Câmara de Cinema e TV, CPF nº 697.170.440-15, MANSIS nº 134346, SIAPE nº 1459068, para exercer as funções de Chefe da Divisão de Áudio e Cinema da TV UFSC do Gabinete do Reitor, código FG-3, integrante do Quadro Distributivo de Cargos e Direção e Funções Gratiificadas. (Ref. Portaria nº 934/GR/2010 e Memorando nº 013/TV UFSC/2010)

ALVARO TOUBES PRATA

PORTARIA Nº 961, DE 15 DE JULHO DE 2010

O Vice-Reitor da Universidade Federal de Santa Catarina, no exercício da Reitoria, no uso de suas atribuições e diante do que consta da Lei nº 11.784, de 22 de setembro de 2008 e da Nota Técnica nº 001/2008/CGC/PSA/AMEC, resolve:

Art. 1º - RETIFICAR a Portaria nº 1.016/GR/2008 que trata do enquadramento no Plano de Carreira e Cargos do Magistério do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico - PCCM/EDDT das servidoras da UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA na parte que se refere ao docúcto abaixo relacionado.

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

ANEXO 2. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 160/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Caracterização de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico da linfadenite caseosa subclínica em ovinos e caprinos através de um teste de pele**", que tem como responsável **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **19/ 12/2007**.

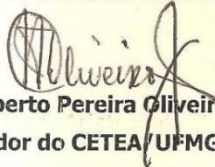
Este certificado expira-se em **19/ 12 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 160/2007**, related to the project entitled "**Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens for subclinical diagnosis of caseous lymphadenitis in goat and sheep by skin test**", under the supervision of **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 19, 2007**.

This certificate expires in **December 19, 2012**.

Belo Horizonte, 21 de Dezembro de 2007.



Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpg.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 3. Tabelas com a mensuração da espessura da pele de cada animal submetido aos testes.

Teste Intradérmico de Hipersensibilidade																	
GRUPO	N° do Animal	0 hora		24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas		Média	
		(a.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	TIH m	ct m	
A	5010	3,00	3,00	5,20	2,80	4,20	2,60	3,40	2,80	2,90	2,80	2,90	2,90	3,00	2,70	3,60	2,77
A	7142	4,00	3,90	4,60	3,70	3,90	2,90	3,30	2,60	3,00	2,50	3,10	2,60	3,20	2,50	3,52	2,80
A	7214	2,60	2,50	6,60	2,60	4,80	2,60	3,30	2,60	2,60	2,40	2,50	2,50	2,60	2,40	3,73	2,52
A	5018	2,40	2,60	3,70	2,70	3,00	2,80	3,10	2,80	2,30	2,70	2,40	2,60	2,30	2,60	2,80	2,70
A	7157	2,50	2,30	4,90	2,60	4,80	2,70	4,00	2,70	2,70	2,20	2,40	2,30	2,50	2,20	3,55	2,45
A	9332	2,50	2,50	6,10	2,70	3,80	2,60	3,00	2,50	2,50	2,50	2,30	2,40	2,40	2,30	3,35	2,50
A	7203	2,70	2,50	5,40	2,60	4,50	2,60	2,70	2,60	2,60	2,50	2,60	2,40	2,60	2,50	3,40	2,53
A	8307	2,70	2,70	5,40	2,80	4,60	2,90	3,50	2,80	2,70	2,60	2,60	2,70	2,60	2,70	3,57	2,75
A	9360	2,30	2,00	4,60	3,00	3,50	2,40	2,80	2,30	2,20	1,90	2,10	1,90	2,30	2,00	2,92	2,25
A	9386	2,40	2,30	5,60	2,60	4,20	2,80	3,40	2,80	2,40	2,50	2,30	2,30	2,30	2,20	3,37	2,53
	Média	2,71	2,63	5,21	2,81	4,13	2,69	3,25	2,65	2,59	2,46	2,52	2,46	2,58	2,41	3,38	2,58
	DP	0,50	0,52	0,82	0,34	0,59	0,16	0,37	0,16	0,25	0,25	0,30	0,27	0,30	0,23	0,30	0,17
	IC i															3,17	2,46
	IC s															3,59	2,70

Nota: IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

DP = desvio padrão.

a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, antes da inoculação.

p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, após a inoculação.

TIH = Teste Intradérmico de Hipersensibilidade – com as proteínas do secretoma de *C. pseudotuberculosis*

ct = controle – Solução tampão TrisHCl aplicada na região cervical direita como controle do teste.

TIH m = média do aumento espessura da pele em mm, por animal (entre 24h e 144h), no local da aplicação do TIH.

ct m = média do aumento espessura da pele em mm, por animal (entre 24h e 144h), no local da aplicação do ct.

Teste Intradérmico de Hipersensibilidade																	
GRUPO	N° do Animal	0 hora		24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas		Média	
		(a.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		(p.i.)		TIH m	ct m
		TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct	TIH	ct		
B	10453	2,40	2,30	4,40	2,40	3,80	3,00	2,70	2,20	2,30	2,30	2,30	2,20	2,40	2,30	2,98	2,40
B	10479	2,10	2,30	3,10	2,30	2,70	2,40	2,00	2,20	2,10	2,20	2,20	2,30	2,10	2,30	2,37	2,28
B	10472	2,50	2,60	3,40	2,50	3,40	2,60	2,30	2,70	2,30	2,70	2,40	2,50	2,40	2,50	2,70	2,58
B	10478	2,40	2,50	3,40	2,40	2,50	2,50	2,50	2,40	2,30	2,20	2,20	2,20	2,40	2,30	2,55	2,33
B	9382	2,60	2,40	4,20	3,20	3,60	2,50	3,10	2,50	2,30	2,30	2,40	2,40	2,40	2,30	3,00	2,53
B	9378	2,70	2,50	3,50	2,60	3,60	2,60	3,60	2,60	2,50	2,40	2,40	2,30	2,30	2,40	2,98	2,48
B	9385	2,60	2,60	3,60	2,50	3,60	2,50	3,20	2,50	2,50	2,40	2,30	2,40	2,40	2,50	2,93	2,47
B	10477	2,50	2,40	2,90	2,60	3,00	2,60	3,00	2,60	2,50	2,30	2,30	2,40	2,40	2,30	2,68	2,47
B	10476	2,30	2,40	4,60	2,30	3,40	2,30	2,70	2,40	2,10	2,30	2,20	2,40	2,20	2,30	2,87	2,33
B	10475	2,80	2,60	3,20	3,40	3,20	2,60	2,60	2,60	2,50	2,50	2,60	2,70	2,60	2,70	2,78	2,75
	Média	2,46	2,44	3,70	2,56	3,27	2,60	2,77	2,44	2,35	2,35	2,30	2,34	2,36	2,39	2,79	2,46
	DP	0,18	0,11	0,57	0,36	0,54	0,21	0,56	0,19	0,14	0,16	0,09	0,10	0,13	0,14	0,21	0,14
	IC i															2,63	2,36
	IC s															2,94	2,56

Nota: IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

DP = desvio padrão.

a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, antes da inoculação.

p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, após a inoculação.

TIH = Teste Intradérmico de Hipersensibilidade – com as proteínas do secretoma de *C. pseudotuberculosis*

ct = controle – Solução tampão TrisHCl aplicada na região cervical direita como controle do teste.

TIH m = média do aumento espessura da pele em mm, por animal (entre 24h e 144h), no local da aplicação do TIH.

ct m = média do aumento espessura da pele em mm, por animal (entre 24h e 144h), no local da aplicação do ct.

Teste Intradérmico de Hipersensibilidade										
GRUPO	Nº do Animal	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	Média	
		(a.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	
		TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	
A	5010	0,00	2,40	1,60	0,60	0,10	0,00	0,30	0,83	
A	7142	0,10	0,90	1,00	0,70	0,50	0,50	0,70	0,72	
A	7214	0,10	4,00	2,20	0,70	0,20	0,00	0,20	1,22	
A	5018	-0,20	1,00	0,20	0,30	-0,40	-0,20	-0,30	0,10	
A	7157	0,20	2,30	2,10	1,30	0,50	0,10	0,30	1,10	
A	9332	0,00	3,40	1,20	0,50	0,00	-0,10	0,10	0,85	
A	7203	0,20	2,80	1,90	0,10	0,10	0,20	0,10	0,87	
A	8307	0,00	2,60	1,70	0,70	0,10	-0,10	-0,10	0,82	
A	9360	0,30	1,60	1,10	0,50	0,30	0,20	0,30	0,67	
A	9386	0,10	3,00	1,40	0,60	-0,10	0,00	0,10	0,83	
Média		0,08	2,40	1,44	0,60	0,13	0,06	0,17	0,80	
DP		0,14	1,00	0,60	0,31	0,27	0,20	0,27	0,30	
IC i										0,59
IC s										1,01

Nota: IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

DP = desvio padrão

a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, antes da inoculação

p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, após a inoculação.

TIH = Teste Intradérmico de Hipersensibilidade - proteínas do secretoma de *C. pseudotuberculosis*

ct = controle – Solução tampão TrisHCl aplicada na região cervical direita como controle do teste.

TIH f = diferença da espessura da pele em mm, por animal (entre THI e ct).

Teste Intradérmico de Hipersensibilidade										
GRUPO	No. do Animal	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	Média	
		(a.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	(p.i.)	
		TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	TIH f	
B	10453	-0,20	0,80	0,30	-0,20	-0,10	-0,10	-0,20	0,08	
B	10479	-0,10	0,90	0,80	-0,40	-0,40	-0,10	-0,10	0,12	
B	10472	-0,10	1,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,10	0,22	
B	10478	0,20	1,00	1,10	0,60	0,00	0,00	0,10	0,47	
B	9382	0,20	0,90	1,00	1,00	0,10	0,10	-0,10	0,50	
B	9378	0,00	1,10	1,10	0,70	0,10	-0,10	-0,10	0,47	
B	9385	0,10	0,30	0,40	0,40	0,20	-0,10	0,10	0,22	
B	10477	-0,10	2,30	1,10	0,30	-0,20	-0,20	-0,10	0,53	
B	10476	0,20	-0,20	0,60	0,00	0,00	-0,10	-0,10	0,03	
B	10475	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Média		0,02	0,81	0,64	0,25	-0,02	-0,06	-0,04	0,26	
DP		0,15	0,69	0,45	0,43	0,18	0,08	0,11	0,21	
IC i										0,11
IC s										0,41

Nota: IC i = intervalo de confiança inferior (95%); IC s = intervalo de confiança superior (95%).

DP = desvio padrão

a.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, antes da inoculação

p.i. = medida da espessura da pele em mm, no local da aplicação, após a inoculação.

TIH = Teste Intradérmico de Hipersensibilidade - proteínas do secretoma de *C. pseudotuberculosis*

ct = controle – Solução tampão TrisHCl aplicada na região cervical direita como controle do teste.

TIH f = diferença da espessura da pele em mm, por animal (entre THI e ct).