

SÍLVIO ROMERO DE OLIVEIRA ABREU

**COMPARAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS
DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* DE CAPRINOS E OVINOS
DO SERTÃO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

RECIFE

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO –
UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
VETERINÁRIA**

**COMPARAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS
DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* DE CAPRINOS E OVINOS
DO SERTÃO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência Veterinária da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Doutor em Ciência
Veterinária.**

**Orientado: Sílvia Romero de Oliveira
Abreu**

**Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido
Mota**

RECIFE - PE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO -

UFRPE

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA

VETERINÁRIA

**COMPARAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS
DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* DE CAPRINOS E OVINOS
DO SERTÃO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

SÍLVIO ROMERO DE OLIVEIRA ABREU

**TESE DEFENDIDA E APROVADA PELA BANCA
EXAMINADORA**

ORIENTADOR:

Prof^o. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

EXAMINADORES:

Prof^o. Dr. Cleber Oliveira Soares (EMBRAPA-CNPGC-MS)

Prof^a. Dr. Hélio Langoni (UNESP-BOTUCATU)

Profª Drª Andréa Alice da Fonseca Oliveira (UFRPE)

Profº. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho (UFRPE)

—
Profº. Dr. Roberto Soares de Castro (UFRPE)

RECIFE - PE

2007

DEDICO

À minha esposa, amada, amiga e
companheira, e à minha família, sem
as quais a vida seria bem mais difícil
de ser vivida.

ORAÇÃO DA SABEDORIA

Senhor, dá-me a esperança para vencer minhas ilusões, todas.

Plantai em meu coração a semente do amor e ajuda-me a fazer feliz
o maior número da humanidade possível, para ampliar seus dias risonhos
e resumir as noites tristonhas.

Transforma meus rivais em companheiros, meus companheiros em
amigos e meus amigos em entes queridos.

Não me deixeis ser um cordeiro perante os fortes e nem um leão
diante dos fracos.

Dá-me o sabor de saber perdoar e afastai de mim o desejo de
vingança.

Senhor, iluminai meus olhos para que eu veja os defeitos da minha
alma e vendai-os para que eu não comente os defeitos alheios.

Senhor, levai de mim a tristeza e não a entregueis a mais ninguém.
Enchei meu coração com a divina fé, para sempre louvar o vosso
nome e arrancai de mim o orgulho e a presunção.
Deus, fazei de mim um homem realmente justo.

AGRADECIMENTOS

À Energia Suprema e Infinita que criou, cria e criará; fonte de luz e paz, meu
Deus;

À minha família, pelo apoio, compreensão e torcida, durante toda a minha
caminhada;

À minha esposa, pela dedicação, amor, respeito e confiança a mim
depositados, te amo muito;

A Rinaldo, pela orientação “paterna”, constante apoio e dedicação e,
principalmente, pelo respeito com que trata seus orientados;

A meus queridos amigos e companheiros de jornada, Cristina Coelho, Silvana
Pontual, Sérgio Alves, Miriam e todos que junto batalharam nesses sertões, sem os
quais não haveria material para trabalho nem incentivo para a luta, um muitíssimo
obrigado e um forte abraço a todos;

A Roberto Castro, por ajudar e torcer pelo meu sucesso, um grande

profissional e uma grande pessoa, muito obrigado;

A Grácia Rosinha e Cleber, por acreditarem no projeto e, principalmente, em mim, confiando o laboratório e recursos para que ele se tornasse realidade; que a luz que vocês geraram, seja fonte, sempre, de amor e paz nas suas vidas;

A Odinéia, pela dedicação e trabalho árduo, me substituindo competente e integralmente no laboratório após a minha partida, permitindo que o projeto fosse adiante; meu carinho, respeito e admiração, um cheiro;

A Taciana Ramalho, pelo carinho, amizade e companheirismo nesses dias difíceis e estressantes. Que essa amizade seja sempre forte, apesar da distância e do tempo;

A Wilton Júnior, sempre disponível para ajudar, companheiro sem o qual a jornada seria bem mais árdua, meu muito obrigado, de coração;

A todos que fazem o laboratório de Sanidade da Embrapa Gado de Corte, por terem me recebido de forma extremamente acolhedora, um grande abraço a todos;

Aos meus companheiros e companheiras do CESMAC, pela amizade, torcida e apoio na construção diária da minha vida, como profissional e, principalmente, como ser humano; em especial à profa. Karla Patrícia, pelo apoio concreto à minha tese, me substituindo nos momentos de ausência e torcendo pelo meu sucesso; a Giulliano e Giovana, pela amizade e confiança, que Deus abençoe o amor de vocês e o fruto dessa união; a Rômulo Mena e Sandra Mena, que a nossa amizade se fortaleça sempre, mesmo que a distância nos seja imposta, um abraço forte, do coração; a Roberto Rômulo, pelo ser humano que é, como pai, profissional e amigo, sinta-se abraçado, a Jairo e Ana Lúcia, exemplos de caráter e determinação, que a união e o amor de vocês cresça e se renove a cada adversidade da vida; a Cláudia Alessandra, grande amiga, companheira para todas as horas, um coração aberto e pronto para ajudar, a sua alegria e disposição a tornam muito especial, minha admiração e respeito pela pessoa que você é, um abraço Bem Forte; a Flaviana, Haudson, Evódia, Mércia, Alice Cristina, Sérgio, Fernanda Caju, Anelise, Flávia, Diogo, Thiago, Wagner,

Wilson, Marta, a todos um forte abraço, que Deus os abençoe;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na construção desse sonho, meu mais sincero muito obrigado.

RESUMO: Objetivou-se com este estudo comparar genotipicamente amostras de *Corynebacterium pseudotuberculosis* recuperadas do conteúdo de abscessos de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa procedentes do Sertão de Pernambuco, Brasil. Utilizou-se a técnica de fingerprint RFLP-PCR aplicadas aos genes *rpoB* e *Pld*. Os genes foram tratados com *Hpy-Ch 4* e *Msp I* e *Pst I* e *Msp I*, respectivamente. Os perfis de restrição observados foram semelhantes entre todas as amostras para os dois genes estudados. Avaliou-se o perfil de sensibilidade *in vitro* frente a 14 antimicrobianos. Inicialmente o conteúdo dos abscessos foi cultivado em ágar-sangue e as colônias isoladas foram identificadas pelo kit de identificação bioquímico API-Coryne (Bio-Merieux – França), sendo selecionadas as amostras Gram-positivas e nitrato-negativas, classificadas como *C. pseudotuberculosis*. Para a realização dos antibiogramas, utilizou-se a técnica de difusão em discos. A sensibilidade aos antimicrobianos demonstram que 96,8% das amostras foram sensíveis ao cloranfenicol e ciprofloxacina; 93,5% a norfloxacina e cefazolina; 90,3% a amoxicilina e tetraciclina; 87,1% a sulfa-trimetoprim; 83,9% a orbifloxacina; 77,4% a ampicilina, lincomicina e penicilina; 32% a gentamicina; 12,9% a novobiocina e 9,7% a neomicina. Quanto à resistência, 87,1% das amostras foram resistentes à novobiocina; 80,6% a neomicina; 41,9% a gentamicina; 19,3% a lincomicina; 16,1% a ampicilina, orbifloxacina e penicilina; 12,9% a sulfa-trimetoprim; 6,4% a cefazolina, norfloxacina e amoxicilina e 3,2% a ciprofloxacina, cloranfenicol e tetraciclina. Com exceção de uma amostra todas as demais apresentaram algum grau de resistência múltipla, sendo que 16% delas foram multirresistentes a aproximadamente 50% dos antimicrobianos testados. Concluiu-se que apesar de existir uma variação fenotípica entre as amostras analisadas que pode estar associada a um ou mais genes de resistência, os resultados da genotipagem demonstram não haver qualquer diferença nos padrões de fragmentos de bandas entre as amostras para os genes *pld* e *rpoB*, independente da origem da espécie hospedeira ou da área geográfica, indicando um padrão genotípico homogêneo de infecção na região estudada.

ABSTRACT: The main purpose of this study was to compare genotypically samples of *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtained from the abscesses of sheep and goats diagnosed with caseous lymphadenitis proceeding from the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. The RFLP-PCR technique was used to fingerprint the genes *rpoB* and *pld*, with the restriction enzymes *Hpy-Ch4* and *MspI*; and *PstI* and *MspI* applied, respectively. The banding pattern observed through electrophoreses was similar in all samples for both genes studied, independently of the restriction enzyme utilized. The *in vitro* sensitivity profile was also analyzed by testing the samples with 14 different antimicrobials. Initially, the contents of the abscesses were cultivated in blood-agar and the isolated colonies obtained were identified using the API-Coryne biochemical identification kit (Bio-Merieux, France), and selecting Gram-positive and nitrate-negative samples, which were classified as *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The disk diffusion technique was used to perform antibiograms and the results showed that 96.8% of the samples were sensitive to chloramphenicol and ciprofloxacin; 93.5% were sensitive to norfloxacin and cefazolin; 90.3% to amoxicillin and tetracycline; 87.1% to sulfa-trimethoprim; 83.9% to orbifloxacin; 77.4% to ampicillin, lincomycin and penicillin; 32% to gentamicin; 12.9% to novobiocin and 9.7% to neomycin. It was also noted that 87.1% of the samples were resistant to novobiocin; 80.6% to neomycin; 41.9% to gentamicin; 19.3% to lincomycin; 16.1% to ampicillin, orbifloxacin and penicillin; 12.9% to sulfa-trimethoprim; 6.4% to cefazolin, norfloxacin and amoxicillin, and 3.2% to ciprofloxacin, chloramphenicol and tetracycline. For all samples, with the exception of one, was found some degree of multiple resistances with 16% of them being multi-resistant to approximately 50% of the antimicrobial drugs tested. Based on those results, it is possible to conclude that there is a phenotypic variation among the samples analyzed, which could be associated to one or more resistance genes. The genotypic results did not demonstrate any difference on the band fragmentation pattern among the samples when analyzing the genes *pld* and *rpoB*, regardless of the host species origin or geographic area, indicating a homogeneous genotypic profile of the infection in the region of study.

LISTA DE TABELAS

EXPERIMENTO II

Página

- Tabela 1 - Percentuais de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente aos 14 antimicrobianos. 64**
- Tabela 2 - Multirresistência de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente aos 14 antimicrobianos 65**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

EXPERIMENTO I

Página

- Figura 1.** Mapa do Brasil com destaque para o Estado de Pernambuco e localização dos cinco municípios estudados para linfadenite caseosa em ovinos e caprinos na macro-região do Sertão, e a sua capital, Recife. Pernambuco, 2007..... 42
- Figura 2.** a) Perfil de bandas da reação de PCR utilizando primers do gene *pld* de *C. pseudotuberculosis*. Marcador de pares de base Low DNA Mass Ladder (1), controle negativo (2), padrão do gene *pld* (amostras 6, 7, 8 e 10).
b) Perfil de bandas da reação de PCR utilizando primers do gene *rpoB* de *C. pseudotuberculosis*. Marcador de pares de base Low DNA Mass Ladder (1), controle negativo (2), padrão do gene *pld* (amostras 67, 68, 69 e 70). 45
- Figura 3.** Perfis de restrição do gene *rpoB* digeridos com *Hpy-CH4* por PCR em gel de poliacrilamida a 15%.
a) Marcador Low DNA Mass Ladder (1), PCR não digerida (2), amostras de *C. pseudotuberculosis* (25, 27, 28, 29, 30, 32 e 34).
b) Produto de PCR do gene *rpoB* não digerido (01), marcador Low DNA Mass Ladder (02), produtos de PCR digeridos com *Msp I* (amostras 32, 34, 35, 36, 41, 42 e 43). 47

Perfis de restrição do gene *pld* (924 pb) digeridos com *PstI* por PCR em gel de poliacrilamida a 15%.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Etiologia	19
3.2 Epidemiologia	20
3.3 Patogenia	24
3.4 Diagnóstico e controle	26
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
EXPERIMENTO I	37
5 COMPARAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> ISOLADOS DE CAPRINOS E OVINOS COM LINFADENITE CASEOSA CRIADOS NO SERTÃO PERNAMBUCANO.	38
RESUMO	38
ABSTRACT	38
5.1 INTRODUÇÃO	39
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	42
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.4 CONCLUSÃO	50
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
EXPERIMENTO II	56
6 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i> DE AMOSTRAS DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> ISOLADAS DE CAPRINOS E OVINOS COM LINFADENITE CASEOSA NO SERTÃO PERNAMBUCANO.	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
6.1 INTRODUÇÃO	59
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	61
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.4 CONCLUSÃO	68

ovinos e 9.542.910 caprinos. O Estado de Pernambuco destaca-se nessas pecuárias com rebanhos estimados em 2004 em 1.533.132 caprinos e 943.068 ovinos (IBGE, 2006).

Segundo Ellis (1996), na maioria dos países que possuem regiões de clima árido e/ou semi-árido, a exploração da caprino-ovinocultura tem grande importância econômico-social, estando os criadores envolvidos com mais de um aspecto produtivo como carne, pele, leite e genética. No Brasil a pecuária de pequenos ruminantes é caracterizada como uma exploração multifuncional e de baixa utilização tecnológica (WANDER, 2003).

Apesar da caprino-ovinocultura brasileira apresentar potencial de produção capaz de atender ao mercado interno e externo e da demanda por produtos diferenciados de carne e couro de qualidade superior aumentar a cada ano, o potencial de exploração depende de esforços em pesquisa e desenvolvimento que tornem os empreendimentos relacionados economicamente sustentáveis (BRASIL, 2007).

Dados da FAO (2003), **citado por** Simplício et al. (2003), mostram indicadores de produtividade no segmento de carnes de caprinos e ovinos no Brasil abaixo da média mundial. Dessa forma, o Brasil participava com 1,32% do rebanho mundial que era de 743.374.353 caprinos em 2002. O abate mundial naquele ano foi de 2.500.000, ou seja, 0,77% do total abatido no mundo que foi de 323.442.174 caprinos. Portanto, o Brasil alcançava em torno de 25,51% de taxa de desfrute, encontrando-se bem aquém da taxa mundial que, em 2002, foi de 43,51%.

Os dados em relação à ovinocultura não são muito diferentes. Pois, com um rebanho de 15 milhões de cabeças, a participação do Brasil no efetivo mundial era, em 2002, de apenas 1,45%. Com um abate total de 4.500.000 animais, a taxa de desfrute na ovinocultura era de apenas 30%, contra uma taxa mundial para aquele ano de 47,31% (FAO, 2003 apud SIMPLÍCIO et al., 2003, p. 11).

Dados um pouco mais antigos, referentes a 1992, mostram que foram abatidos 1.639 mil caprinos e 1.196 mil ovinos na região Nordeste do Brasil. A produção de pele de caprinos e ovinos deslanados no Nordeste, em 2000, foi de seis milhões de unidades. Já a de ovinos lanados foi de 1,3 milhão de unidades. Entretanto, os nove matadouros-frigoríficos especializados em pequenos ruminantes no Nordeste possuem capacidade total para abate de 31.550 animais/dia; enquanto que a capacidade instalada dos curtumes nesta região é capaz de processar 12,2 milhões de peles/ano (BRASIL, 2007).

O Brasil vem observando nos últimos anos um interesse crescente por parte dos pecuaristas, de praticamente todas as regiões em investir na pecuária de pequenos ruminantes, mas havendo ainda a necessidade de uma melhor estruturação na cadeia produtiva, principalmente na implementação de técnicas de agregação de valor aos seus produtos (EMBRAPA, 2006).

Estes dados demonstram claramente a distância existente entre o grande potencial mercadológico e a realidade produtiva. Dentre os vários fatores que concorrem para a baixa produtividade destaca-se a sanidade dos rebanhos, incluindo fatores de grande impacto como verminoses, desequilíbrios nutricionais e doenças infecto-contagiosas (RIBEIRO, 1998).

Das enfermidades infecto-contagiosas, a linfadenite-caseosa (LC) assume grande importância do ponto de vista de perdas econômicas, pois devido ao seu caráter insidioso, tem sido apontada como um sério problema para um melhor rendimento da cadeia produtiva dos pequenos ruminantes (ALVES e PINHEIRO, 2000).

A LC tem como agente a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* que é um difteróide típico, bastante resistente ao ambiente, principalmente naqueles ricos em matéria orgânica. Sendo facilmente transmitido entre a população, costuma apresentar índices de prevalência altos e constantes (LANGENEGGER e LANGENEGGER, 1991; MØLLER et al., 2000).

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma espécie disseminada em várias regiões do mundo, sendo capaz de infectar inúmeras espécies domésticas além de ovinos e caprinos (AFZAL et al., 1996; ALEMAN et al., 1996; YERUHAM et al., 1996; BRAVERMAN et al., 1999; SELIM, 2001; ANDERSON et al., 2004). Independente do hospedeiro, *C. pseudotuberculosis* causa quadros clínicos que variam de emagrecimento progressivo ao aborto, podendo levar o animal a óbito. Em todos os casos há formação de abscessos caseosos, principalmente em linfonodos regionais, mas também em órgãos internos assim como no tecido subcutâneo (RENSHAW et al., 1979; PANTON et al., 1988; MØLLER et al., 2000).

O controle da LC tem sido realizado por meio da associação de técnicas de manejo como separação no rebanho dos animais clinicamente suspeitos, drenagem e/ou excisão dos abscessos, vacinação e identificação microbiológica e sorológica, tanto dos animais com sintomatologia clínica como e, principalmente, dos animais sem sintomas aparentes (BROWN et al., 1986; MENZIES e MUCKLE, 1989;

PANTON et al., 1994).

O tratamento com antibióticos não parece ter resultados satisfatórios, seja pelas características das lesões que dificultam o acesso dos medicamentos *in vivo* ao foco da infecção, seja pelas características do agente como a produção de biofilme ou a capacidade em causar infecção intracelular, restringindo a ação de muitas dessas drogas (AUGUSTINE e RENSCHAW, 1982 **apud** JOHNSON et al., 1993b; OLSON et al. 2002). No entanto, *C. pseudotuberculosis*, apesar de raro, pode causar infecções com sintomas semelhantes também no ser humano (PEEL et al., 1997). Esta característica de zoonose associada à necessidade de maiores conhecimentos fenotípicos e genotípicos, justifica a obtenção de dados sobre o perfil de sensibilidade antimicrobiana de *C. pseudotuberculosis*. O conhecimento da existência ou não de variações genéticas entre amostras de uma região endêmica é um dos primeiros passos na compreensão do comportamento epidemiológico desse agente.

O aprofundamento do conhecimento da epidemiologia molecular de *C. pseudotuberculosis* deverá contribuir positivamente para futuras ações de diagnóstico, controle, imunoprofilaxia e talvez, até a erradicação da LC.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar genotipicamente isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos provenientes do Sertão pernambucano e avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana desses isolados.

2.2 Específicos

- 1 Isolar amostras de *Corynebacterium* spp de abscessos superficiais de caprinos e ovinos provenientes do Sertão pernambucano;
- 2 Identificar, dentre as amostras, os isolados pertencentes à espécie *C. pseudotuberculosis* pelo teste bioquímico APIcoryne (BioMerieux-França);
- 3 Comparar genotipicamente os isolados de *C. pseudotuberculosis* por RFLP-PCR, utilizando o gene de virulência *pld* e o gene da subunidade β da RNA polimerase, *rpoB*;
- 4 Avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados frente a antimicrobianos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Etiologia

A linfadenite caseosa é uma doença infecto-contagiosa causada pela bactéria Gram-positiva denominada *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que tem como principais hospedeiros os caprinos e ovinos. Os bovinos, bubalinos e eqüinos também podem se infectar naturalmente e, eventualmente, o homem também pode desenvolver lesão por esta bactéria (ALEMAN et al., 1996; PEEL et al., 1997; COSTA et al., 1998; SELIM, 2001).

A célula de *Corynebacterium* freqüentemente tem uma terminação dilatada o que confere uma aparência em forma de clava (daí o nome do gênero: *koryne* - palavra grega que significa “clava”). Entretanto, algumas corinebactérias são pleomórficas e formam elementos cocóides durante o crescimento. *C. pseudotuberculosis* é um difteróide típico, podendo variar de cocóides a filamentosos, e não apresentando cápsula. A parede celular é típica de uma corinebactéria, com elevada concentração de lipídios, que torna as células hidrofóbicas contribuindo para a sua sobrevivência dentro de fagócitos e sua leucotoxicidade (BIBERSTAIN e HIRSH, 2003).

O comportamento bioquímico de *C. pseudotuberculosis* varia de acordo com as amostras isoladas no que se refere à capacidade de metabolizar, entre outras substâncias, uréia, nitrato, açúcares como dextrose e manose, e álcoois, como manitol e sorbitol. Este parâmetro é utilizado nas pesquisas que visam conhecer as características moleculares dos diferentes isolados (COSTA et al., 1998; CONNOR et al., 2000).

Até o momento foram reconhecidos dois biovars que se diferenciam pela capacidade ou não em reduzir nitrato: o biovar *equi* que é nitrato positivo em sua maioria absoluta e o biovar *ovis* que é nitrato-negativo (SONGER et al., 1988).

Apesar de Biberstain et al. (1971) terem defendido que *C. pseudotuberculosis* redutores de nitrato (nitrato-positivo) são isolados de eqüinos e bovinos e os não-redutores (nitrato-negativo) isolados apenas de ovinos, caprinos e bovinos, os trabalhos realizados posteriormente por Costa et al. (1998) e Connor et al. (2000), demonstraram que existem biovars *equi* incapazes de reduzirem o nitrato. Entretanto, é importante frisar que o trabalho de ribotipagem desenvolvido por Costa et al.

(1998), coloca o isolado negativo de equino idêntico a todos os isolados positivos da mesma espécie, mas diferente dos isolados negativos de caprinos e ovinos, o que mantém o reconhecimento de dois biotipos, demonstrando, por ribotipagem, a existência de variantes dentro do biotipo equino.

Uma característica de *C. pseudotuberculosis* é a tendência a crescer formando películas em caldo, o que dificulta a suspensão em meio líquido, devido à formação de grumos macroscópicos pela presença de lipídios em sua superfície. Esta característica pode ser superada pela utilização de detergente como o tween 80 nos meios de cultura. A partir dessa informação foi desenvolvido um meio líquido denominado caldo nutriente tweek 80 (NTB) que foi capaz de permitir a obtenção de células isoladas, melhorando significativamente os trabalhos com infecção experimental (BATEY, 1986a).

Além da multiplicação em caldos nutrientes como o NTB, *C. pseudotuberculosis* cresce muito bem em caldo BHI (“Brain and Heart Infusion”), ágar Millër-Hinton e ágar-sangue, causando alfa hemólise neste último (MUCKLE et al., 1992; COSTA et al., 1998). As colônias em ágar-sangue crescem em 24 a 48 horas e apresentam forma regular e cor branca, havendo uma tendência para que toda a colônia se destaque ao pinçar parte dela com alça de platina (CONNOR et al., 2000).

Independente do biovar, os isolados de *C. pseudotuberculosis* costumam ser sensíveis a penicilinas, macrolídeos, tetraciclina, cefalosporinas, lincomicina, cloranfenicol, rifampicina, vancomicina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, clindamicina, eritromicina, cefazolina, cefalotina, gentamicina, ciprofloxacina, rifampina, trimetoprim/sulfametoxazole e norfloxacina. Entretanto, muitos apresentam resistência aos aminoglicosídeos, polimixinas, ácido nalidíxico e cicloheximidine. O biovar *ovis* apresenta resistência significativamente maior a esses fármacos do que o biovar *equi*, não se observando relação entre a sensibilidade antimicrobiana e a origem geográfica dos isolados. Apesar das evidências *in vitro* da sensibilidade dos isolados, os autores destacam a necessidade de trabalhos específicos para a melhor escolha da droga, assim como da dose correta no tratamento *in vivo* (JUDSON e SONGER, 1991; LITERÁK et al., 1999).

3.2. Epidemiologia

Corynebacterium pseudotuberculosis sobrevive onde há umidade e matéria orgânica em abundância, mas é rapidamente destruído pelo calor a 60°C, por desinfetantes e detergentes (BIBERSTAIN et al., 2003).

Vários hospedeiros, além de ovinos e caprinos, como bubalinos, dromedários, alpacas e eqüinos foram identificadas como susceptíveis ou albergando o agente, tendo-se relatos de casos em bovinos, principalmente em gado leiteiro, onde causa lesões cutâneas, viscerais e quadros de mastite, afetando severamente a produção leiteira tanto na quantidade como na qualidade, além de ser um risco para a saúde pública, visto que o homem também pode se infectar (AFZAL et al., 1996; ALEMAN et al., 1996; YERUHAM et al., 1996; BRAVERMAN et al., 1999; SELIM, 2001; ANDERSON et al., 2004).

Em porcas clinicamente sadias foram isoladas corinebactérias do canal cervical inicialmente classificadas como *C. pseudotuberculosis*. Posteriormente, estas amostras foram classificadas como *Corynebacterium semminus*, sendo filogeneticamente próximas a *C. pseudotuberculosis* (ZHAO et al., 1993).

Anderson et al. (2004) descreveram infecção por *C. pseudotuberculosis* em cinco alpacas (*Lama pacus*), procedentes de criação comercial e que apresentavam lesões abscedantes do tipo caseoso em linfonodos superficiais. Afzal et al. (1996) comprovaram por meio de infecção experimental e inoculação subcutânea na base da orelha que os isolados de *C. pseudotuberculosis* são capazes de causar lesões abscedativas locais, assim como na base do pescoço de camelos.

Em equinos, *C. pseudotuberculosis* é responsável pela linfangite ulcerativa, doença caracterizada pela formação de abscessos tanto no tecido subcutâneo como em órgãos, além de bacteremia e aborto (ALEMAN et al., 1996; VAUGHAN et al., 2004).

Corynebacterium pseudotuberculosis em búfalos causa a doença do edema cutâneo (“oedematous skin disease”), caracterizado por edema difuso com adelgaçamento da pele, normalmente nos membros e ventre com o envolvimento dos linfonodos que drenam a região que se tornam hipertrofiados (SELIM, 2001).

A forma de transmissão parece variar de acordo com a espécie hospedeira e o biovar. Dessa forma, entre grandes ruminantes e eqüinos, além do contato com exudatos dos abscessos, tanto direta como indiretamente, a ação de vetores mecânicos como moscas são extremamente importantes. Para os bovinos e bubalinos, a mosca doméstica (*Musca domestica*) é o principal vetor mecânico, podendo a bactéria

sobreviver por até 10 minutos na probóscide após alimentarem-se com secreções ou excreções contaminadas. Em cavalos, foram identificadas três espécies de moscas como vetores em potencial, *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans*, e *M. domestica* (YERUHAM, 1996; SELIM, 2001; SPIER et al., 2004).

Corynebacterium pseudotuberculosis biovar *equi* ainda não tem seu reservatório esclarecido. O biovar *ovis* pode ser encontrado no trato gastrointestinal de ovinos saudáveis. Nestes pequenos ruminantes, a principal forma de transmissão parece ser o contato direto entre animais susceptíveis que sofreram lesões na pele com animais infectados que estejam liberando a bactéria pelo rompimento de abscessos tanto externos como internos; dessa forma, o hábito de estabular os animais em ambientes fechados, livres dos ventos e da luz ultra-violeta, animais tosquiados ou que foram submetidos a outras intervenções que favoreçam a abertura de soluções de continuidade como descorna, marcação com facas etc, aumentam o risco de transmissão. Além disso, também pode ocorrer a transmissão por aerossol de abscessos pulmonares sobre peles de animais que tenham sofrido lesões com soluções de continuidade (PATON et al., 1996; BIBERSTAIN e HIRSH, 2003).

Outro fator importante na disseminação dessa bactéria são os banhos de imersão, principalmente após tosquia, devido à habilidade do organismo de persistir viável mesmo em águas recicladas (PANTON et al., 1996).

Segundo Alonso et al. (1992), a infecção crônica por *C. pseudotuberculosis* pode resultar em uma transmissão vertical e ocasionar desordens reprodutivas tais como aborto, mortalidade neonatal e redução nas taxas de crescimento de cordeiros infectados, além de causar a persistência da infecção no rebanho.

A LC encontra-se atualmente disseminada em praticamente todos os continentes, tendo sido registrada em países como Turquia, Canadá, Estados Unidos, Austrália, Dinamarca, França, Brasil, Nigéria entre outros (AMEH et al., 1993; ARSENAULT et al., 2003; BATEY, 1986b; ÇETINKAYA et al., 2002; JOHNSON et al., 1993; MØLLER et al., 2000).

Os trabalhos de prevalência com ovinos mostraram uma variação de 36% a 53,7% de infecção por *C. pseudotuberculosis*, podendo variar de acordo com as características epidemiológicas e de manejo de cada região (ARSENAULT et al., 2003; BATEY, 1986b). No Brasil, os trabalhos de ocorrência e prevalência realizados, mostram prevalências entre 30 e 50% no Nordeste, e estimativa de 77% dos rebanhos de caprinos leiteiros acometidos no Rio de Janeiro (COSTA et al., 1973;

LANGENEGGER et al., 1991).

A LC é uma doença de grande impacto econômico, pois tem um caráter insidioso causando diminuição na produção de lã e carne, principalmente em caprinos e ovinos (PANTON et al., 1988). Em um dos trabalhos realizados sobre perdas econômicas, estimou-se em mais de dez milhões de dólares as perdas relacionadas com custos em abatedouros australianos (PANTON et al., 1996).

Pinheiro Junior et al. (2006), em trabalho de inoculação experimental de *C. pseudotuberculosis* na glândula mamária de cabras, tanto por via intradérmica quanto por via intramamária, observaram a capacidade desse agente em causar mastite aguda nessa espécie. Segundo Ameh et al. (1993), apesar de menos freqüente que as infecções causadas por *Staphylococcus* spp, *Escherichia coli* entre outros agentes, *C. pseudotuberculosis* pode ser o agente etiológico de pelo menos 3% dos casos de mastite caprina.

Atualmente, os estudos epidemiológicos têm utilizado técnicas moleculares para classificar isolados de microrganismos, seja pela comparação de fragmentos do seu genoma, seja pela comparação da seqüência nucleotídica de trechos importantes do DNA, permitindo elucidar possíveis relações entre gêneros, espécies, ou mesmo, isolados. Dentre as várias técnicas moleculares, as mais utilizadas no momento são: Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE); Análise por Endonucleases de Restrição (REA); DNA Polimórfico Randomicamente Amplificado (RAPD); Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (RFLP); RFLP em associação à PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), entre outras.

De um modo geral, os estudos epidemiológicos moleculares, permitem o aprofundamento dos estudos sobre disseminação de doenças infecciosas, com abordagens que vão de um só hospedeiro ou habitat a até todo o ecossistema mundial (BELKUM et al., 2001; COSTA, 2002).

Trabalhos utilizando o gene do RNAr (DNAr), foram desenvolvidos para a identificação e classificação de grupos de bactérias, entre elas o grupo das corinebactérias (RIEGEL et al. 1995; VANECHOUTTE, 1995; LITÉRAK, 1999).

Vanechoutte et al. (1995) utilizaram o gene 16S do RNAr para comparar 50 isolados a 26 diferentes espécies do gênero *Corynebacterium*, por análise de restrição do gen DNAr 16S amplificado obtiveram sucesso na diferenciação entre várias espécies entre as quais, duas cepas de *C. pseudotuberculosis* que eram bioquimicamente diferentes e representavam os dois biovares reconhecidos, sendo

estas muito bem diferenciadas pelos padrões da análise de restrição DNAr 16S. Isto pode ser explicado devido à alta variabilidade das seqüências do DNAr 16S dentro do gênero *Corynebacterium* observada pelo grande número de diferentes padrões de restrição que contrasta com, por exemplo, o gênero *Staphylococcus* onde o gene do RNAr 16S é altamente conservado. Entretanto, Riegel et al. (1995) concluíram que as espécies de *C. pseudotuberculosis* e *Corynebacterium ulcerans* não se diferenciavam na filogenia quando comparadas suas seqüências do DNAr.

A diferenciação filogenética entre essas duas espécies foi, no entanto, obtida quando analisou-se seqüências parciais do gene da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*), demonstrando ser esse gene mais acurado para a identificação de espécies de *Corynebacterium* do que a análise baseada no gene do RNAr 16S. Apesar de, em casos ambíguos, os autores recomendarem o uso em conjunto dos dois testes para uma identificação definitiva (KHAMIS et al., 2004; KHAMIS et al., 2005).

3.3. Patogenia

Após a penetração via solução de continuidade, o *C. pseudotuberculosis* infecta as células leucocitárias, alcançam e se localizam nos linfonodos regionais que drenam o local da penetração. Os animais desenvolvem dois picos febris com valores entre 40 e 41°C, sendo o primeiro cerca de 24h após a infecção (PI) e o segundo, um pouco menor, cerca de 3 a 9 dias PI. A ação da principal exotoxina, a fosfolipase D (PLD), provoca a hidrólise da esfingomiéline dos eritrócitos e das membranas endoteliais. Na porta de entrada provoca a formação de abscesso caseo-purulento, podendo atingir órgãos internos como pulmões e linfonodos mediastínicos. Os animais desenvolvem anticorpos contra a exotoxina bacteriana a partir do quinto dia PI alcançando pico no 21º dia PI (PÉPIN et al., 1991; TACHEDJIAN et al., 1995).

A PLD, com cerca de 31,5 kDa, catalisa a dissociação da esfingomiéline, um importante componente da membrana celular, em fosfato ceramida e colina, destruindo assim, a célula. Ela parece ser imprescindível para o estabelecimento da infecção e formação de abscessos, sendo um potente imunógeno. Mutações desta molécula, ou a incapacidade de produzi-la, impedem o desenvolvimento de lesões, e mesmo a instalação e disseminação de *C. pseudotuberculosis* nos tecidos do hospedeiro (MUCKLE et al., 1992; SONGER, 1997; HODGSON et al., 1999).

Sutherland et al. (1989) comparando a atividade da PLD de *C.*

pseudotuberculosis de quatro cepas considerando a letalidade para ratos brancos, atividade hemotífica, capacidade em inibir a hemolisina estafilocócica e atividade antigênica para ELISA, encontrou correlação significativa entre a inibição da hemolisina de *Staphylococcus* sp. e a capacidade de hemólise da exotoxina das quatro cepas; tendo as que apresentaram título hemolítico maior ou igual a 1:256 matado todos os animais. Entretanto, não houve variação no teste de ELISA para as toxinas das quatro amostras. Apesar desta similaridade antigênica da PLD entre as amostras, parece haver distinta atividade biológica entre a exotoxina extraída de biovar nitrato-negativo da extraída de biovar nitrato-positivo, visto que a primeira, quando inoculada em ratos, é capaz de causar morte em 48 horas, enquanto que a PLD extraída de amostras nitrato-positivas, injetada pelas mesmas vias e nas mesmas concentrações, não causou morte.

A ação da PLD facilita a disseminação das bactérias pelas lesões das paredes dos vasos sanguíneos e linfáticos (HODGSON et al., 1992). Entretanto, ficou demonstrado em infecção experimental em cordeiros que desde o início do processo o organismo reage com o objetivo de bloquear a disseminação de *C.*

pseudotuberculosis, enviando para o local de entrada e linfonodos regionais grandes quantidades de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Esta infiltração maciça de PMN coincide com uma granulocitose sanguínea periférica. Os PMNs são substituídos em poucos dias por um grande número de macrófagos, linfócitos e células epitelióides que formam a manta periférica de grandes piogranulomas com uma região central de necrose (PÉPIN et al., 1991).

A resposta celular pode ser observada pela mensuração da produção de interferon- γ . Os pequenos ruminantes apresentam duas possibilidades de resposta celular com produção de interferon- γ : os que produzem altas quantidades dessa citocina e aqueles que produzem baixas quantidades. Normalmente, aqueles que respondem mais fortemente produzindo grandes quantidades de interferon- γ , apresentam uma resposta celular secundária cerca de duas semanas após a resposta primária e desenvolvem lesões abscedantes, enquanto que os que respondem fracamente não apresentam uma resposta celular secundária nem desenvolvem abscessos, existindo aparentemente uma correlação entre produção de interferon- γ e desenvolvimento de abscessos (PAULE et al., 2003). Essa aparente correlação talvez possa ser explicada pelo seqüestro de muitas células T sensibilizadas por *C. pseudotuberculosis*, dentro de órgãos linfóides secundários ou nos sítios de agressão

(BUDDLE et al., 1995).

A resposta imune humoral devida às infecções naturais provavelmente têm pouco impacto sobre a recuperação da infecção e/ou limitação dos sintomas uma vez que a bactéria é intracelular. Para conferir proteção adequada é necessário que resposta mediada por anticorpos em conjunto com a resposta celular estejam presentes (ELLIS et al., 1991).

3.4 Diagnóstico e Controle

O diagnóstico de qualquer enfermidade deve ter como base o conhecimento das características clínicas, associadas à possibilidade de detecção da resposta imune do hospedeiro e, quando possível, do isolamento do agente causal (SONGER et al., 1988). Entretanto, para as doenças que se desenvolvem de forma insidiosa, muitas vezes causando latência ou longos períodos de inatividade aparente, onde o hospedeiro dificilmente consegue livrar-se do agente, a necessidade de um diagnóstico clínico como ponto de partida para solicitação de exames laboratoriais e consequente identificação de animais infectados mostra-se desnecessário. Dessa forma, é importante o desenvolvimento de técnicas laboratoriais que permitam identificar corretamente não apenas aqueles que apresentam sintomas sugestivos, mas também e principalmente, os animais aparentemente saudáveis que servem como fonte de infecção; assim, tentativas de controle e erradicação da LC costumam fracassar pela incapacidade do teste empregado em detectar todos os animais infectados do plantel (DERCKSEN et al., 1996).

Várias técnicas laboratoriais foram desenvolvidas baseadas em variações do ELISA, tendo sido alcançado especificidade de 98% +/- 1% para caprinos e 99% +/- 1% para ovinos, e sensibilidade de 94% +/- 3% para caprinos e 79% +/- 5% para ovinos (DERCKSEN et al., 2000). Além disso, Çetinkaya et al. (2002) desenvolveram PCR específico para *C. pseudotuberculosis* com a finalidade de facilitar o diagnóstico da LC.

Outros testes mais simples e menos onerosos foram desenvolvidos com excelentes resultados como o teste de inibição da hemólise sinérgica e teste alérgico, tendo sido indicados como ferramentas para um efetivo controle da doença, principalmente em animais que ainda não desenvolveram sintomatologia clínica (BROWN, 1986; LANGENEGGER, 1991).

Além dos testes que visam identificar os animais positivos com consequente eliminação destes ou, pelo menos, segregação do plantel, o controle da LC tem sido tentado pelo desenvolvimento e aplicação de vacinas. Tachedjian et al. (1995) trabalharam na produção de *C. pseudotuberculosis* mutantes produtores de PLD inativada com o objetivo de sua aplicação na produção de vacinas mais seguras. Entretanto, Hodgson et al. (1999) não obtiveram resultados satisfatórios na imunização de ovinos com o uso dessa PLD geneticamente inativada, que só foi capaz

de proteger 44% dos animais contra *C. pseudotuberculosis*, resultado bem inferior aos 95% de proteção oferecida pela PLD inativada por formalina.

Da mesma maneira, a utilização de vacina de DNA não conseguiu mais que 45% de proteção contra desafio experimental, com aplicação intramuscular. Em qualquer situação, a não ser com a utilização de adjuvantes, não se recomenda a aplicação da vacina por via subcutânea em ovinos devido ao fato desses animais só possuírem duas ou três camadas de células (10µm de espessura), que limita a expressão dos antígenos nos queratinócitos a três dias; diferentemente da pele humana (40µm) e suína (50µm) que respondem bem aos antígenos aplicados por esta via (De ROSE et al., 2002).

O controle da LC pode, e deve, centrar-se não apenas nos aspectos imunológicos, mas também em condutas de manejo do rebanho. Assim, são recomendadas técnicas como isolamento dos animais doentes, drenagem dos abscessos e extirpação cirúrgica dos linfonodos afetados antes da sua drenagem. Além disso, deve-se queimar e enterrar o material purulento e desinfetar todo o material utilizado (ALVES e PINHEIRO, 2000; NOZAKI et al., 2000).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, M.; SAKIR, M.; HUSSAIN, M. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection and lymphadenitis (taloa or mala) in the camel. **Tropical Animal Health Production.** v.28, n.2, p.158-162. 1996.

ALEMAN, M.; SPIER, S. J.; WILSON, D.; DOHERR, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982-1993). **Journal of American Veterinary Medical Association.** v.209, p.804-809, 1996.

ALONSO, J. L.; SIMON, M. C.; GIRONES, O.; MUZQUIZ, J. L., Ortega C, Garcia J. The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* on reproduction in adult ewes. **Research in Veterinary Science.** v.52, n.3, p.267-272, 1992.

ALVES, F.S.F., PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: recomendações e medidas profiláticas. **Agropecuária Catarinense.** v.13, n.1, p.12-14, 2000.

AMEH, J. A.; ADDO, P. B.; ADEKEYE, J. O.; GYANG, E. O. Prevalence of clinical mastitis and of intramammary infections in Nigerian goats. **Preventive Veterinary Medicine.** v. 17, 41-46, 1993.

ANDERSON, D. E.; RINGS, D. M.; KOWALSKI, J. Infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* in five alpacas. **Journal of American Veterinary Medicine Association.** v.225, n.11, p.1743-1747, 2004.

ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; 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, Canadá. **Preventive Veterinary Medicine.** v. 59, 67-81,

2003.

BATEY, R. G. Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. **Veterinary Microbiology**. v.11, n.1-2, p.145-152, 1986a.

BATEY, R. G. Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at a Western Australian abattoir. **American Journal of Veterinary Research**. v.47, p.482-485, 1986b.

BELKUM van, A.; STRUELENS, M.; VISSER de, A. VERBRUGH, H.; TIBAYRENC, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, n.3, p.547-560, 2001.

BIBERSTEIN, E. L.; KNIGHT, H. D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Record**. v.89, p.691-692, 1971.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Corinebactérias; Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes; Rhodococcus equi. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.gov.br/. Acesso em 15/01/2007.

BRAVERMAN, Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. The role of houseflies (*Musca domestica*) in transmitting the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis* in israeli dairy herds. **Israel Journal of Veterinary Medicine**. v.53, n.1, p.7-15, 1999.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ZOMETTA, C.; ALVES, S. F. Serodiagnosis of

inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. **American Journal of Veterinary Research.** v.47, n.7, p.1461-1463, 1986.

BUDDLE, B. M., De LISLE, G. W.; PFEFFER, A.; ALDWELL, F. E.
Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. **Vaccine.** v.13, p.1123-1130, 1995

ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, ERAY.; KALIN, R.; De BAERE, T.;
VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology.** v.88:75-83, 2002.

CONNOR, K. M.; QUIRIE, M. M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology.** v.38, n.7, p.2633-2637, 2000.

COSTA, M. D. M.; CÂMARA, J. Q.; ROCHA, J. V. N.; MARTINEZ, T. C. N.
Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador.** v.12(1):1-7, 1973.

COSTA, L. R. R.; SPIER, S. J.; HIRSH, D. C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. **Veterinary Microbiology.** v.62, p.135-143, 1998.

COSTA, L. F. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas,** Salvador, v. 1, n. 1, p. 105-115, nov. 2002.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; 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. **Veterinary Microbiology.** v.75, p.167-175, 2000.

DERCKSEN, D. P.; Ter LAAK, E. A.; SCHREUDER, B. E. Eradication programme for caseous lymphadenitis in goats in The Netherlands. **Veterinary Record**. V.138, n.10, p.237, 1996.

De ROSE, R.; TENNENT, J.; McWATERS, P.; CHAPLIN, P. J.; WOOD, P. R.; KIMPTON, W.; CAHILL, R.; SCHEERLINCK, J-P. Y. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.90, p.55-63, 2002.

ELLIS, F. **Peasant Economics: farm Households and Agrarian nd Development**. 2 edition. New York: Cambridge University Press, 1996. 309 p. (Wye Studies in Agricultural and Rural Development).

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.28, n.3-4, p.289-301, 1991.

EMBRAPA. **Ceará terá rede de estudos em carne caprina e ovina**. Disponível em: http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/folder.2006/setembro/foldernoticia.2006-09060_264524423/noticia.2006-09-22.6658002345/mostra_noticia. Acesso em: 05/01/2007.

HODGSON, A. L. M.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L. A.; McCOLL, M.; CAMARON, 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. **Infection and Immunity**. v.60, n.7, p.2900-2905, 1992.

JOHNSON, E. H.; SANTA ROSA, J.; KASS, P. H. Immunizing effects of live *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats. **Small ruminant Research**. v.12, 349-356, 1993a.

JOHNSON, E. H.; VIDAL, C. E. S.; SANTA ROSA, J.; KASS, P. H. Observations on goats experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Small ruminant Research**. v.12, 357-369, 1993b.

JUDSON, R.; SONGER, J. G. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: *in vitro* susceptibility to 39 antimicrobial agents. **Veterinary Microbiology**. v.27, 145-150, 1991.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; La SCOLA, B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.9, p.3925–3931, 2004.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; La SCOLA, B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.4:1934-1936, apr. 2005.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.11, n.1/2, p.31-34, 1991.

LITÉRAK, I.; HORVÁTHOVÁ, A.; JAHNOVÁ, M.; RYCHLÍK, I.; SKALKA, B. Phenotype and genotype characteristics of the Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. **Small Ruminant Research**. v.32, p.107-111, 1999.

MØLLER, K.; AGERHOLM, J. S.; AHRENS, P.; JENSEN, N. E.; NIELSEN, T. K. Abscess disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep. **Journal of Veterinary Medicine B**. v.47, p.55-62, 2000.

MENZIES, P. I.; MUCKLE, C. A. The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.53, p.313-318, 1989.

MUCKLE, C. A.; MENZIES, P. I.; LI, Y.; TAY HWNG, Y.; VAN, WESENBEECK, M. Analysis of immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**. v.30, p.47-58, 1992.

NOZAKI, C. N.; FARIA, M. A. R.; MACHADO, T. M. M. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.22, n.6, p.258-259, 2000.

OLSON, M. E.; CERİ, H.; MORCK, D. W.; BURET, A. G.; READ, R. R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.66, p.86-92, 2002.

PATON, M. W.; MERCY, A. R.; WILKINSON, F. C.; GARDNER, J. J.; SUTHERLAND, S. S.; ELLIS, T. M. The effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep. **Australian Veterinary Journal**. v.65, n.4, p.117-119, 1988.

PANTON, 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. **Australian Veterinary Journal**. v.71, p.47-49, 1994.

PANTON et al. Post-shearing management affects the seroincidence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks. **Preventive Veterinary Medicine**. v.26:275-284, 1996.

PAULE, B. J.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C. R.; VALE, V. L.; 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-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.96, n.3-4, p.129-139, 2003.

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M.; KERR, T. G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clinical Infection Disease**. v.24, p.185-191, 1997.

PÉPIN, M.; FONTAINE, J. J.; PARDON, P.; MARLY, J.; PARODI, A. L. Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Veterinary Microbiology**. v.29, n.2, p.123-134, 1991.

PINHEIRO JUNIOR, J. W., OLIVEIRA, A. A. F., ALVES, F. S. F., SILVA, L. B. G., RABELO, S. S. A., MOTA, R. A. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.73, n.4, p.395-400, 2006.

RIEGEL, P.; RUIMY, R.; de BRIEL, D.; PRÉVOST, G.; JEHL, F.; CHRISTEN, R.; MONTEIL, H. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev., **FEMS Microbiol. Lett.**

v.126, p.271–276, 1995.

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. **American Journal of Veterinary Research**. v.40, n.8, p.1110-1114, 1979.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: criação reacional de caprinos**. 1. ed. São Paulo: Nobel, 1997.

SELIM, S. A. Review. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **Journal of Veterinary Medicine**. B. 48, p.241-258, 2001.

SHPIGEL, N. Y.; ELAD, D.; YERUHAM, I.; WINKLER, M.; SARAN, A. An outbreak of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in an israeli dairy herd. **Veterinary Record**. v.133, p.89-94, 1993.

SIMPLÍCIO, A. A.; WANDER, A. E.; LEITE, E. R.; LOPES, E. A. **A caprino-ovinocultura de corte como alternativa para a geração de emprego e renda**. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/DOC48.pdf>>. Acesso em: 05 de jan. 2007.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**. v.49, p.223-226, 1988.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in Microbiology**. v.5, n.4, p.156-161, 1997.

SPIER, S. J.; LEUTENEGGER, C. M.; CARROL, S. P.; LOYE, J. E.; PUSTERLA, J. B.; CARPENTER, T. E.; MIHALYI, J. E.; MADIGAN, J. E. Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **American Journal of Veterinary Research**. v.65, n.6:829-834, jun. 2004.

SUTHERLAND et al. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. **Australian Veterinary Journal**. v.64, n.9:261-263, 1987.

SUTHERLAND SS, SPEIJERS EJ, ANDRES B. Comparison of the exotoxins of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Research in Veterinary Science**. v.47, n.2, p.190-194, 1989.

TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; MOORE, R. J.; HODGSON, A. L. M. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. **Vaccine**. v.13, n.8, p.1785-1792, 1995.

VANEECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; BRIEL, D.; MONTEIL, H.; VERSCHRAEGEN, G.; De ROUCK, A.; CLAEYS, G. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. **Research in Microbiology**. v.146:633-641, 1995.

VAUGHAN, B.; WHITCOMB, M. B.; PRATT, S. M.; SPIER, S. J. Ultrasonographic Appearance of Abdominal Organs in 14 Horses with Systemic *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection. **In: 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, 2004, Denver, Colorado, (Ed.). Publisher: American Association of Equine Practitioners, Lexington KY. Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 4-Dec-2004; P1413.1204.

WANDER, A. E.; VASCONCELOS, V. R.; ROGÉRIO, M. C. P. Viabilidade econômica do acabamento de cordeiros deslanados em pastagens cultivadas dos capins gramão e tanzânia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 40., 2002, Passo Fundo, RS. **Equidade e eficiência na agricultura brasileira**: anais. Passo Fundo: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2002. 7 f. 1 CD ROM.

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N. Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies I. **The Veterinary Quarterly**. v.18, n.3, p.87-89, 1996.

ZHAO, H. K.; YONEKAWA, K.; TAKAHASHI, T.; KIKUCHI, N.; HIRAMUNE, T.; YANAGAWA, R. Isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from the cervical canal of clinically normal sows. **Research in Veterinary Science**. v.55, n.3, p.356-359, 1993.

EXPERIMENTO I

**COMPARAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis DE CAPRINOS E OVINOS DO
SERTÃO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

Resumo: Objetivou-se com este estudo comparar genotipicamente 35 isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* recuperados de conteúdo de abscessos de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa, procedentes de cinco municípios localizados no Sertão de Pernambuco, Brasil. Utilizou-se a técnica de *fingerprint* RFLP-PCR com as enzimas de restrição *Hpy-Ch4* e *Msp1* aplicada ao gene *rpoB* e as enzimas *Pst I* e *Msp I* para o gene *pld*. Não houve diferença nos padrões de fragmentos de bandas entre os isolados, independente da espécie hospedeira ou da área geográfica estudada, definindo-se um padrão genotípico homogêneo de *C. pseudotuberculosis* responsável por abscessos superficiais na região.

Palavras chave: Genotipagem, RFLP-PCR, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caprinos, ovinos.

**GENOTYPIC COMPARISON BETWEEN *CORYNEBACTERIUM*
PSEUDOTUBERCULOSIS SAMPLES OBTAINED FROM SHEEP
AND GOATS DIAGNOSED WITH CASEOUS LYMPHADENITIS
RAISED ON THE SEMI-ARID REGION OF PERNAMBUCO,
BRASIL.**

ABSTRACT. The objective of the present study was to genotypically compare 35 samples of *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtained from abscesses of sheep and goats diagnosed with caseous lymphadenitis originated from 5 different cities in the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. The RFLP-PCR technique with *Hpy-Ch4* and *Msp I* and *Pst I* *Msp I* restriction enzymes was used to fingerprint the genes *rpoB* and *pld*, respectively. The results demonstrate that there was no difference on the fragments banding pattern among samples, independently of the host species or geographic area studied, defining a homogeneous profile of *C. pseudotuberculosis*

responsible for superficial abscesses for the region.

Keywords: Genotyping, RFLP-PCR, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, goats, sheep.

5.1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa de pequenos ruminantes causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e caracterizada clinicamente por abscessos caseosos que acometem os linfonodos, pele e vísceras (UNANIAN et al., 1985). Encontra-se amplamente distribuída no mundo e já foi relatada em vários Estados do Brasil, onde apresenta prevalência relativamente elevada no Nordeste brasileiro (COSTA et al., 1973; LANGENEGGER et al., 1991). De caráter insidioso e com tendência a cronicidade, é capaz de produzir perdas econômicas significativas para os criadores de pequenos ruminantes (PANTON, 1988).

O gênero *Corynebacterium* está representado por mais de 60 espécies na sua maioria isolada de animais ou humanos (KHAMIS et al., 2005). A bactéria apresenta-se sob a forma de clava, sendo o *Corynebacterium diftericum* o protótipo do grupo. Entretanto, algumas corinebactérias são pleomórficas e formam elementos cocóides durante o seu crescimento (BIRBERSTEIN e HIRSH, 2003).

Corynebacterium pseudotuberculosis é um difteróide típico, apresentando-se sob a forma cocóide a filamentosa, não possuem cápsula e sua parede celular é típica das corinebactérias com elevada concentração de lipídeos, que torna a torna hidrofóbica e pode contribuir para a sua sobrevivência dentro dos fagócitos e para sua leucotoxicidade (BIRBERSTEIN e HIRSH, 2003).

Dentro da espécie *C. pseudotuberculosis*, são reconhecidos dois biovars que foram diferenciados inicialmente pela capacidade ou não em reduzir nitrato a nitrito. O biovar *equi*, nitrato-positivo, que é normalmente isolado de eqüinos e bovinos e biovar *ovis*, nitrato-negativo, isolado, invariavelmente, de caprinos e ovinos, mas também de bovinos (SONGER et al., 1988). Entretanto, já foi demonstrado que o biovar *equi* pode, apesar de pouco freqüente, apresentar-se sob a forma de nitrato-negativo, mantendo, no entanto, sua classificação anterior com base em estudo de ribotipagem (COSTA et al., 1998).

A investigação taxonômica dos procariontes pode ser dividida em dois períodos: no primeiro, os estudos eram centrados nas características fenotípicas e no segundo, o foco passou a ser as características genotípicas. Este último foi pautado na detecção de regiões altamente conservadas do genoma, de áreas que sofreram alguma

variação como inserção, deleção ou mutação de nucleotídeos específicos para uma espécie ou mesmo amostra (TORTOLI, 2003).

A genotipagem baseia-se em técnicas de fácil reprodutibilidade, tendo um forte poder discriminatório. As várias técnicas disponíveis passaram a serem conhecidas como técnicas de “DNA fingerprinting” (DARINE, 1998).

A técnica de RFLP (Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição) é comumente empregada para a diferenciação entre indivíduos de uma mesma espécie, mas de cepas diferentes. Esta técnica pode ser realizada associada à PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), (RFLP-PCR). Nesta, um determinado fragmento gênico é amplificado com primers específicos para o gene e, posteriormente, submetidos a ação de enzimas de restrição que cortam este gene, ou seu segmento, em pontos específicos, produzindo assim fragmentos de DNA (DARINE, 1998; SUTHERLAND, 1993).

O uso de métodos moleculares para análise sequencial do gene RNAr 16S (DNAr) tem facilitado um maior delineamento do gênero, e a disponibilidade em comparar a seqüência deste gene com informações fenotípicas melhoradas tem aumentado significativamente a confiabilidade na identificação das espécies. Estes avanços na taxonomia e métodos de detecção, junto com o interesse nas corinebactérias como agentes oportunistas em infecções em humanos, recentemente resultou no delineamento de um vasto grupo de novas espécies deste gênero (KHAMIS et al., 2005).

A grande maioria das espécies de *Corynebacterium* pode ser diferenciada pelo polimorfismo das bandas de restrição para o gene do RNAr 16S devido à alta variabilidade das seqüências do DNAr 16S interespecies para esse gênero, que pode ser visto por um grande número de padrões de restrição (VANEECHOUTTE et al., 1995).

Entretanto, este padrão de variabilidade interespecies não é verdadeiro para as espécies *C. pseudotuberculosis* e *Corynebacterium ulcerans* que não são diferenciadas entre si na sua filogenia quando comparadas suas seqüências do DNAr (RIEGEL et al., 1995).

Apesar do gene do RNAr 16S ser o marcador molecular mais utilizado para determinar as relações filogenéticas bacterianas, para o gênero *Corynebacterium*, o gene *rpoB* (gene codificador da sub-unidade β da RNA polimerase) parece ser melhor marcador na distinção entre espécies desse gênero (KHAMIS et al., 2004).

Um dos fatores de maior relevância para a patogenia da linfadenite caseosa é a capacidade de *C. pseudotuberculosis* em produzir a exotoxina fosfolipase D (PLD) (NAIRN et al., 1977; HODGSON et al., 1992; MacNAMARA et al., 1994). Esta toxina parece só ser produzida por duas espécies de *Corynebacterium*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, sendo considerado um bom marcador para a identificação dessas duas espécies (BARKSDALE, 1981).

Sutherland et al. (1989) compararam a PLD de quatro cepas de *C. pseudotuberculosis* frente à habilidade em matar ratos brancos, atividade hemolítica, capacidade em inibir a hemolisina estafilocócica e a atividade antigênica para ELISA, encontrando variação na letalidade, mas não na antigenicidade. Esta variabilidade na intensidade da ação patogênica da PLD poderá ser resultado de mutações no gene *pld* (gene codificador da PLD).

Objetivou-se com este estudo analisar o perfil epidemiológico molecular de isolados de *C. pseudotuberculosis*, utilizando a técnica de RFLP-PCR, para os genes *rpoB* e *pld* de forma a contribuir com o conhecimento do comportamento do agente da linfadenite caseosa em rebanhos de caprinos e ovinos criados no sertão pernambucano.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Amostragem

Pernambuco está localizado a 7° e 15' e 9° e 27' de latitude sul, e 34° e 48' e 41° e 19' de longitude oeste de Greenwich. Com área total de 98.526,60 Km², ocupa 6,3% do Nordeste brasileiro e 1,2% do Brasil. O IBGE identificou em pernambucano, em 1989, cinco Mesorregiões e 19 Microrregiões geográficas, a saber: Mesorregião do Sertão Pernambucano com 41 municípios; Mesorregião do São Francisco Pernambucano com 15 municípios, Mesorregião do Agreste Pernambucano com 71 municípios, Mesorregião da Mata Pernambucana com 42 municípios e Mesorregião Metropolitana do Recife com 15 municípios. Cada Mesorregião é dividida em Microrregiões, no total de 19. Assim, a Mesorregião Região do Sertão Pernambucano (região norte do Sertão), divide-se em: Microrregião de Araripina, Microrregião do Salgueiro, Microrregião do Pajeú e Microrregião do Sertão do Moxotó. A Mesorregião do São Francisco Pernambucano (região sul do Sertão), divide-se em: Microrregião de Petrolina e Microrregião de Itaparica (ANDRADE et al., 2003).

Selecionou-se cinco municípios, estando três na Microrregião do Pajeú (Itapetim, São José do Egito e Carnaíba), um na Microrregião do Moxotó (Custódia) e um na Microrregião de Itaparica (Floresta). Por município foram visitadas, pelo menos, 25 propriedades, distribuídas de maneira a representar todo o espaço territorial.

Foram analisadas 35 amostras de conteúdo de abscessos superficiais, 26 de caprinos e 8 de ovinos. As amostras foram distribuídas como segue: Carnaíba (seis de caprinos e duas de ovinos); Itapetim (quatro de caprinos e quatro de ovinos); São José do Egito (11 amostras de caprinos); Floresta (seis de caprinos e duas de ovinos); e Custódia (uma de ovino) Figura 1.

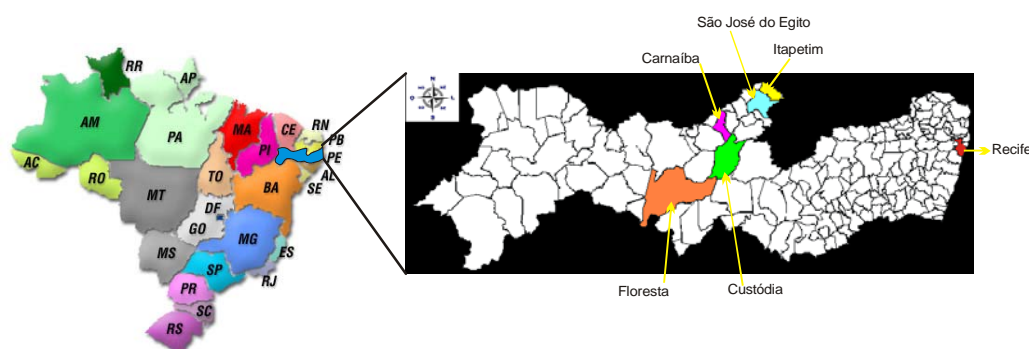


Figura 1. Mapa do Brasil com destaque para o Estado de Pernambuco e localização dos cinco municípios estudados para linfadenite caseosa em ovinos e caprinos na macro-região do Sertão, e a sua capital, Recife. Pernambuco, 2007.

As amostras foram obtidas por punção aspirativa de abscessos fechados com auxílio de seringa descartável e agulha 40x12mm.

O material obtido foi cultivado em ágar base enriquecido com 10% de sangue desfibrinado de ovino, sendo as placas incubadas a 37°C em aerobiose durante 48 horas. Posteriormente, foram selecionadas as colônias que apresentaram características compatíveis com o gênero *Corynebacterium*, ou seja, colônias puntiformes, esbranquiçadas, opacas, secas e α -hemolíticas (CARTER, 1990). Essas colônias foram submetidas à técnica de coloração de Gram, repicadas para o caldo Brain Heart Infusion (BHI) para posterior identificação utilizando o APIcoryne (Bio Merieux-França), confirmando bioquimicamente as amostras como isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* nitrato negativas (biovar *ovis*).

5.2.2 Extração do DNA

No laboratório Biologia Molecular da Área de sanidade animal do Centro Nacional para Pesquisa de Gado de Corte – EMBRAPA Gado de Corte, foi realizada a extração do DNA genômico pelo método modificado de Zhang et al. (1994). Para este procedimento, as amostras foram cultivadas em tubos Falcon de 50ml (com 10ml de caldo LB). Esse material foi centrifugado por 10 minutos a 6.000 x g. O pellet foi ressuspensão uma vez com 1ml de tampão TE 10mM, pH 8,7 (0,19g de EDTA 10mM + 0,07g tris HCl 10mM). A suspensão foi transferida para tubos de 2ml que foram centrifugados por 10 minutos a 9.900 x g. Posteriormente, descartado o sobrenadante, o pellet foi ressuspensão em 800 ul de tampão TE (pH 8,7), contendo 10,3% de glicose e 10 mg/ml de lisozima, sendo então incubada por 12 horas a 37°C. Posteriormente, cada tubo recebeu 100ul de SDS a 10% + 20ul de NaCl a 5M e 13ul de proteinase K a 20%; a solução foi homogeneizada levemente e incubada por 12 horas a 56°C. Em seguida, adicionou-se 0,8ml de fenol e após agitação leve em mesa agitadora por 20 minutos, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 9.900 x g. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo estéril de 2ml e adicionado aproximadamente o mesmo volume de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após agitação leve por 20 minutos, procedeu-se nova centrifugação por mais 10

minutos a 9.900 x g. O sobrenadante foi, mais uma vez, transferido para outro tubo estéril onde se adicionou aproximadamente a mesma quantidade de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Novamente a solução foi submetida à agitação leve por 20 minutos e centrifugada a 9.900 x g. por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo onde adicionou-se 0,6% (do volume total do sobrenadante) de isopropanol para a precipitação do DNA. A suspensão foi homogeneizada levemente e centrifugada novamente a 9.900 x g. por mais 10 minutos. Descartado o sobrenadante, adicionou-se 1ml de álcool a 70% para lavar o DNA e retirar as impurezas. Logo após centrifugou-se por 5 minutos a 9.900 x g; descartado o sobrenadante, deixou-se o pellet secar a temperatura ambiente, sendo ressuspensão em 50ul de água ultra-pura e estocado a -20°C.

5.2.3 Amplificação dos Genes

A partir da seqüência depositada no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), do gene *pld* sob o número de acesso L16587 e de acordo com Khamis et al. (2004) foram desenhados os primers para segmentos dos genes *pld* e *rpoB*, respectivamente. Os primers utilizados para o gene *pld* foram, F 5' ATGAGGGAGAAAGTTGTTTTA 3' e R 5' TCACCACGGGTTATCCGC 3'. Sendo a amplificação realizada em termociclador com o seguinte protocolo: etapa de 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C para a desnaturação, 1 minuto a 58°C para o anelamento, 2 minutos a 72°C para a extensão da cadeia e mais 3 minutos a 72°C para a extensão final, gerando bandas de 924pb. Para o gene *rpoB*, as seqüências de primers utilizadas foram, F 5' CGTATGAACATCGGCCAG 3' e R 5' TCCATTCGCCGAAGCGC 3', com amplificação em termociclador sob o seguinte protocolo: etapa de 3 minutos a 95°C, 34 ciclos de 1 minuto a 95°C para a desnaturação, 45 segundos a 56°C para o anelamento, 1 minuto e 30 segundos a 72°C para a extensão da cadeia e mais 10 minutos a 72°C para a extensão final, gerando bandas de 447pb. As reações de PCR foram realizadas em termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler gradient), com um volume final de 50µL contendo 5µL de tampão de PCR 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 250 µM de cada dNTP, 2,5 U de taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1µL de cada primer e 1µL de DNA molde.

Os produtos da amplificação foram observados por eletroforese a 100V por 1 hora, separados por gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados com transluminador sob luz ultravioleta, utilizando como padrão o

marcador Low mass (Invitrogen®) para quantificar o tamanho dos fragmentos (Figura 2).

Figura 2. a) Perfil de bandas da reação de PCR utilizando primers do gene *pld* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Marcador de pares de bases Low DNA Mass Lader (1), Controle Negativo (2), padrão do gene *pld* (amostras 6; 7; 8 e 10). b) Perfil de bandas da reação de PCR utilizando primers do gene *rpoB* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Marcador de pares de bases Low DNA Mass Lader (1), Controle Negativo (2), padrão do gene *rpoB* (amostras, 67, 68, 69, 70). Eletroforese em gel de agarose a 2%.

5.2.4 Digestão Enzimática

Para testar a melhor concentração enzimática, 500ng do produto de PCR de um isolado foi digerido com 1µL, 1,5µL e 2µL da enzima de restrição *PstI* (Invitrogen®). Após o teste de concentração enzimática, foi utilizado como padrão 20U das endonucleases *PstI* e *MspI* que possuem respectivamente os seguintes sítios de restrição para o gene *pld*: 5'CTGCA/ G 3', e 5' C /CGG 3'.

Para o gene *rpoB* foi utilizado 2µL (20U) das enzimas *HpyCh4* (NewEngland®) e *MspI* (Amersham®). As reações de digestão foram incubadas a 37°C por 6 horas e posteriormente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% a 80V por 3 horas, seguido de coloração em brometo de etídio (5µg/µL) por 20 minutos. O marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®) e um fragmento intacto do gene também foram aplicados aos géis como padrão para estimar o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região Nordeste do Brasil é a que apresenta a maior frequência de casos de linfadenite caseosa, provavelmente em decorrência da grande concentração de ovinos e caprinos, do tipo de vegetação que contém espinhos, facilitando a abertura de soluções de continuidade que servem como porta de entrada para as bactérias e do baixo grau de instrução dos criadores (VESCHI, 2005).

Situado nesta região, o Estado de Pernambuco tem o Sertão como sua maior região natural, ocupando 70% do seu território, com sua economia baseada na pecuária, principalmente bovina, caprina e ovina, sendo as duas últimas de grande importância econômica, principalmente para o pequeno produtor. Os municípios estudados situam-se nas microrregiões do Sertão do Pajeú e Sertão do Moxotó, predominando, em quase toda a área das duas regiões, o clima semi-árido e uma forte concentração de caprinos e ovinos (PERNAMBUCO DE A/Z, 2007).

Somando-se os cinco municípios estudados, foram visitadas aproximadamente 100 propriedades, encontrando-se, em todas elas, animais que apresentavam abscessos superficiais ou animais com lesões de abscessos que haviam rompido naturalmente ou por intervenção do proprietário. Esses resultados indicam a grande circulação do agente e disseminação dos focos da doença no sertão pernambucano.

As culturas do conteúdo dos abscessos obtidos dos caprinos e ovinos estudados resultaram no crescimento de mais de um tipo de microrganismo, demonstrando a provável pluralidade de agentes infecciosos envolvidos nos processos abscedativos dos pequenos ruminantes. Dentre as bactérias, isoladas em associação a *C. pseudotuberculosis*, destacaram-se *Staphylococcus* sp e bactérias Gram-negativas não identificadas. Esses achados estão de acordo com Saïd et al. (2002) que também relataram o isolamento de *Staphylococcus aureus subsp anaerobius*, *Streptococcus* sp. entre outros, de conteúdo de abscessos de ovinos na Tunísia. Quanto ao tempo de isolamento, observou-se crescimento de colônias consideradas características do gênero *Corynebacterium* sp (pequenas colônias esbranquiçadas, mucosas e que, ao serem pinçadas, tendem a se deslocar por completo) em 48 horas de incubação como relatado por Connor et al. (2000). Em poucos casos, observou-se crescimento sem a formação de verdadeiras colônias, mas sim como pequenos agrupamentos puntiformes disseminados no ágar.

No meio de cultura líquido (caldo BHI), observou-se o turvamento deste com a presença de uma membrana, provavelmente em função da grande quantidade de

lipídios da célula bacteriana que é uma característica peculiar desse agente, concordando com as observações feitas por Batey (1986).

Observou-se bactérias Gram-positivas, na sua grande maioria cocóides com a presença de alguns cocobacilos. Apesar de muitos autores relatarem que o grupo *Corynebacteria* se apresenta como bastões, desenhando formas em paliçada ou letras chinesas, Biberstein e Hirsh (2003), afirmaram ser esta espécie pleomórfica, apresentando-se muitas vezes na forma cocóide ou de cocobacilos.

Apenas os isolados identificados com 99 a 100% de certeza pelo teste APIcoryne (BioMerieux-França) como pertencentes à espécie *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* tiveram o seu DNA extraído e sua identidade confirmada por PCR.

A análise de restrição revelou que a enzima *Hpy-Ch4* cortou o gene *rpoB* em dois pontos, gerando bandas de 86, 126 e 235 pares de base (pb) e a *Msp I* realizou o corte em três locais, gerando quatro bandas com 54, 78, 93 e 222 pb (Figura 3).

Figura 3. Perfis de restrição do gene *rpoB* digeridos com *Hpy-CH4* por PCR em gel de poliacrilamida a 15%. Gel (a), marcador Low DNA Mass Ladder (1), PCR não digerida (2), amostras de *C. pseudotuberculosis* (25, 27, 28, 29, 30, 32 e 34). No gel (b), produto de PCR do gene *rpoB* não digerido (1), marcador Low DNA Mass Ladder (2), produtos de PCR digeridos com *Msp I* (amostras 32, 34, 35, 36, 41, 42 e 43).

O gene *pld* foi cortado em três pontos pela *Pst I*, produzindo fragmentos de 52, 108, 369 e 395 pb, enquanto que a *Msp I* gerou bandas de 72, 91, 195 e 566 pb (Figura 4).

Figura 4. Perfis de restrição do gene *pld* (924pb) digeridos com *PstI* por PCR em gel de poliacrilamida a 15%. Gel (a), marcador Low DNA Mass Ladder (1), amostras de *C. pseudotuberculosis* (6, 11, 20, 21, 64 e 35). No gel (b), produto de PCR do gene *pld* não digerido (1), marcador Low DNA Mass Ladder (2), produtos de PCR digeridos com *MspI*, (amostras 44, 45, 48, 50, 55, 60 e 61).

Este trabalho foi o primeiro a comparar por RFLP-PCR o gene *pld* que codifica para o principal fator de virulência, a esfingomielinase, fosfolipase D. Os resultados demonstram que entre os isolados de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* aqui estudados, independente da região de origem ou da espécie hospedeira de onde foram obtidos, não houve variação genotípica para esse gene. Este fato sugere que este fator de virulência contra o qual muitos trabalhos de proteção vacinal têm sido elaborados (ELLIS et al., 1991; TACHEDJIAN et al., 1995; HODGSON et al., 1999),

mantém uma homogeneidade nas suas características genéticas, permitindo assim que a resposta imune desenvolvida contra a PLD possa ser explorada como instrumento de controle da doença também na região estudada.

Vários trabalhos de ribotipagem foram desenvolvidos até o momento buscando comparar padrões genotípicos entre amostras de *C. pseudotuberculosis* utilizando o gene 16S, tendo todos eles encontrado homogeneidade das amostras dentro dos seus respectivos biovares, mesmo entre aquelas com origem em mais de uma região do mundo e causando nos hospedeiros sintomas de intensidade variável (SUTHERLAND et al., 1993; SUTHERLAND et al., 1996; COSTA et al., 1998; LITERÁK et al., 1999).

O gene *rpoB* que codifica a sub-unidade β da RNA polimerase, responsável por toda a transcrição do DNA em RNA, tem sido revelado como um excelente marcador molecular para estudar as variações genotípicas entre espécies, mostrando-se, especificamente para *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um alvo ainda mais valioso do que o estudo comparativo do gene 16 S (KHAMIS et al., 2004).

Também para o gene *rpoB* não foi observado polimorfismo nas bandas de restrição com as enzimas *Hpv-Ch4* e *Msp I* dentre as amostras aqui estudadas. Este resultado reforça a idéia de uma homogeneidade e estabilidade genética dentre a espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis*, biovar *ovis*, nesta região. Como as amostras foram selecionadas frente a características morfológicas e bioquímicas que indicavam com praticamente 100% de certeza tratar-se de *C. pseudotuberculosis*, o reconhecimento de padrão genético de um gene de baixo grau de mutação e imprescindível para a sobrevivência desta espécie, aliado a um comprovado alto poder discriminatório entre espécies, nos permite colocar está técnica como possível ferramenta diagnóstica.

Os resultados indicam que a LC em caprinos e ovinos do Sertão pernambucano é causada por *C. pseudotuberculosis*, biovar *ovis*, que não sofreu mutações detectáveis no seu gene de virulência de maior importância.

O conhecimento mais detalhado desses padrões de fragmentos através de estudos de seqüenciamento poderiam confirmar estes resultados.

5.4 CONCLUSÃO

A comparação dos padrões de banda por RFLP-PCR para os genes *rpoB* e *pld* demonstram que as amostras estudadas não apresentam qualquer variação genotípica frente às três enzimas de restrição. Os padrões homogêneos das bandas geradas para ambos os genes, *pld* e *rpoB*, independente da espécie hospedeira de pequeno ruminante ou da área geográfica estudada, reforça a idéia de um padrão genotípico único do *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

A homogeneidade nos padrões de bandas para os genes *rpoB* e *pld* oferece um meio eficiente de identificação de isolados de *C. pseudotuberculosis* permitindo que estes possam ser utilizados em métodos de diagnóstico.

Entretanto, novos estudos deverão ser conduzidos para que se conheça a seqüência nucleotídica desses fragmentos, proporcionando visão mais acurada da característica genotípica dessas amostras para os genes aqui estudados. A confirmação da condição de homogeneidade para o gene *pld* para *C. pseudotuberculosis* deverá incentivar um aumento no número de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. C. O.; SAMPAIO, F. A. C.; NETO, J. C. X. A.; JATOBÁ, L.; ALBUQUERQUE, M. J. C.; BENJAMIN, R. C.; ANDRADE, T. L. C.; LINS, F. J. C. **C. Atlas Escolar Pernambuco: Espaço Geo-Histórico e Cultural**. 2. ed. Ed. Grafset. João Pessoa. 2003.

BARKSDALE, L.; LINDER, R.; SULEA, I. T.; POLLICE, M. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Coynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.13, n.2, p.335-343, 1981.

BATEY, R. G. Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. **Veterinary Microbiology**. v.11, n.1-2, p.145-152, 1986.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Corinebactérias; *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes*; *Rhodococcus equi*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2003.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**.

<http://www.abrasil.gov.br/avalppa/RelAvalPPA2002/content/av_prog/072/prog072.htm> acessado em: 06/01/07).

BRASIL. **Ministério do Planejamento**.

<http://www.abrasil.gov.br/avalppa/site/content/av_prog/05/15/prog0515.htm>. acessado em: 06/01/2007.

CARTER, G. R.; COLE Jr., J. R. Dagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology. **Academic Press**. 5 ed. pp.620, 1990.

CONNOR, K. M.; QUIRIE, M. M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.7:2633-2637, 2000.

COSTA, M. D. M.; CÂMARA, J. Q.; ROCHA, J. V. N.; MARTINEZ, T. C. N. Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia. Salvador**. v.12(1):1-7, 1973.

COSTA, L. R. R.; SPIER, S. J.; HIRSH, D. C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. **Veterinary Microbiology**. v.62, p.135-143, 1998.

DARINI, A. L. C.; MAGALHÃES, V. D.; CROTT, L. S. P. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. Revisão. **Medicina**. v.30, p.73-80, 1998.

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. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.28, n.3-4, p.303-316, 1991.

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

HODGSON, A. L. M.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L. A.; McCOLL, M.; CAMARON, 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.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; La SCOLA, B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.9, p.3925-2931, 2004.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; La SCOLA, B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.4, p.1934-1936, 2005.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.11, n.1/2, p. 31-34, 1991.

LITERÁK, I.; HORVÁTHOVA, A.; JAHNOVÁ, M.; RYCHLÍK, I.; SKALKA, B. Phenotype and genotype characteristics of Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. **Small Ruminant Research**. v.32, p.107-109, 1999.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P.; McQUADE, C. C.; The control of caseous lymphadenitis in sheep by vaccination. **Procedures of 54th Annual Conference of Australian Veterinary Association**. v.54, p. 159-161, 1977.

McNAMARA, P. J.; BRADLEY, G. A.; SONGER, J. G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology**. v.12, p.921-930, 1994.

PANTON, M. W.; MERCY, A. R.; WILKINSON, F. C.; GARDNER, J. J.; SUTHERLAND, S. S.; ELLIS, T. M. The effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep. **Australian Veterinary Journal**. v.65, n.4, p.117-119, 1988.

PERNAMBUCO DE A/Z. Disponível em: <<http://www.pe->

az.com.br/regioes/regioes.htm>. Acessado em: 05/01/2007.

RIEGEL, P.; RUIMY, R.; de BRIEL, D.; PRÉVOST, G.; JEHL, F.; CHRISTEN, R.; MONTEIL, H. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev., **FEMS Microbiology Letters**. v.126, p. 271–276, 1995.

SAÏD, M. S. B.; MAITIGUE, H. B.; BENZARTI, M.; MESSADI, L.; REJEB, A.; AMARA, A. Contribution a l'étude épidémiologique et clinique de la lymphadénite caseuse chez les ovins. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**. v.79, p.51-57, 2002.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**. v.49, p. 223-226, 1988.

SUTHERLAND, S. S.; HART, R. A.; BULLER, N. B. Ribotype analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**. v.70, n.12, p.454-456, 1993.

SUTHERLAND, S. S.; HART, R. A.; BULLER, N. B. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. **Veterinary Microbiology**. v.49, p.1-9, 1996.

TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; MOORE, R. J.; HODGSON, L. M. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. **Vaccine**. v.13, n.18, p.1785-1792, 1995.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews**. v.16, n.2, p.319-354, 2003.

UNANIAN, M. D.; SILVA, A. E. D. F.; PANT, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid North-East Brasil. **Tropical Animal Health and Production**. v.17, p.57-62, 1985.

VANEECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; de BRIEL, D.; MONTEIL, H.; VERSCHRAEGEN, G.; De ROUCK, A.; CLAEYS, G. Evaluation of the applicability of amplified r-DNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. **Research in Microbiology**. v.146, p.633-641, 1995.

VESCHI, J. L. **Linfadenite caseosa. VIII Encontro de caprinocultores do sul de Minas Gerais e Média Mogiana**. Maio de 2005. Disponível em: <http://www.capritec.com.br/pdf/linfadenite_caseosa.pdf> Acessado em: 15/01/2007.

WILSON, K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel, F. A.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds.), **Current Protocols in Molecular Biology**, Wiley, New York, unit 2.4, p.1-5, 1994.

ZHANG, Y.; PRASZKIER, J.; HODGSON, A.; PITTARD, A. J. Molecular analysis and characterization of a broad-host-range plasmid, pEP2. *Journal of bacteriology*. v.179, n.18, p.5718-5728, 1994.

EXPERIMENTO II

PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE ISOLADOS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* DE CAPRINOS E OVINOS COM LINFADENITE CASEOSA NO SERTÃO DE PERNAMBUCO, BRASIL.

- 1) **RESUMO.** Objetivou-se com este estudo avaliar o perfil de sensibilidade *in vitro* de 31 isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos procedentes de quatro municípios (Carnaíba, Itapetim, Floresta e São José do Egito) do Sertão Pernambucano, Brasil. O conteúdo dos abscessos foi cultivado em ágar-sangue e as colônias isoladas foram identificadas pela técnica de coloração de Gram e pelo kit de identificação bioquímico API-Coryne (Bio-Merieux, França), sendo todas as amostras identificadas como biovar *ovis*. Para a realização dos antibiogramas utilizou-se a técnica de difusão em discos. Observou-se que 96,8% das amostras foram sensíveis ao cloranfenicol e ciprofloxacina; 93,5% a norfloxacina e cefazolina; 90,3% a amoxicilina e tetraciclina; 87,1% a sulfa-trimetoprim; 83,9% a orbifloxacina; 77,4% a ampicilina, lincomicina e penicilina; 32% a gentamicina; 12,9% a novobiocina e 9,7% a neomicina. Observou-se, ainda, que 87,1% das amostras foram resistentes à novobiocina; 80,6% a neomicina; 41,9% a gentamicina; 19,3% a lincomicina; 16,1% a ampicilina, orbifloxacina e penicilina; 12,9% a sulfa-trimetoprim; 6,4% a cefazolina, norfloxacina e amoxicilina e 3,2% a ciprofloxacina, cloranfenicol e tetraciclina. Com exceção de uma amostra, todas as demais apresentaram algum grau de resistência múltipla, sendo 16% delas multirresistentes a aproximadamente 50% dos antimicrobianos testados. Concluiu-se que existe uma variação fenotípica entre as amostras analisadas associada a um ou mais genes de resistência.

Palavras-Chave: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sensibilidade, antimicrobianos.

***Corynebacterium pseudotuberculosis* In vitro ANTIMICROBIAL SENSITIVITY
PROFILE OF SAMPLES ISOLATED FROM SHEEPS AND GOATS
DIAGNOSED WITH CASEOUS LYMPHADENITIS FROM THE SEMIARID
REGIONS OF PERNAMBUCO, BRAZIL**

ABSTRACT. The main goal of the present study was to evaluate the *in vitro* sensitivity profile of 31 samples of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheeps and goats originated from the semi-arid regions of Pernambuco, Brazil. The contents of the abscesses were cultivated in blood agar and the isolated colonies obtained were identified using Gram stain and the API-Coryne biochemical identification kit (Merieux), with every samples being identified as *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*. The antibiograms were performed using the disk diffusion test. The results showed that 96.8% of the samples were sensitive to chloramphenicol and ciprofloxacin; 93.5% were sensitive to norfloxacin and cefazolin; 90.3% to amoxicillin and tetracycline; 87.1% to sulfa-trimethoprim; 83.9% to orbifloxacin; 77.4% to ampicillin, lincomycin and penicillin; 32% to gentamicin; 12.9% to novobiocin and 9.7% to neomycin. It was also noted that 87.1% of the samples were resistant to novobiocin; 80.6% to neomycin; 41.9% to gentamicin; 19.3% to lincomycin; 16.1% to ampicillin, orbifloxacin and penicillin; 12.9% to sulfa-trimethoprim; 6.4% to cefazolin, norfloxacin and amoxicillin, and 3.2% to ciprofloxacin, chloramphenicol and tetracycline. With the exception of one sample, all others showed some degree of multiple resistances, with 16% of them being multi-resistant to approximately 50% of the antimicrobial drugs tested. Based on those results, it is possible to conclude that there is a phenotypic variation among the samples analyzed associated to one or more resistance gene.

Keywords: Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sensitivity, antimicrobials

1) 6.1 INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva capaz de causar doença de caráter crônico e abscedativo, principalmente em caprinos e ovinos. Também pode infectar bovinos, bubalinos, eqüinos e eventualmente o homem (ALEMAN et al., 1996; PEEL et al., 1997; COSTA et al., 1998; SELIM, 2001). Até o

momento são reconhecidos dois biovars: biovar *equi* que é em sua maioria absoluta nitrato positivo e o biovar *ovis*, invariavelmente nitrato negativo (SONGER et al., 1988).

Em caprinos e ovinos *C. pseudotuberculosis* é responsável pela linfadenite caseosa (LC), doença caracterizada pela hipertrofia dos linfonodos e formação de abscessos caseosos nesses órgãos, no tecido subcutâneo e em vísceras como intestino, fígado, pulmões entre outras (MØLLER et al., 2000). Além disso, há a possibilidade de *C. pseudotuberculosis* ocasionar mastite em cabras leiteiras, apesar de raro se comparada àquelas causadas por *Staphylococcus* spp e *Escherichia coli* (AMEH et al., 1993).

Alguns autores sugerem a erradicação dessa enfermidade pela identificação, isolamento e descarte dos animais positivos; entretanto, a implantação dessas medidas encontra dificuldade na identificação dos animais verdadeiramente positivos e negativos (DERCKSEN, 2000). Muitos pesquisadores vêm trabalhando na tentativa de desenvolver vacinas como método de controle da doença, tendo-se alcançado algum sucesso (STANFORD, 1998; ALVES, 1998; HODGSON, 1999).

O uso de antibioticoterapia tem sido questionado principalmente pelas características de multiplicação do agente, assim como alguns aspectos da patogenia como a formação de abscessos caseosos, o que, em ambas situações, dificultaria ou mesmo impediria a ação desses medicamentos (ASHFAQ e CAMPBELL, 1979; OLSON et al., 2002). Entretanto, o potencial zoonótico de *C. pseudotuberculosis* leva à necessidade de se conhecer a ação de antimicrobianos como opção terapêutica para humanos. Além disso, a adoção de antibioticoterapia nos animais com LC, em associação a outras medidas como a excisão cirúrgica dos abscessos pode ajudar a conter a disseminação da infecção no plantel pela diminuição da quantidade de bactérias circulantes e ao mesmo tempo, evitando-se o extravasamento do conteúdo dos abscessos quando estes maturam com conseqüente contaminação do ambiente (PEEL et al., 1997).

Com uma prevalência da LC no Nordeste estimada em 30 a 50% (COSTA et al., 1973), objetivou-se com este estudo avaliar o perfil de sensibilidade de isolados de *C. pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos criados no Sertão de Pernambuco – Brasil, frente a diferentes antimicrobianos.

1) 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Amostragem

Os municípios de Itapetim, Carnaíba e São José do Egito estão localizados da Mesorregião do Sertão Pernambucano (região norte do Sertão), na Microrregião do Pajeú. O município de Floresta localizado na região sul do sertão, é o maior município da Microrregião de Itaparica, que juntamente com a Microrregião de Petrolina formam a Mesorregião do São Francisco Pernambucano. Distantes entre 400 e 500 Km da capital Recife, estes municípios apresentam precipitação pluviométrica anual média entre 400 e 500 mm, possuindo solo arenoso argiloso a pedregoso, e com vegetação do tipo caatinga hiperxerófila (ANDRADE et al., 2003)

Dos quatro municípios trabalhados (Figura 1) foram obtidas 31 amostras de conteúdo de abscessos de caprinos e ovinos identificados pelo exame clínico e anamnese com sintomas sugestivos de linfadenite caseosa. Em cada município, foram visitadas pelo menos 25 propriedades. As amostras foram assim distribuídas: Carnaíba (quatro caprinos e dois ovinos), Itapetim (quatro caprinos e quatro ovinos), São José do Egito (12 caprinos) e Floresta (três caprinos e dois ovinos).

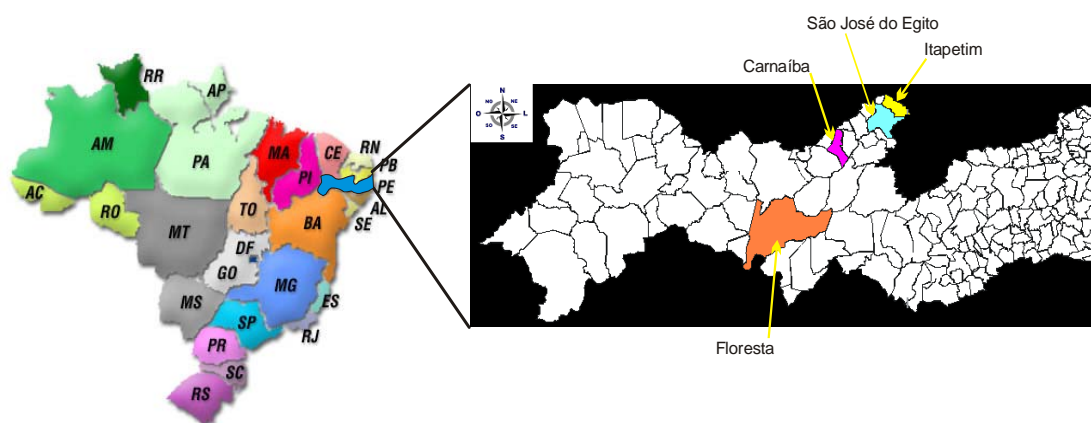


Figura 1. Mapa do Brasil com destaque para o Estado de Pernambuco e localização dos quatro municípios estudados para linfadenite caseosa em ovinos e caprinos na macro-região do Sertão, e a sua capital, Recife. Pernambuco, 2007.

As amostras biológicas foram obtidas por punção aspirativa de abscessos fechados com auxílio de seringa descartável e agulha 40x12mm.

6.2.2 Isolamento e Identificação

O material obtido foi cultivado em ágar base enriquecido com 10% de sangue ovino, sendo as placas incubadas a 37°C em aerobiose durante 48 horas.

Posteriormente, foram selecionadas as colônias que apresentaram-se puntiformes, esbranquiçadas, opacas e α -hemolíticas que caracterizam o gênero *Corynebacterium* (CARTER, 1990). Essas colônias foram submetidas à técnica de coloração de Gram, repicadas para o caldo brain heart infusion (BHI) para posterior identificação bioquímica utilizando o kit APIcoryne (Bio Merieux-França).

6.2.3 Avaliação Antimicrobiana

Para o teste de sensibilidade a antimicrobianos seguiu-se a técnica de difusão em discos (BAUER et al., 1966), utilizando-se o ágar Müller Hinton e discos impregnados com antibióticos, nas seguintes concentrações: gentamicina (10µg), norfloxacin (10µg), lincomicina (2µg), novobiocina (30µg), sulfa-trimetoprim (25µg), orbifloxacin (10µg), neomicina (30µg), ampicilina (10µg), amoxicilina (10µg), tetraciclina (30µg), cefazolina (30µg), ciprofloxacina (5µg), penicilina (10 U.I.) e cloranfenicol (30µg). Os resultados dos antibiogramas foram interpretados como sensível (S), intermediário (I) e resistente (R) de acordo com tabela fornecida pelos fabricantes dos antimicrobianos.

1) 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas mais de 100 propriedades visitadas dentro dos cinco municípios estudados, os animais eram criados em comunidades de baixa renda, onde cada família tinha aproximadamente 10 animais que compartilhavam os pastos. Todas as propriedades visitadas apresentavam animais com abscessos fechados ou já abscedados nos linfonodos ou no tecido subcutâneo, fazendo suspeitar de linfadenite caseosa. Pelas informações coletadas junto aos proprietários, pelo exame clínico e anamnese dos animais, observou-se que a doença era endêmica na região, com aparecimento de casos durante todo o ano.

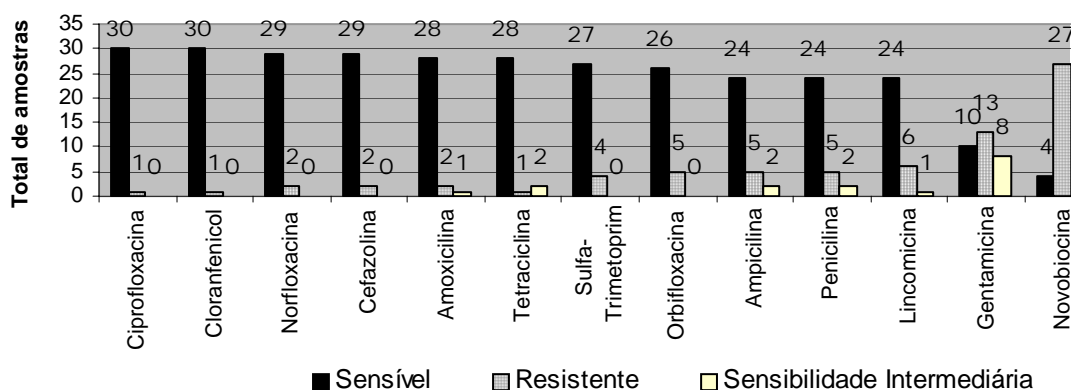
As 31 amostras analisadas foram identificadas pelo teste APIcoryne como pertencentes à espécie *C. pseudotuberculosis* nitrato-negativas, pertencentes,

portanto, ao biovar *ovis*. Destas, 96,8% foram sensíveis ao cloranfenicol e ciprofloxacina; 93,5% sensíveis a norfloxacina e cefazolina; 90,3% a tetraciclina e amoxicilina; 87,1% a sulfa-trimetoprim; 83,9% a orbifloxacina; 77,4% a penicilina; lincomicina e ampicilina. Para os antibióticos gentamicina, novobiocina e neomicina observou-se eficácia contra 32,2%, 12,9% e 9,7% das amostras, respectivamente.

Enquadradas no perfil de sensibilidade intermediária encontraram-se 25,8% das amostras testadas para gentamicina; 9,7% para neomicina; 6,4% para ampicilina, tetraciclina e penicilina e 3,2% para amoxicilina e lincomicina.

Em relação ao perfil de resistência, 87,1% das amostras apresentaram resistência a novobiocina; 80,6% a neomicina; 41,9% a gentamicina; 19,3% a lincomicina; 16,1% a ampicilina, orbifloxacina e penicilina; 12,9% a sulfa-trimetoprim; 6,4% a cefazolina, norfloxacina e amoxicilina; e 3,2% a ciprofloxacina, cloranfenicol e tetraciclina.

Os resultados de sensibilidade e resistência dos 31 isolados de *C. pseudotuberculosis* aos 14 antimicrobianos, expressos em números absolutos são apresentados na figura 2.



Dos 14 antibióticos testados, seis apresentaram eficácia acima de 90% sobre as amostras testadas, sendo consideradas como de ótima ação e três foram eficientes para menos de 70% das amostras testadas, sendo considerados de baixa ação (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentuais de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a 14 antimicrobianos.

Antimicrobiano	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Ciprofloxacina	30/31	96,80
Cloranfenicol	30/31	96,80
Norfloxacina	29/31	93,50
Cefazolina	29/31	93,50
Amoxicilina	28/31	90,30
Tetraciclina	28/31	90,30
Sulfa-Trimetoprim	27/31	87,10

Orbifloxacina	26/31	83,90
Ampicilina	24/31	77,40
Penicilina	24/31	77,40
Lincomicina	24/31	77,40
Gentamicina	10/31	32,20
Novobiocina	4/31	12,90
Neomicina	3/31	9,70

Verificou-se que, para todos os 14 antibióticos testados, houve, pelo menos, um isolado resistente. O que discorda de Literák et al. (1999) que testaram 10 isolados de *C. pseudotuberculosis* frente a 15 antimicrobianos e não encontraram nenhuma resistente, sendo seis destes antimicrobianos utilizados neste estudo (ampicilina, penicilina, ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina e trimetoprim/sulfametoxazole). Este fato demonstra a grande variabilidade na sensibilidade a antimicrobianos desse agente.

Judson e Songer (1991), encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo, relatando variações nos padrões de sensibilidade e resistência dos isolados frente aos diferentes grupos de antibióticos utilizados.

Sobre a multirresistência, observou-se variação desde nenhuma resistência (isolado 25), a resistência a oito diferentes drogas (isolado 28). Estes resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Multirresistência de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a antimicrobianos.

Amostras	Nº de antibióticos resistentes
25	0
6 10 e 62	1
8 22 29 36 48 50 55 64 69 e 70	2
27 30 34 35 43 44 e 45	3
32 42 47 e 61	4
21	5
11 e 24	6
20 e 41	7
28	8

Os resultados de sensibilidade acima de 90% das amostras para norfloxacina, assim como os resultados de sensibilidade abaixo de 70% para neomicina e gentamicina, estão em acordo com os obtidos por Shpigel et al. (1993) que, trabalhando com um surto de linfadenite caseosa em gado leiteiro, encontraram sensibilidade das amostras para norfloxacina de 93,5%, e para neomicina e gentamicina de 9,7% e 13,3%, respectivamente; discordando, entretanto, em relação

aos demais antibióticos testados.

A alta resistência desses isolados de *C. pseudotuberculosis* nitrato negativas aos aminoglicosídeos (neomicina e gentamicina), está dentro das expectativas dos resultados visto não serem esses antimicrobianos considerados eficientes frente a Gram-positivos de uma forma geral; além disso, os trabalhos de Judson e Songer, (1991), avaliam essa situação quando comparam a resposta a essa classe de antimicrobianos do biovar *equi* (nitrato positivo) e *ovis* (nitrato negativo), demonstrando uma resistência significativamente maior para os últimos. De acordo com Bryan et al. (1980), isto esteja relacionado com a capacidade de reduzir nitrato a nitrito e, conseqüentemente, à capacidade da célula em transportar através de sua membrana aminoglicosídeos e outras moléculas semelhantes.

Os 14 antimicrobianos utilizados neste estudo representam dez classes: as cefalosporinas de 1ª geração (cefazolina); o cloranfenicol que forma uma classe à parte; as quinolonas (norfloxacina e ciprofloxacina); as fluorquinolonas (orbifloxacina); as tetraciclina (tetraciclina); penicilinas (penicilina); aminopenicilinas (amoxicilina e ampicilina); as sulfonamidas e diaminopirimidina (sulfadiazina + trimetoprim) e a novobiocina (isolada do *Streptomyces spheroides*), todos possuindo reconhecida maior ou menor atividade sobre bactérias Gram-positivas. Também foram estudados representantes das classes dos aminoglicosídeos ou aminosídeos (gentamicina e neomicina) e lincosamidas (lincomicina) que são reconhecidamente de pouca ação sobre bactérias Gram-positivas.

Deve-se ressaltar que em toda região estudada, as práticas de manejo são semelhantes, principalmente no que diz respeito à utilização de antibioticoterapia contra as diversas afecções normalmente correntes nessas criações, estando restrita essa prática a utilização de um pequeno grupo de fármacos facilmente encontrados no mercado e de custo mais acessível como associações de penicilina + diidroestreptomicina, terramicinas e sulfas. Dessa forma, a variabilidade na sensibilidade das amostras tanto às moléculas normalmente não utilizadas a campo como às freqüentemente utilizadas, pressupõe a existência de variabilidade genética entre essas amostras relacionada à resistência.

Em relação à utilização dessas drogas nos animais com a doença deve-se considerar que apesar de existirem neste estudo antimicrobianos de cinco classes distintas considerados como de excelente ação *in vitro* contra *C. pseudotuberculosis*, a escolha e utilização de um fármaco não se baseia única e exclusivamente na sua

ação em testes laboratoriais, pois vários fatores podem interferir nos resultados obtidos no tratamento (PUYT, 1992).

As características patogênicas de *C. pseudotuberculosis* como o parasitismo intracelular facultativo e, principalmente, as lesões abscedantes produzidas por esta bactéria dificultam ou impedem a ação eficaz do antimicrobiano. Ainda, *C. pseudotuberculosis* faz parte de um grupo de bactérias produtoras de biofilme, uma forma de crescimento onde as colônias estão envolvidas em uma matriz extracelular de carboidrato ou exopolissacarídeo o que lhes confere proteção contra agressões tanto do ambiente externo como do hospedeiro, sendo bastante eficiente na proteção contra vários antibióticos (OLSON et al., 2002). Essas características provavelmente tornam as drogas lipofílicas mais efetivas do que as demais, além de exigir um tempo de tratamento prolongado (PRESCOTT e BAGGOT, 1988).

Ainda de acordo com Puyt (1992), nenhuma antibioticoterapia tem a pretensão de erradicar em 100% a população bacteriana patógena, mas sim, reduzir sua população de forma a permitir que a resposta imune do hospedeiro encontre condições para eliminar o agente. Assim, é importante considerar a idade, o estado nutricional, as condições sanitárias, e, principalmente, a concentração e o tempo de tratamento no prognóstico da antibioticoterapia.

A utilização de antibioticoterapia na LC pode ser vista como elemento importante no controle da doença em casos individuais, principalmente em animais de alto valor zootécnico. Entretanto, este elemento deverá estar associado ao controle cirúrgico e imunoprolifático para reduzir as perdas econômicas nos rebanhos com alta prevalência da doença, como discutido anteriormente por Peel et al. (1997).

A possibilidade de *C. pseudotuberculosis* acometer seres humanos gera a necessidade de conhecer a ação dos diferentes antimicrobianos que possam ser selecionados para esses casos. Além disso, a produção de meios de cultura seletivos para *C. pseudotuberculosis* também pode ser beneficiada a partir do conhecimento do grau de resistência desse agente aos antimicrobianos.

1) 6.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que existe variação no perfil de sensibilidade e resistência de *C. pseudotuberculosis* a antimicrobianos independente da espécie e município, o que comprova uma variação fenotípica entre os isolados estudados e pode estar relacionada a algum gene ou grupo de genes de resistência. O estudo desses genes é um passo importante na ampliação do conhecimento desse agente o que poderá subsidiar o desenvolvimento de novas e mais eficazes medidas de controle da LC.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMAN, M.; SPIER, S. J.; WILSON, D.; DOHERR, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: 538 cases (1982-1993). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.209, p. 804-809, 1996.

ALVES, F. S. F; OLANDER, H. J. Uso de uma vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 20, n.2, 1998.

AMEH, J. A.; ADDO, P. B.; ADEKEYE, J. O.; GYANG, E. O. Prevalence of clinical mastitis and of intramammary infections in Nigerian goats. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 17, 41-46, 1993.

ANDRADE, M. C. O.; SAMPAIO, F. A. C.; NETO, J. C. X. A.; JATOBÁ, L.; ALBUQUERQUE, M. J. C.; BENJAMIN, R. C.; ANDRADE, T. L. C.; LINS, F. J. C. **C. Atlas Escolar Pernambuco: Espaço Geo-Histórico e Cultural**. 2. ed. Ed. Grafset. João Pessoa. 2003.

ASHFAQ, M. K.; CAMPBELL, S. G. A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**. v.74, n.8, p.1161-1165, 1979.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v.45, p.493-496, 1966.

BRYAN, L. E.; NICAS, T.; HOLLOWAY, B. W.; CROWTHER, C.

Aminoglycoside-resistant mutation of *Pseudomonas aeruginosa* defective in cytochrome c552 and nitrate reductase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.17, p.71-79, 1980.

CARTER, G.R. **Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology**. 5^a ed. California, Academic Press Inc., 1990, 620p.

COSTA, M. D. M.; CÂMARA, J. Q.; ROCHA, J. V. N.; MARTINEZ, T. C. N. Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador**. v.12, n.1, p.1-7, 1973.

COSTA, L. R. R.; SPIER, S. J.; HIRSH, D. C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. **Veterinary Microbiology**. v.62, p.135-143, 1998.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; 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. **Veterinary Microbiology**. v.75, p.167-175, 2000.

HODGSON, A. L. M.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L. A.; McCOLL, M.; CAMARON, 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.

JUDSON, R.; SONGER, J. G. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: *in vitro*

susceptibility to 39 antimicrobial agents. **Veterinary Microbiology**. v.27, 145-150, 1991.

LITÉRAK, I.; HORVÁTHOVÁ, A.; JAHNOVÁ, M.; RYCHLÍK, I.; SKALKA, B. Phenotype and genotype characteristics of the Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. **Small Ruminant Research**. v.32, p.107-111, 1999.

MØLLER, K.; AGERHOLM, J. S.; AHRENS, P.; JENSEN, N. E.; NIELSEN, T. K. Abscess disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep. **Journal of Veterinary Medicine B**. v.47, p.55-62, 2000.

OLSON, M. E.; CERI, H.; MORCK, D. W.; BURET, A. G.; READ, R. R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.66, p.86-92, 2002.

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M.; KERR, T. G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clinical Infection Disease**. v.24, p.185-191, 1997.

PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. Blackwell Scientific Publications. Boston, 367 pp. 1988.

PUYT, J. D. – **Antibiothérapie**. – **Encyclopedie Vétérinaire**, Paris, 1992, Pharmacologie – toxicology 0100, 12p.

SELIM, S. A. Review. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **Journal of**

Veterinary Medicine. B. 48, p.241-258, 2001.

SHPIGEL, N. Y.; ELAD, D.; YERUHAM, I.; WINKLER, M.; SARAN, A. An outbreak of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in an israeli dairy herd. **The Veterinary Record.** v.133, p.89-94, 1993.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research.** v.49, n.2, p.223-226, 1988.

STANFORD, K.; BROGDEN, L. A.; McCLELLAND, L. A.; KOZUB, G. C.; AUDIBERT, F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. **Canadian Journal of Veterinary Research.** v.62, p.38-43, 1998.