

**TAMYRES IZARELLY BARBOSA DA SILVA**

**Avaliação da reação em cadeia da polimerase em tempo real na detecção do  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos**

**RECIFE, 2013**



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

TAMYRES IZARELLY BARBOSA DA SILVA

Avaliação da reação em cadeia da polimerase em tempo real na detecção do  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

RECIFE, 2013

### Ficha Catalográfica

S586a Silva, Tamyres Izarely Barbosa da  
Avaliação da reação em cadeia da polimerase na detecção do  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos / Tamyres  
Izarely Barbosa da Silva. -- Recife, 2013.  
83 f. : il.

Orientador (a): Lúcio Esmeraldo Honório de Melo.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento  
de Medicina Veterinária, Recife, 2013.  
Referências.

1. Linfadenite caseosa 2. Cabras 3. Diagnóstico
- I. Melo, Lúcio Esmeraldo Honório de, Orientador  
II. Título

CDD 636.39

“Dedico esta dissertação de mestrado  
aos meus pais, Maria e Severino.”

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as conquistas, aprendizados e pessoas boas que cruzaram meu caminho.

À minha família, em especial aos meus pais, Maria e Severino, pelo carinho, educação, apoio, incentivo e por acreditarem no meu sonho de seguir a carreira acadêmica. Ao meu irmão e minha cunhada, Heweson e Flávia, pelos vários momentos de alegria e por me abrigarem quando necessitei.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo, pelas oportunidades oferecidas, soluções aos meus problemas acadêmicos, palavras de sabedoria, amizade e solidariedade, não apenas comigo, mas com todo o nosso grupo de pesquisa.

Aos meus amigos e companheiros inseparáveis de pesquisa, Daniel, Renatinha, Tuca e Luiz Carlos. Obrigada por tudo, amizade, respeito, pelo auxílio nas viagens e no laboratório, e desculpem os meus momentos de estresse acadêmico. Agradeço também aos antigos bolsistas de graduação e pós-graduação que passaram pelo Laboratório Clínico de Grandes Animais e, de alguma forma, deixaram sua contribuição ao grupo.

Ao mestrando Luiz Cosme e aos docentes Leonildo Galiza, Rinaldo Mota e Roberto Soares pelo apoio técnico e por conceder a utilização da infra-estrutura necessária à realização dos ensaios laboratoriais.

Aos meus amigos eternos Broinha, Ínsula, Lili, Mymy, Carol Giusti, Paulete, Roberinho e Tiago Menezes, que mesmo após o término da graduação, continuam tão presentes em minha vida e trazendo tantas alegrias. Que nossa amizade nunca tenha fim! Ao meu professor e amigo João Alexandre, pelos momentos felizes, ensinamentos e pelo apoio emocional durante o mestrado.

À Universidade e a todos os professores por me oferecerem um ensino de qualidade e me transformarem em uma profissional responsável e compromissada com a pesquisa científica. Em especial, aos professores Edvaldo Lopes, Francisco Feliciano, Leonildo Galiza, Néria Santos, Rinaldo Mota e Rita de Cássia. Aos funcionários da UFRPE pelo respeito e prontidão em auxiliar os alunos.

À FACEPE, CNPq, MAPA e EMBRAPA por fomentar importantes projetos, dos quais eu participei durante a graduação e pós-graduação e por me proporcionar oportunidades de estágio.

Finalmente, a todos os caprinos e respectivos criadores que fizeram parte do meu projeto de mestrado, os quais merecem todo nosso respeito e gratidão pelos ensinamentos através deles obtidos.

## RESUMO

A linfadenite caseosa (LC), doença infecciosa caracterizada pela formação de lesões abscedantes, sobretudo, em linfonodos, se destaca como de grande relevância econômica por ser umas das principais causas de condenação de carcaças de pequenos ruminantes e ocasionar intensa depreciação do couro destes animais. Objetivou-se avaliar reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real na detecção do *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. Foram avaliados 643 caprinos, dos quais 25 animais com lesões abscedantes superficiais foram submetidos à colheita de conteúdo de abscesso, para a identificação do *C. pseudotuberculosis* por meio do isolamento bacteriológico e da PCR em tempo real. Adicionalmente, amostras de sangue, leite e fezes também foram processadas pela PCR tempo real, para estimar a eliminação do agente por estes espécimes. Das 25 amostras de conteúdo de abscesso submetidas ao isolamento bacteriológico e à PCR, 72% (18/25) e 36% (9/25), respectivamente, resultaram positivas para o *C. pseudotuberculosis*, havendo correlação positiva entre os testes. A bactéria ainda foi detectada nas frequências de 8% (2/25), 4% (1/25) e 0% (0/25) no leite, sangue e fezes, respectivamente. A PCR em tempo real, quando aplicada diretamente em amostras de conteúdo de abscesso, não apresentou confiabilidade considerável para o diagnóstico da LC em caprinos, apesar dos resultados preliminares da técnica na caracterização da eliminação do agente pelas vias láctea e hematogena.

**Palavras-chave:** linfadenite caseosa, cabras, diagnóstico.

## ABSTRACT

The caseous lymphadenitis (CL), infectious disease characterized by the formation of lesions abscedantes, especially in lymph nodes, stands out as a great economic importance because it is one of the main causes of condemnation of carcasses of small ruminants and cause severe depreciation of leather these animals. This study aimed to evaluate the polymerase chain reaction (PCR) in real time for detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats. 643 goats were evaluated, of which 25 animals with lesions abscedantes surface underwent harvest of abscess contents, for the identification of *C. pseudotuberculosis* through bacterial isolation and real time PCR. Additionally, blood, milk and feces were also processed by real time PCR for estimating the elimination of the agent in these specimens. Of the 25 samples content abscess subjected to bacterial isolation and PCR, 72% (18/25) and 36% (9/25), respectively, were positive for *C. pseudotuberculosis*, there is a positive correlation between the tests. The bacterium also was detected at frequencies of 8% (2/25) 4% (1/25) and 0% (0/25) in milk, blood or feces, respectively. The real-time PCR, when applied directly to samples of abscess contents, showed no considerable reliability in the diagnosis of CL in goats, despite the results of the preliminary characterization technique in drug elimination by hematogenous and lactea routes.

**Key-words:** lymphadenitis caseous, goats, diagnosis.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	infusão de cérebro e coração ( <i>brain heart infusion</i> )
CD	grupo de diferenciação ( <i>cluster of diferenciacion</i> )
DNA	ácido desoxirribonucléico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético ( <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
LC	linfadenite caseosa
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>polimerase chain reaction</i> )
RAPD	amplificação aleatória de DNA polimórfico ( <i>random amplification of polymorphic DNA</i> )
RFLP	polimorfismos dos fragmentos de restrição ( <i>restriction fragment length polymorphisms</i> )
RNA	ácido ribonucléico ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT-PCR	reação em cadeia da transcriptase reversa ( <i>reverse transcriptase chain reaction</i> )

## LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Gene alvo, sequência de primers e comprimento do fragmento amplificado para o <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	70
Quadro 2. Distribuição corpórea dos abscessos em caprinos criados no Estado de Pernambuco	70
Quadro 3. Resultado do isolamento bacteriológico e da identificação molecular do <i>C. pseudotuberculosis</i> em diferentes espécimes provenientes de caprinos criados no Estado de Pernambuco	71
Quadro 4. Inibidores da reação de PCR	71

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras do Artigo Científico

	Pág.
Figura 1. Isolamento bacteriológico do <i>C. pseudotuberculosis</i> em meio ágar sangue ovino a 5%.	72
Figura 2. Caprino com abscesso em região parotídea.	72
Figura 3. Caprino com cicatriz secundária à linfadenite caseosa.	73
Figura 4. Caprino jovem com abscesso em região peitoral.	73
Figura 5. Caprino com abscesso em linfonodo submandibular.	74
Figura 6. Resultado da PCR em tempo real para o gene PLD ( <i>C. pseudotuberculosis</i> ), demonstrando a amplificação do controle positivo e das amostras de conteúdo de abscesso e leite de caprino.	74
Figura 7. Resultado da PCR em tempo real para o gene PLD ( <i>C. pseudotuberculosis</i> ), demonstrando a amplificação do controle positivo e da amostra de sangue de caprino.	75
Figura 8. Abscesso em glândula mamária de caprino.	75

## Figuras do Anexo

	Pág.
Figura 1. Rebanho de caprinos leiteiros acometidos pela linfadenite caseosa no Estado de Pernambuco.	77
Figura 2. Palpação de linfonodos superficiais em caprino.	77
Figura 3. Colheita de sangue de caprino.	78
Figura 4. Colheita de leite de caprino.	78
Figura 5. Colheita de fezes de caprino.	79
Figura 6. Punção aspirativa por agulha fina de abscessos em caprinos.	79
Figura 7. Sequência de extração de DNA de espécimes de caprinos: Maceração da amostra (A), adição das soluções (B), incubação em banho-maria (C) e eluição do material genético (D).	80
Figura 8. Preparação do mix para as reações (A) e aparelho termociclador para realização da PCR em tempo real (B).	80
Figura 9. Articulação de caprino acometido pela linfadenite caseosa.	81
Figura 10. Conteúdo do abscesso de caprino acometido pela linfadenite caseosa.	81
Figura 11. Colônias cultivadas em ágar sangue ovino a 5%, características de <i>C. pseudotuberculosis</i> .	82
Figura 12. Cocobacilos Gram positivos, característicos de <i>C. pseudotuberculosis</i> , observados por microscopia óptica. Aumento de 100X.	82

## SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO	13
1. OBJETIVOS	15
1.1 Geral	15
1.2 Específicos	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Linfadenite caseosa	16
2.2 Isolamento bacteriológico e caracterização bioquímica do <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	26
2.3 Reação em cadeia da polimerase e sua aplicação na medicina veterinária	28
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
4. ARTIGO CIENTÍFICO: Avaliação da reação em cadeia da polimerase em tempo real na detecção do <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em caprinos	50
5. ANEXO	76

## INTRODUÇÃO

A caprinovinocultura, anteriormente voltada apenas à subsistência, como alternativa nutricional às populações de baixa renda, tem se tornado uma atividade em ascensão e de grande representação sócio-econômica no Brasil, sobretudo na região Nordeste, que detém a maior parcela do efetivo nacional. O crescimento deste setor pecuário vem sendo acompanhado pelo elevado número de pesquisas voltadas à potencialização da produção animal, bem como o beneficiamento de seus produtos, em particular a carne, o leite e o couro.

A cadeia produtiva do couro, por exemplo, é um forte alavancador da economia nacional, sendo a indústria brasileira um dos maiores exportadores mundiais, apresentando tradicionalmente excelentes indicadores de competitividade. Desde a década de 90, anualmente o país arrecada cerca de US\$ 2,5 bilhões nas exportações de couro, estando a região Nordeste contribuindo com 11% de participação. De acordo com o Ministério do Trabalho, em 2005 a cadeia couro-calçadista já somava 1,46% do valor bruto da produção industrial nacional.

Sabe-se que os índices de produtividade de um rebanho estão diretamente relacionados aos diferentes sistemas de criação, principalmente no que se refere ao controle sanitário das propriedades. Neste contexto, a linfadenite caseosa se destaca como uma doença infecciosa de grande relevância econômica, visto que representa umas das principais causas de condenação parcial ou total de carcaças de pequenos ruminantes, além de ocasionar intensa depreciação da lã e do couro, atribuindo, portanto, restrições à comercialização, ao manufaturamento e à exportação dos produtos cárneos e do couro e seus derivados.

Adicionalmente, o déficit na produção leiteira, bem como a predisposição a problemas reprodutivos, infecções intercorrentes e eventuais óbitos são outros aspectos desfavoráveis acarretados pela introdução da linfadenite caseosa nos rebanhos.

Sua prevalência possui importância mundial, principalmente em locais com tradição na criação de ovinos e caprinos, como Nova Zelândia, Espanha, França, Austrália, Suíça e Holanda, mas é considerada alta em vários outros países, visto o grande número de notificações. Contudo, epidemiologistas indicam que, em alguns

países, esta prevalência ainda pode ser subestimada, provavelmente devido a não exigência de sua notificação e ao baixo nível de conhecimento, por parte dos produtores, sobre sua impactação econômica.

No Brasil, as elevadas prevalências nos estados estão sendo caracterizadas como um problema enzoótico, especialmente no Nordeste, que vem apresentando taxas variando entre 24 e 50% de caprinos infectados, com destaque para Pernambuco.

Embora existam vários testes para a detecção da doença, o diagnóstico definitivo, denominado também de padrão-ouro, ainda é estabelecido pelo isolamento bacteriológico, associado às provas bioquímicas, porém esta técnica está limitada à identificação de animais com apresentação clínica da enfermidade.

Um aspecto importante a ressaltar é a deficiência na investigação de animais assintomáticos para definir a real prevalência da linfadenite caseosa nos rebanhos e promover a sua erradicação, demonstrando a necessidade da aplicação de testes diagnósticos capazes de identificar estes portadores inaparentes, os quais representam uma fonte de transmissão em potencial para os outros animais.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 Geral**

Avaliar a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real na detecção do *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos.

### **1.2 Específicos**

- Identificar a frequência de caprinos leiteiros, criados no estado de Pernambuco, com evidências clínicas da linfadenite caseosa;
- Identificar o *C. pseudotuberculosis* em material biológico proveniente de abscessos, por meio de cultivo bacteriológico e da PCR em tempo real;
- Determinar a sensibilidade, especificidade e acurácia da técnica da PCR em tempo real, considerando o cultivo bacteriológico como teste padrão-ouro;
- Estimar a frequência de eliminação do *C. pseudotuberculosis* pelas vias hematogena, digestiva e láctea em caprinos infectados.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Linfadenite caseosa

A linfadenite caseosa (LC), denominada popularmente como “mal do carço”, é uma enfermidade bacteriana infecto-contagiosa, de curso crônico, que acomete várias espécies de mamíferos, com maior significado clínico e econômico em pequenos ruminantes (DORELLA et al., 2006; WINDSOR, 2011).

O agente etiológico foi isolado pioneiramente no Reino Unido, em 1888, pelo bacteriologista francês Edmond Nocard, recebendo o nome de bacilo de *Preisz-Nocard* (SMITH, 2003). Em 1896, os pesquisadores alemães Lehmann e Neumann modificaram a nomenclatura para *Bacillus pseudotuberculosis*, devido à semelhança clínica com as lesões caseosas da tuberculose (FONTAINE & BAIRD, 2008). Contudo, posteriormente foi inserido no gênero *Corynebacterium*, atribuindo à denominação de *Corynebacterium ovis*, e, em 1948, foi reclassificado como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mantido até os dias atuais (EUZEBY, 2005; BELCHIOR et al., 2006; MCKEAN, DAVIES & MOORE, 2007).

O *Corynebacterium* pertence à família *Actinomycetaceae*, a qual também agrupa os gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* e *Arcanobacterium*, em função das similaridades sorológicas e químicas entre os microorganismos (CLARRIDGE & SPIEGEL, 1995; BAIRD, 2003; BAIRD, SYNGE & DERCKSEN, 2004).

Existem dois biovars do *C. pseudotuberculosis*, o biotipo *equi* e o biotipo *ovis*, no qual apenas este último está associado a infecções em pequenos ruminantes (COSTA, 2002; BELCHIOR et al., 2006).

Estas bactérias são caracterizadas como cocobacilos intracelulares e anaeróbicos facultativos, pleomórficos, não formadores de esporos, *Gram* positivos, que apresentam arranjo microscópico em forma de “paliçada” ou “letra chinesa” (QUINN, CARTER & MARKEY, 1994; DORELLA et al., 2006). Quanto às características bioquímicas, são catalase e urease positivos, geralmente redutores de nitrato, fermentares de carboidratos, com exceção da lactose, com produção de ácido e sem formação de gás, e não apresentam atividade proteolítica (HOLT et al., 1994; COSTA, 2002).

Um importante fator na propagação da bactéria e disseminação da doença, além do contato direto entre animais enfermos e sadios, consiste na ruptura dos abscessos e conseqüente eliminação de elevada quantidade de microorganismos viáveis no ambiente (cercas, apriscos, instrumentos de trabalho, aparelhos de tosquia), na água e nos alimentos (WALKER, 1996; WINDSOR & EPPLESTON, 2006). Quando se trata de ovinos, admite-se que, em função do manejo sanitário de certas propriedades, os banhos de imersão correspondem ao principal meio de transmissão (COSTA, 2002; RADOSTITS et al., 2007).

A associação com a grande rotatividade de animais (PATON, 2000), a alta densidade populacional nos criatórios (PUGH, 2004), o confinamento (WINTER, 1997), as condições precárias de higiene (SMITH & SHERMAN, 1994) e, em especial, a manutenção de animais infectados também favorece a perpetuação do agente nos rebanhos (BAIRD & FONTAINE, 2007; WINDSOR et al., 2011).

Nestas condições, o *C. pseudotuberculosis* penetra no organismo por meio de soluções de continuidade da pele ou mesmo no tecido ileso (WINDSOR & EPPLESTON, 2006), e pela via oro-nasal através dos aerossóis suspensos no ambiente (CORRÊA & CORRÊA, 1992; ZARRAGA, SCARAMELLI & VALEIRON, 2006).

A via hematogena, por meio da reutilização de agulhas em diferentes animais, procedimentos cirúrgicos, como castrações, ou ação mecânica de insetos hematófagos, por exemplo, também está evidente no processo de transmissão, infecção e eliminação do agente etiológico (SMITH, 2003; WINDSOR & EPPLESTON, 2006; RIET-CORREA, 2007).

Quanto ao sistema reprodutivo, recente estudo demonstra que a viabilidade do sêmen não é prejudicada em animais infectados, com exceção dos que apresentam grandes abscessos na túnica adjacente ao cordão espermático, devido ao aumento de temperatura decorrente do processo inflamatório, podendo reduzir assim a qualidade dos espermatozoides. Contudo, a transmissão da bactéria seria improvável por esta via (GOULETSOU & FTHENAKIS, 2010).

No Brasil, o isolamento do *C. pseudotuberculosis* no sêmen de animais de produção não havia sido relatado, até sua descrição em um carneiro oriundo do

Rio Grande do Sul, citado por Camargo et al. (2010), salientando a importância de maiores pesquisas quanto à transmissão seminal da LC.

Não existe predisposição sexual, porém a faixa etária parece ser um aspecto importante, na qual os animais mais velhos, sobretudo após dois anos de idade, são mais acometidos (GASPAROTO, 1996; MEYER et al., 2002).

Sua patogenicidade está relacionada a dois principais fatores de virulência, a fosfolipase D, uma exotoxina dermonecrótica e hemolítica, e o ácido micólico, um lipídeo de parede celular (EUZEBY & GUÉRIN-FAUBLÉE, 2000; COSTA, 2002).

Após a penetração no organismo, as bactérias são englobadas por neutrófilos e macrófagos (PATON et al., 2003; BAIRD & FONTAINE, 2007). A fosfolipase D, por meio da hidrólise de ligações de fosfato, desestabiliza a membrana celular de vasos sanguíneos e, em conjunto com mediadores pró-inflamatórios, aumenta a permeabilidade vascular, o que permite o extravasamento de plasma e a condução das bactérias, através dos fagócitos, até os linfonodos regionais, pela via linfática (PEPIN, BISRAMÉ & MARLY, 1989; GHANNOUM, 2000; FONTAINE et al., 2006; SANCHES, 2008).

Concomitantemente, estes microorganismos iniciam sua multiplicação nos fagolisossomos, devido ao ácido micólico, que impede a hidrólise enzimática dos lisossomos dos fagócitos (WILLIAMSON, 2001; MEYER et al., 2005). Em seguida há a ruptura destas células, por ação da fosfolipase D, levando à necrose, inflamação local e liberação de novas bactérias (BAIRD & FONTAINE, 2007).

Alguns autores apontam outro fator de virulência denominado de protease corinebacteriana de 40 quilodáltons, uma proteína imunogênica responsável por uma alta proteção ao agente contra a resposta mediada por células (WALKER et al., 1994; WILSON et al., 1995; ARRUDA, 2006).

A resposta imunológica do hospedeiro é conter o processo através da formação de uma cápsula colagenosa ao redor da lesão necrótica, formando, então, um microabscesso na camada cortical do linfonodo durante as primeiras 24 horas (JUBB, KENNEDY & PALMER, 1985; JONES, HUNT & KING, 2000; FONTAINE et al., 2006). A lesão inicia sua expansão progressivamente e em aproximadamente seis dias apresenta um aumento de tamanho significativo (BAIRD & FONTAINE, 2007).

Há a formação de diversas camadas em função dos vários ciclos de necrose e encapsulamento e da deposição de íons de cálcio em arranjo concêntrico, caracterizando a calcificação distrófica secundária ao processo crônico e dando à lesão o aspecto de “cebola” (JONES, HUNT & KING, 2000; MCKEAN, DAVIES & MOORE, 2007). O processo resultará na degeneração do linfonodo, cuja resolução nesta fase torna-se improvável (BAIRD & FONTAINE, 2007).

No interior do abscesso são encontrados neutrófilos, macrófagos, células gigantes de Langhans, linfócitos B e T (CD4+ e CD8+), bactérias, debris celulares e alta proporção de eosinófilos, responsável pela coloração esverdeada ao conteúdo purulento, o qual inicialmente é flutuante, caseoso, tornando-se gradualmente sólido (COLLETT et al., 1994; COSTA, 2002).

A apresentação destas lesões abscedantes pode ocorrer sob duas formas clínicas, a superficial e a visceral, cujas lesões surgem em linfonodos superficiais ou internos, respectivamente (ZARRAGA, SCARAMELLI & VALEIRON, 2006). Os principais gânglios afetados são os linfonodos submandibulares, parotídeos, pré-escapulares, pré-femorais, supra-mamários, poplíteos, mediastínicos e mesentéricos (MENZIES et al., 1991; SMITH, 2003; PUGH, 2004; BELCHIOR et al., 2006; RADOSTITS et al., 2007).

Além dos nódulos linfáticos, o *C. pseudotuberculosis*, dependendo de certas condições, tais como virulência da linhagem, carga bacteriana infectante e higidez do animal (BELCHIOR et al., 2006), pode acometer articulações, pulmões, baço, fígado, rins, encéfalo e outros órgãos (FONTAINE & BAIRD, 2008). Por isso, está frequentemente associado a casos de broncopneumonia crônica, pleurite, mastite, pielonefrite, quadros neurológicos, abscessos subcutâneos ou viscerais (ALVES, SANTIAGO & PINHEIRO, 2007; MCKEAN, DAVIES & MOORE, 2007; RADOSTITIS et al., 2007; RIET-CORREA, 2007), muitas vezes observados em necropsia (JONES, HUNT & KING, 2000).

Neste sentido, as perdas econômicas geradas incluem perda de peso crônica, problemas reprodutivos, déficit na produção leiteira, infecções em órgãos vitais e eventuais óbitos por disseminação sistêmica do organismo (SMITH, 2003; RADOSTITS et al., 2007). Ainda representa umas das principais causas de condenação parcial ou total das carcaças de pequenos ruminantes, sendo um

entreve à comercialização e exportação da carne (BROWN et al. 1987; COLLETT et al., 1994; COSTA, 2002; SMITH, 2003; VALE et al., 2003; FONTAINE & BAIRD, 2008).

A enfermidade também se destaca por ocasionar intensa depreciação da lã e do couro dos animais, item bastante utilizado na confecção de diversos produtos, impondo restrições à cadeia produtiva destes (MELO & LEITE, 2003), quer no processo de manufaturamento ou na exportação (EGGLETON et al., 1991; BRASIL, 2001; BRASIL, 2002; BRASIL, 2008b).

O caráter zoonótico da LC é relatado por alguns autores, especialmente em humanos imunossuprimidos (HOUSE et al., 1986; BELCHIOR et al., 2006; JOIN-LAMBERT et al., 2006) e em populações de risco, composta por indivíduos consumidores do leite de cabra ou ovelha (WATSON & PREECE, 2001; ABREU et al., 2008) ou que mantem o contato direto com animais infectados e suas secreções, como criadores, tratadores, ordenhadores, funcionários de abatedouros e ainda médicos veterinários, zootecnistas e técnicos agrícolas (RIBEIRO et al., 2001; RADOSTITS et al., 2007). As manifestações clínicas no homem são semelhantes às observadas nos animais (MILLS, MITCHELL & LIM, 1997; PEEL et al., 1997).

A identificação da LC nos rebanhos é realizada tradicionalmente com base nos dados de anamnese e histórico, no exame clínico dos animais, com ênfase no sistema linfático, presença de cicatrizes sugestivas e nos achados de necropsia (PUGH, 2004; ANDERSON, RINGS e PUGH, 2005; BELCHIOR et al., 2006; MELO et al., 2010).

A análise das características macroscópicas do exsudato dos abscessos também é indicada por ser bastante sugestivo à enfermidade (SMITH e SHERMAN, 1994). Todavia, o cultivo bacteriológico, associado às provas bioquímicas, é que estabelece o diagnóstico definitivo (CARTER, 1990; MALONE, 2005; BAIRD & FONTAINE, 2007).

O exame citopatológico, por meio da punção aspirativa por agulha fina, é um método simples, rápido, de baixo custo, mas apenas presuntivo, assim como o exame histopatológico (JONES, HUNT & KING, 2000; RIBEIRO et al., 2001; QUINN et al., 2005).

Quando se trata da investigação da imunidade mediada por células, principal mecanismo imunológico desencadeado pela doença (AYERS, 1977; TIZARD, 2009), a quantificação de interferon gama sanguíneo (MEYER et al., 2005; SUNIL et al., 2008) e testes alérgicos também são algumas das ferramentas diagnósticas utilizadas (LANGENEGGER & LANGENEGGER, 1991; ALVES & OLANDER, 1999), mas com resultados não muito promissores.

Testes sorológicos vêm sendo desenvolvidos há décadas no sentido de detectar resposta humoral, sobretudo, para exotoxina fosfolipase D (DERCKSEN et al., 2000). Alguns exemplos são imunofluorescência indireta (BELCHIOR et al., 2006), inibição sinérgica da hemólise (BAIRD & FONTAINE, 2007), microaglutinação (CAMERON et al., 1972), hemaglutinação indireta (LANGENEGGER & LANGENEGGER, 1991), imunodifusão dupla (BURRELL, 1980), fixação do complemento e ensaio imunoenzimático (KABA, KUTSCHKE & GERLACH, 2001), sendo este último o mais utilizado e estudado, por demonstrar maior sensibilidade e especificidade (CARMINATTI et al., 2003; SEYFFERT et al., 2010).

No entanto, determinados fatores, como títulos de anticorpos circulantes reduzidos durante o período de latência do patógeno e reações cruzadas com outros microorganismos, devem ser considerados por interferir na eficiência destes testes (DEKERSEN et al., 2000; SEYFFERT et al., 2010).

Em contra partida, a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) aplicada ao diagnóstico da LC, além do curto tempo de execução, vem apresentando elevada sensibilidade e especificidade, podendo ser uma alternativa às limitações impostas pela sorologia (CETINKAYA et al., 2002). Atualmente, este teste molecular é considerado referência no diagnóstico da LC no Centro Francês de Corynebacterioses do Instituto Pauster (PACHECO et al., 2007).

Quanto ao diagnóstico diferencial, quer clínico ou laboratorial, devem ser incluídos neoplasias, abscessos pós-vacinais, infecções por *Arcanobacterium pyogenes*, *Actinobacillus*, *Arcanobacterium* e *Staphylococcus*, paratuberculose (RENSHAW, GRAFF & GATES, 1979) e, principalmente, a tuberculose caprina (MELO et al., 2005; MELO et al., 2008; MELO et al., 2010), enfermidade inserida no

mesmo plano de investigação clínico-epidemiológica que a LC (SALDANHA et al., 2005).

A prevalência da LC possui relevância mundial (BINNS, BAILEY & GREEN, 2002; BAIRD & FONTAINE, 2007; MOTTA, CREMASCO & RIBEIRO, 2010), principalmente em locais com tradição na criação de ovinos e caprinos, como Nova Zelândia, Espanha, França, Austrália, Suíça e Holanda (BELCHIOR et al., 2006), mas é considerada alta em vários outros países, tendo em vista o grande número de notificações (YERUHAM et al., 1996; AL-RAWASHDEH & QUDAH-AL, 2000; CONNOR et al., 2000; MOLLER et al., 2000; BEN SAID et al., 2002; BINNS et al., 2002; CUBERO PABLO et al., 2002; ARSENAULT et al., 2003; PATON et al., 2003; PATON et al., 2005; FONTAINE et al., 2006).

Outros estudos demonstram que, em alguns países, esta prevalência ainda pode ser subestimada, visto a não exigência de sua notificação compulsória e a falta de conhecimento, por parte dos produtores, sobre a impactação econômica da doença nos rebanhos (STOOPS et al., 1984; PATON et al., 1988; STANFORD et al., 1998; MOLLER et al., 2000; ÇETINKAYA et al., 2002; BAIRD & FONTAINE, 2007).

No Brasil, o forte potencial da caprinovinocultura impulsiona o país a um aumento considerável na produção pecuária, tendendo a um crescimento continuado (BRASIL, 2007; BRASIL, 2008a), porém as elevadas prevalências da LC em vários estados (BENTO & ZONI, 1986; NOZAKI, FARIA & MACHADO, 2000; CUBERO PABLO et al., 2002; COSTA, 2002; MOTTA, CREMASCO & RIBEIRO, 2010) estão sendo caracterizadas como um problema enzoótico, sobretudo na região nordeste, que concentra um grande efetivo destes pequenos ruminantes (MOURA COSTA, 1973; LIMA, 1980; UNANIAN, SILVA & PANT, 1985; BROWN et al. 1987; RIBEIRO et al., 1988; ALVES & PINHEIRO, 1997; RIET-CORRÊA et al., 2007; MELO et al., 2010; ANDRADE et al., 2012).

Estudos realizados nesta região, com destaque para o Estado de Pernambuco, descreveram a ocorrência de 24 a 50% de caprinos infectados (RIET-CORRÊA et al., 2007; ABREU et al., 2008; SÁ, 2012). Pesquisadores atribuem estas elevadas taxas aos ferimentos cutâneos ocasionados pela abrasão de espinhos de plantas cactáceas, características da região, predispondo à infecção nos animais, notavelmente em caprinos (COSTA, 2002; RIET-CORRÊA et al., 2007).

Outro aspecto importante a ressaltar seria de que a investigação de animais assintomáticos é insuficiente para definir a real prevalência nos rebanhos e promover a sua erradicação (PATON et al., 1988; STANFORD et al., 1998; ÇETINKAYA et al., 2002; BAIRD & FONTAINE, 2007). Em um inquérito soropidemiológico realizado no Estado de Minas Gerais (SEYFFERT et al., 2010), por exemplo, 78,9% dos caprinos apresentaram soropositividade à detecção de anticorpos anti - *C. pseudotuberculosis*, resultado expressivamente superior aos 17,5% apenas de animais com sintomas clínicos característicos da doença, demonstrando a necessidade da aplicação de testes diagnósticos capazes de identificar portadores inaparentes (BELCHIOR et al., 2006), que representam uma fonte de transmissão para os outros animais (ELLIS et al. , 1987).

Embora, o *C. pseudotuberculosis* tenha sensibilidade *in vitro* mediante determinados antimicrobianos, tais como oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, sulfonamidas, penicilina e rifampicina (JUDSON & SONGER, 1991; QUINN et al., 1994; COSTA, 2002; SENTURK & TEMIZEL, 2006), o tratamento *in vivo*, além do elevado custo, é ineficaz (JOHNSON et al., 1993; VALLI & PARRY, 2007). O fato pode estar relacionado à propriedade intracelular que o microorganismo confere e à dificuldade em atingir níveis terapêuticos nos locais de infecção, provavelmente em decorrência da formação da cápsula que reveste as lesões granulomatosas (ALEMAN & SPIER, 2001; CASTILHOS et al., 2002; RADOSTITS et al., 2007).

A terapia homeopática tem sido citada na literatura, mas ainda é bastante incipiente (CASTILHOS, PINTO & ALMEIDA, 2002).

Ainda como conduta terapêutica, embora tradicionalmente seja indicada a drenagem dos abscessos e cauterização química ou a extirpação cirúrgica (VALE et al., 2003; BAIRD, 2006; WINDSOR, 2011), a eficácia deste procedimento restrito à lesão é questionável por se tratar a LC de uma doença sistêmica, inclusive com a possibilidade do comprometimento de linfonodos internos, levando a uma situação de alta periculosidade à integridade sanitária dos rebanhos, em função da consequente manutenção de animais infectados e disseminadores em potencial da doença (NOZAKI, FARIA & MACHADO, 2000).

Diversos tipos de vacinas vem sendo desenvolvidas e disponibilizadas no mercado no intuito de prevenir e reduzir a frequência de casos da doença. Existem



as vacinas ativas, atenuadas (MOURA-COSTA et al., 2008), de DNA, bacterinas, toxóides e recombinantes (CAMERON, 1972; FONTAINE et al., 2006). Contudo, a maioria dos protocolos vacinais propostos apresentou resultados desapontadores. O insucesso é apontado, principalmente, devido à falha na estimulação de células T auxiliares do tipo 1 (EGGLETON et al., 1991), na produção de interferon gama ou de imunoglobulinas G anti - *C. pseudotuberculosis* (HODGSON et al., 1994), bem como à característica intracelular do microorganismo (BLADEN et al., 1969; BARAKAT et al., 1974).

Apesar disso, alguns países conseguiram controlar a doença, divulgando resultados estatisticamente significantes (MENZIES et al., 1991). Mas, no caso de áreas endêmicas, a vacinação isoladamente não permite este controle (BELCHIOR et al., 2006).

Assim, medidas higiênico-sanitárias e de biossegurança são preconizadas para o controle da LC nos rebanhos. Recomenda-se identificar precocemente animais acometidos, seja por meio de exame físico (inspeção e palpação de rotina na região correspondente aos linfonodos superficiais) ou pelos testes diagnósticos, devendo-se separar os animais infectados dos sadios e oportunamente proceder com o descarte destes (BINNS, BAILEY & GREEN, 2002; BAIRD & FONTAINE, 2007).

Com relação ao controle ambiental, sabe-se que, devido à composição da parede celular do *C. pseudotuberculosis*, o mesmo pode sobreviver por semanas, meses ou um pouco mais de um ano no ambiente (BINNS, BAILEY & GREEN, 2002; BAIRD & FONTAINE, 2007; RADOSTITS et al., 2007; WINDSOR et al., 2011), mesmo sob situações adversas de exposição solar e dessecação (YOZWIAK & SONGER, 1993; WINTER, 1997; COSTA, 2002).

Apesar de que a maioria dos desinfetantes, a exemplo do hipoclorito de sódio, formol e solução de cresol, seja eficaz na destruição das bactérias (LEÓN-VISCAÍNO et al., 2002), estas também resistem em soluções desinfetantes por 24 horas ou mais e, na presença de material fecal, é exigido um maior tempo de permanência dos produtos (ISMAIL & HAMID, 1972; NAIRN & ROBERTSON, 1974; COLLETT et al., 1994).

Então, as instalações em geral, os instrumentos de trabalho, equipamentos de tosquia, material cirúrgico, comedouros e bebedouros devem ser rotineiramente limpos e desinfetados corretamente, respeitando as propriedades de cada desinfetante (WILLIAMSON, 2001; SMITH, 2003; WINDSOR, 2011).

## 2.2 Isolamento bacteriológico e caracterização bioquímica do *Corynebacterium pseudotuberculosis*

O isolamento bacteriológico e a caracterização bioquímica do *Corynebacterium pseudotuberculosis* representam o teste confirmatório para diagnóstico da LC, também denominado de padrão-ouro (RIBEIRO et al., 2001; WILLIAMSON, 2001; LEÓN-VISCAÍNO et al., 2002). As bactérias são cultivadas em meios enriquecidos com ágar-sangue ovino ou caprino a 5% desfibrinado, a uma temperatura de 37°C, por 24 a 72 horas de incubação, em condições aeróbias ou anaeróbias (MERCHANT & PACKER, 1967; BUXTON & FRASIER, 1977; CORRÊA & CORRÊA, 1992; PUGH, 2004).

Devido à presença dos ácidos micólicos na porção externa da parede celular, compostos por cadeia longa ramificada 2-3-hidroxi-ácidos graxos, as bactérias, quando cultivadas em meio líquido, possuem tendência a formar flocos (CARNE et al., 1956; JOLLY, 1966).

As bactérias também podem ser semeadas em caldo de infusão cérebro-coração (Brain Heart Infusion - BHI) e o acréscimo de tripton, lactalbumina ou extrato de leveduras potencializa sua multiplicação (BATEY, 1986; COSTA, 2002), assim como a solução de Tween aumenta a atividade hemolítica (QUINN et al., 1994).

As colônias bacterianas crescidas apresentam diâmetro de cerca de 1 a 3 mm, cor esbranquiçada, ressecada e beta-hemolítica, devido ao efeito citolítico da fosfolipase D, podendo se movimentar sobre a superfície do meio de cultura (BIBERSTEIN et al., 1971; QUINN et al., 1994; CORRÊA & CORRÊA, 1992; SMITH, 2003; PUGH, 2004; BAIRD, 2006).

Para a identificação microscópica das bactérias são empregadas as colorações de *Gram*, *Giemsa* ou panóptico (QUINN et al., 1994; BAIRD & FONTAINE, 2007), que revelam cocobacilos de arranjo semelhante a letras chinesas (CETINKAYA et al., 2002; ZARRAGA, SCARAMELLI & VALEIRON, 2006).

A caracterização bioquímica é realizada mediante métodos tradicionais ou kits comerciais, sendo composta pelas provas de produção de catalase e urease, redução de nitrato em nitrito e fermentação de carboidratos, excetuando a lactose,

com produção de ácido e sem produção de gás (MUCKLE & GYLES, 1982; SONGER et al., 1988).

### **2.3 Reação em cadeia da polimerase e sua aplicação na medicina veterinária**

A partir dos estudos pioneiros de Watson e Crick sobre o ácido desoxirribonucléico (DNA), em meados da década de 50, surgiu, no campo da engenharia genética, a biologia molecular, que vem se mostrando, até hoje, como uma das áreas de maior potencial para se investir em pesquisas na medicina (PINHO, 2006), sendo, também, uma ferramenta diagnóstica inovadora, aplicada à saúde animal (ÇENTIKAIA et al., 2002; CARMINATI, 2005; PACHECO et al., 2007). A biologia molecular tem como propósito elucidar a inter-relação entre a estrutura e o funcionamento das moléculas biológicas, bem como o entendimento sobre os processos bioquímicos que as mesmas estão envolvidas (BRASIL, 2000; TURNER et al., 2004).

O avanço tecnológico nas ciências biológicas, sobretudo o domínio sobre a manipulação e análise dos ácidos nucleicos, bem como seus produtos gênicos, ao longo dos anos, possibilitou a descoberta de genes de microorganismos causadores de enfermidades e, conseqüentemente, uma melhor compreensão sobre o mecanismo das doenças (COMES *et al.*, 1996).

Na medicina veterinária, quando a investigação de doenças infecciosas requer auxílio laboratorial, rotineiramente são empregadas técnicas tradicionais e, às vezes, um tanto quanto limitadas, sob o ponto de vista temporal, da resposta individual do microorganismo e/ou do hospedeiro (MIELLE FILHO & REMUALDO, 2007). O impacto destas diversas afecções, no âmbito econômico e, até mesmo, da saúde pública, estabelece um ambiente propício ao desenvolvimento de métodos diagnósticos mais rápidos e acurados, dentre eles, os ensaios biomoleculares, que apresentam elevada sensibilidade e especificidade (GATTÁS *et al.*, 2002).

Há poucos anos, surgiram novas técnicas moleculares com capacidade de identificar determinada sequência do genoma de qualquer organismo, mesmo que a amostra possua um pequeno volume. O mérito se deve à possibilidade da reprodução *in vitro* da replicação das fitas de DNA ou RNA, através da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), formando diversas cópias de um fragmento gênico específico, contendo poucos ou milhares pares de base (pb) (KRITSKI *et al.*, 1997; TURNER et al., 2004).

Desde a sua invenção por cientistas da *Cetus Corporation*, em 1983, a PCR tornou-se um recurso tecnológico que modernizou a área da investigação e do diagnóstico médico. A habilidade em produzir rapidamente grandes quantidades de material genético desencadeou avanços científicos significativos em todas as áreas de ciência genômica (TURNER et al., 2004; ROCHE, 2008).

Apesar disso, embora bastante eficiente, ainda existem alguns entraves relacionados à técnica, definidos pelo seu elevado custo, relativa complexidade e falta de padronização das técnicas de acordo com as amostras utilizadas, levando a certa variabilidade na sensibilidade e especificidade, o que restringe em parte o seu uso (MARTIRE, 2009).

A PCR explora a função natural de uma enzima denominada de *Taq* polimerase, que é uma DNA polimerase termoestável, a qual foi isolada de bactérias da espécie *Thermus aquaticus* provenientes de fontes hidrotermais, e possui o poder de amplificação de fragmentos de DNA. A função desta enzima é semelhante à da DNA polimerase III, ou seja, sintetizar DNA a partir de seus precursores, no sentido 5' → 3' (EOM et al., 1996).

Para se utilizar da PCR, é preciso conhecer previamente a sequência de genes a que se deseja amplificar e, assim, produzir uma sequência de oligonucleotídeos iniciadores, também chamados de *primers*, para dar início às reações. A amplificação do material é realizada até que se obtenha uma solução com elevada quantidade de DNA, a ponto de ser detectável facilmente por métodos simples e tradicionais de identificação de moléculas (MULLIS, 1990; KALIA et al., 1999; TURNER et al., 2004).

Inicialmente, é realizada a extração do DNA presente em uma amostra clínica a ser analisada, a qual posteriormente é submetida a uma série de reações cíclicas. Cada ciclo consiste de três fases (MULLIS, 1990; BRASIL, 2000):

- ∇ Fase de desnaturação: É a fase na qual ocorre o desenrolamento da fita dupla do DNA através da quebra das pontes de hidrogênio entre as bases pareáveis (A – T, G – C), devido ao aquecimento, dando origem a duas fitas simples;
- ∇ Fase de hibridização ou anelamento: É a fase de pareamento dos *primers* com as suas seqüências homólogas correspondentes no DNA alvo;

∇ Fase de extensão: É a fase na qual ocorre a polimerização de uma nova fita antiparalela sobre a fita anteriormente desnaturada, sendo a reação catalisada pela *Taq* polimerase.

As três etapas, anteriormente realizadas em banho-maria, ocorrem atualmente em um termociclador, equipamento que modifica automaticamente as temperaturas de acordo com cada ciclo e o período necessário para as reações. O produto final das três etapas de um ciclo será utilizado como substrato para o próximo de ciclo de amplificações, gerando assim uma reação exponencial. A maioria das reações da PCR necessita de, em média, 30 a 40 ciclos para que um único fragmento gênico apresente mais de 1.000.000.000 de cópias (MELLO & FONSECA-COSTA, 2005).

O ponto da reação que caracteriza a fase final ou estacionária depende da quantidade de DNA amplificado. Outros fatores, tais como exaustão de *primers* ou de nucleotídeos, inativação da polimerase, excesso de substrato e competições com produtos não específicos irão possibilitar a entrada precoce nesta fase (BRASIL, 2000; TURNER et al., 2004)

Os *primers* e, mais especificamente, a confecção deles, é o ponto crítico e limitante da reação da PCR. Estas estruturas devem apresentar temperatura de anelamento ideal, de acordo com a segunda fase do ciclo de amplificação, permitindo a hibridização eficiente destas estruturas e extensão dos fragmentos pela DNA polimerase (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Vários estudos demonstram que há maior eficiência no uso dos *primers* quando os produtos amplificados possuem de 80 a 150 pares de base e a quantidade de citosina e guanina são de até 50% do total de bases nitrogenadas presentes nos *primers*, pois estas bases fazem três ligações de pontes hidrogênio, apresentando, assim, maior força de interação, quando comparadas à adenina e timina, e favorecendo, conseqüentemente, a ocorrência de estruturas diméricas, ou seja, anelamento dos *primers* devido à complementaridade de suas bases. Atualmente, existem programas de computador que disponibilizam desenhos de *primers* com maior eficácia (BROWNIE *et al.*, 1997; BRASIL, 2000; TURNER et al., 2004).

Quanto aos componentes básicos de uma reação de PCR, além da *Taq* polimerase e dos *primers*, serão inclusos tampão fosfato, magnésio, nucleotídeos e o DNA, o qual se deseja amplificar. Vale ressaltar que a concentração de íons de magnésio influencia diretamente na hibridização, na temperatura de separação do DNA alvo, no produto de PCR e sua especificidade, na atividade da *Taq* e na formação de dímeros de *primers* (WIEDBRAUK & FARKAS, 1995; TURNER et al, 2004).

Existem diferentes tipos de reações, a saber:

- ∇ *Reverse Transcriptase Chain Reaction* (RT-PCR): antes da etapa de amplificação, na RT-PCR, uma fita de RNA é utilizada pela enzima transcriptase reversa como molde para a síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA), a qual será utilizada na PCR (VIEIRA, 2006). Esta PCR é bastante útil nos estudos sobre expressão gênica e vírus de RNA (MOLINA & TOBO, 2004);
- ∇ *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP-PCR): consiste em adicionar enzimas digestivas (endonucleases de restrição) junto a um material já amplificado pela reação de PCR, visando cortar o DNA do material em posições constantes dentro de um sítio. Este método é bastante empregado no estudo comparativo entre cepas ou sorogrupos de determinados microorganismos (VIEIRA, 2006);
- ∇ *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD-PCR): é baseada na amplificação do DNA utilizando um par de *primers* de baixa especificidade, desencadeando anelamentos inespecíficos. Por meio desta técnica, torna-se possível a tipagem de um determinado genoma de um microorganismo, que será utilizado no estudo comparativo entre isolados de amostras clínicas (VIEIRA, 2006);
- ∇ PCR Competitiva: além do DNA alvo que se deseja amplificar, também será adicionado outro seguimento gênico de DNA, com sequência, tamanho e concentração conhecidos (controle), e suas extremidades serão complementares aos mesmos *primers* que amplificarão a sequência alvo. No final da reação de PCR, haverá dois trechos de DNA, o alvo e o controle. A PCR



Competitiva, então, através da análise do produto do controle, permite a avaliação da eficácia da reação, bem como a quantificação do DNA alvo amplificado (VIEIRA, 2006);

- ∇ Multiplex PCR: múltiplas sequências genômicas, de tamanhos diferentes, poderão ser amplificadas em uma mesma amostra e em uma única reação, cada uma com o seu par de *primers* específicos (MOLINA & TOBO, 2004);
- ∇ Nested PCR: nesta reação, a sequência genômica é amplificada de forma abrangente, copiando até mesmo segmentos localizados fora da mesma, e utilizando-se este primeiro produto, segue-se à amplificação da real sequência-alvo. Deste modo, há um aumento significativo da sensibilidade e especificidade da reação (VIEIRA, 2006);
- ∇ Real Time PCR: denominada comumente de PCR em tempo real, consiste em uma amplificação convencional de DNA, porém o resultado da reação é gerado ao longo dos ciclos através da emissão e análise de fluorescência (VIEIRA, 2006; OTTO, 2006). A captura da fluorescência é realizada em um sistema óptico fechado, ou seja, em um termociclador com monitoramento para emissão de fluorescência, convertendo os resultados, simultaneamente, em um gráfico de amplificações. Esta técnica apresenta uma elevada sensibilidade e o risco de contaminações é minimizado, sendo bastante utilizada nas quantificações de amostras (MOLINA & TOBO, 2004).

Quando se trata de reagentes de amplificação na PCR em tempo real, existem dois sistemas precursores, *SybrGreen*® e *TaqMan*®. A diferença básica nos dois sistemas é a seguinte: na *TaqMan*®, serão adicionados na reação oligonucleotídeos, denominados de sonda, complementares a uma determinada sequência gênica do DNA alvo e marcados com um fluoróforo ligado na extremidade 5', também conhecido por *reporter* (R). A sonda irá se hibridizar na fita de DNA durante sua extensão pela DNA polimerase e o *reporter* será clivado, emitindo, conseqüentemente, a fluorescência. A cada ciclo de amplificação ocorre liberação de fluorescência, portanto, a reação de amplificação é diretamente proporcional à fluorescência emitida (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Já no sistema *SybrGreen*®, os fluoróforos presentes no reagente se ligam em toda a dupla fita de DNA formada, emitindo, assim, a fluorescência. Ao término da termociclagem, os resultados serão gerados sob a forma de curvas de amplificação, as quais devem ser analisadas em associação (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Com exceção da PCR em tempo real, que já realiza a leitura no próprio aparelho termociclador, todo produto resultante da reação de PCR pode ser visualizado no gel de eletroforese, seja de agarose ou poliacrilamida, e seu tamanho deve ser estimado a partir da comparação com marcadores sintéticos de diferentes comprimentos de fragmento, disponíveis comercialmente (MARTIRE, 2009).

Numa cuba de eletroforese, as moléculas de DNA, suspensas em uma solução eletrolítica denominada tampão de corrida, migrarão na malha do gel devido a uma determinada voltagem e amperagem aplicada no sistema. No final do processo, partindo do pressuposto que a fita de DNA possui carga global negativa, as moléculas de DNA estarão próximas ao catodo - carga positiva (WIEDBRAUK & FARKAS, 1995).

A finalidade da eletroforese é separar os fragmentos por tamanho, uma vez que a reação da PCR gera fragmentos de mesma extensão, e assim purificar o DNA. As moléculas gênicas são retidas ou liberadas no gel de acordo ao seu tamanho e o diâmetro dos poros na trama do gel, ou seja, as partículas menores correrão mais rapidamente no gel e vice-versa (MARTINEZ & PAIVA, 2008).

Ao fim da corrida, o gel deve ser retirado da cuba de eletroforese e colocado em um recipiente contendo um corante, cuja finalidade é se ligar ao DNA presente no gel e, conseqüentemente, permitir que seja visualizada a fluorescência das bandas de DNA quando excitado pela radiação ultravioleta (MARTINEZ & PAIVA, 2008). Um corante bastante utilizado é o brometo de etídio, porém, devido à sua elevada toxicidade, esta substância vem sendo paulatinamente substituída por outros corantes, como, por exemplo, o *Sybr Gold* (INVITROGEN®).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S.R.O.; MOTA, R.A.; ROSINHA, G.M.S.; FORNER, O.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; PEREIRA, R.R.B., CASTRO, R.S.; ELISEI, C.; SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R.; MADUREIRA, R.C. Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.28, p.481-487, 2008.

AL-RAWASHDEH, O.F.; AL-QUDAH, K.M.. Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in awassi sheep in Jordan. Journal of Veterinary Medicine, v.47, p.287-293, 2000.

ALEMAN, M.; SPIER, S.J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. In: SMITH P.B. Large Animal Internal Medicine, 3ed. St Louis: Mosby Co, p.1078-1084, 2001.

ALVES, F.S.F.; OLANDER, H.J. Teste de pele em caprinos vacinados e infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.34, n.7, p.1313-1318, 1999.

ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa: Recomendações e medidas profiláticas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Comunicado Técnico, n.33, p.1-4, 1997.

ALVES, F.S.F.; SANTIAGO, L.B.; PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. Documentos, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Caprinos, Sobral, 2007. 60p.

ANDERSON, D.E.; RINGS, D.M.; PUGH, D.G. Enfermidades do sistema tegumentar. In: PUGH, D.G. (Ed.). Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, 2005. p.232-233.

ANDRADE, J.S.L.; AZEVEDO, S.S.; TELES, J.A.A.; HIGINO, S.S.S.; AZEVEDO, E.O. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. Pesquisa Veterinária Brasileira, São Paulo, v.2, n.32, p.116-120, 2012.

ARRUDA, L.F. Genotipagem de amostras de *Corynebacterium pseudotuberculosis* originadas de casos de linfadenite caseosa no Distrito Federal. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

ARSENAULT, J.; DUBREUIL, P.; GIRARD, C.; SIMARD, C.; BÉLANGER D. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). *Preventive Veterinary Medicine*, v.59, p.125–137, 2003.

AYERS, J.L. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, n.171, p.1251-1254, 1977.

BAIRD, G.J. Current perspectives on caseous lymphadenitis. *Journal Postgraduate of Clinical Study*, n.25, p.62-68, 2003.

BAIRD, G.J. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. *Veterinary Record*, n.159, p.500, 2006.

BAIRD, G.J.; FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*, n.137, p.179–210, 2007.

BAIRD, G.J.; SYNGE, B.; DERCKSEN, D. Survey of caseous lymphadenitis seroprevalence in British terminal sire sheep breeds. *Veterinary Record*, n.154, p.505-506, 2004.

BARAKAT, A.A.; SABER, M.S.; AWAD, H.H. Immunization studies on *C. ovis* infection in guinea pigs by use of BCG and heat killed *C. ovis* vaccine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, n.34, p.38-46, 1974.

BATEY, R.G. The effect of caseous lymphadenitis on body condition and weight of Merino mutton carcasses. *Australian Veterinary Journal*, n.63, p.268, 1986.

BELCHIOR, S.E.; GALLARDO, A.; ABALOS, A.; JODOR, N.; JENSEN, O. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Revista Veterinaria Argentina*, n.23, p.258-278, 2006.

BEN SAID, M.S.; BEN MAITIGUE, H.; BENZARTI, M.; MESSADI, L.; REJEB, A; AMARA, A. Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, n.79, p.51-57, 2002.

BENTO, A.H.L.; ZONI, M.S.F. Observações sobre a ocorrência da linfadenite caseosa em cabras confinadas no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v.8, n.5, p.136-138, 1986.

BIBERSTEIN, E.L.; HIRSH, D.C. 2003. *Corynebactérias; Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes; Rhodococcus equi*. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. (Ed.), Microbiologia Veterinária. 2 ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.119-126, 1971.

BINNS, S.H.; BAILEY, M.; GREEN, L.E. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Veterinary Record*, n.150, p.263-268, 2002.

BLADEN, R.V.; LEFFORD, M.T.; MACHNAERS, G.B. The host reponse to BCG infection in mice. *Journal of Experimental Medicine*, n.129, p.1079-1106, 1969.

BRASIL. Caprinos e ovinos em foco. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Sobral, 2008a. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/Jornaledicao22.pdf>>. Acesso em 10/12/12.

BRASIL. I Curso de biologia molecular aplicada à saúde animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte, Campo Grande, 2000.

BRASIL. Pesquisa da Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática, Rio de Janeiro, 2007.

BRASIL. Programa brasileiro da qualidade do couro. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, Brasília, 2002.

BRASIL. Relatório do Setor de Couro e Calçados. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Brasília, 2001.

BRASIL. Relatório Setorial: indústria do couro, calçados e artefatos. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, Brasília, 2008b.

BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; ALVES, S.F. Synergistic hemolysisinhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.51, p.46-49, 1987.

BROWNIE, J.; SHAWCROSS, S.; THEAKER, J.; WHITCOMBE, D.; FERRIE, R.; NEWTON, C.; LITTLE, S. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.16, 1997.

BURREL, D.H. A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Research Veterinary Science*, v.28, p.190-194, 1980.

BUXTON, A.; FRASER, G. *Corynebacterium*. In: BUXTON, A.; FRASER, G. (Ed.), *Animal Microbiology*. Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, p. 177–183, 1977.

CAMARGO, E.V.; BARBOZA, C.S.; KREWER, C.; VARGAS, A.P.C.; CECIM, M.; LEAL, M.L.R. Isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no sêmen de um carneiro na região central do Rio Grande do Sul. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.77, n.1, p.139-142, 2010.

CAMERON, C.; MINNAAR, J.L.; ENGELBRECHT, M.M.; PURDOM, M.R. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. *Journal of Veterinary Research*, n.39, p.11-24, 1972.

CAMERON, C.M. Immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of the South African Veterinary Association*, n.43, p.343-349, 1972.

CARMINATI, R. Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

CARNE, H.R.; WICKHAM, N.; KATER, J.C. A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*. *Nature*, n.178, p. 701-702, 1956.

CARTER, G.R. *Diagnostics procedures in veterinary bacteriology and mycology*. 5 ed. California: Academic press Inc., 1990, p.620.

CASTILHOS, L.R.; PINTO, L.F.; ALMEIDA, B.M. Possibilidade terapêutica na linfadenite caseosa em caprinos no sistema orgânico de produção. *Homeopatia Brasileira*, Rio de Janeiro, v.8, n.1, p.19-22, 2002.

CETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE, T.; VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*, n.88, p.75-83, 2002.

CLARRIDGE, J.E.; SPIEGEL, C.A. *Corynebacterium* and related organisms. In: BARRON, E.J. (Ed.). Manual of Clinical Microbiology. 6 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. p.357-370.

COLLETT, M.G.; BATH, G.F.; CAMERON, C.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa. Oxford University Press, v.2, 1994. p.1387-1395.

COMES, A.M.; HUMBERT, J.F.; CABARET, J.; ÉLARD, L. Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. Veterinary Research Paris, v.27, p.333-342, 1996.

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

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.219-240.

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

CUBERO PABLO, M.J.; REAL VALCÁRCEL, F.; GONZÁLEZ CANDELA, M.; LEÓNVISCAÍNO, L. Epidemiolgia de la pseudotuberculosis. Revista Ovis, 2002.

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

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

EGGLETON, D.G.; MIDDLETON, H.D.; DOIDGE, C.V.; MINTY, D.W. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium*

*pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. Australian Veterinary Journal, n.68, p.317-319, 1991.

ELLIS, T.M.; SUTHERLAND, S.S.; WILKINSON, F.C.; MERCY, A.R.; PATON, M.W. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. Australian Veterinary Journal, n.64, p.261-263, 1987.

EOM, S.H.; WANG, J.; STEITZ, T.A. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. Journal Nature, n.382, p.278-281, 1996.

EUZEBY, J.P. List of Bacterial names with standing in nomenclature, Society for Systematic and Veterinary Bacteriology, 2005.

EUZEBY, J.P.; GUÉRIN-FAUBLÉE, V. Étude de quelques bactéries pathogènes pour le cheval et ou les carnivores domestiques. In: FRENEY, J.; RENAUD, F.; HANSEN, W.; BOLLET, C. (Ed.). *Precis de Bacteriologie Clinique*, Paris, p.456-500, 2000.

FONTAINE, M.C.; BAIRD, G.; CONNOR, K.M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, n.24, p.5986-5996, 2006.

FONTAINE, M.C.; BAIRD, G.J. Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Research*, n.76, p.42-48, 2008.

GASPAROTO, S.W. Caseous lymphadenitis. *Goat Rancher Magazine*, 1996.

GATTÁS, G.J.F.; SEGRE, M.; WÜNSCH FILHO, V. Genética, biologia molecular e ética: as relações trabalho e saúde. *Ciência e saúde coletiva*, São Paulo, v.7, n.1, 2002.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology*, n.13, p.122-143, 2000.

GOULETSOU, P.G.; FTHENAKIS, G.C. Clinical evaluation of reproductive ability of rams. *Small Ruminant Research*, n.92, p.45-51, 2010.

HODGSON, A.L.; TACHEDJIAN, M.; CORNER, L.A.; RADFORD, A.J. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, n.62, p.5275-5280, 1994.



HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Irregular nonsporulating Gram-positive rods, 2006. In: HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 593p.

HOUSE, R.W.; SCHOUSBOE, M.; ALLEN, J.P.; GRANT, C.C. *Corynebacterium ovis* (*pseudotuberculosis*) lymphadenitis in a sheep farmer: a new occupational disease in New Zeland. *New Zeland Medicine Journal*, n.99, p.659-662, 1986.

ISMAIL, A.A.; HAMID, Y.M.A. Studies on the efect of some chemical disinfectants used in veterinary practice in *Corynebacterium ovis*. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*, n.32, p.195-202, 1972.

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, n.3, p.357-369, 1993.

JOIN-LAMBERT, O.F.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J.L.; BLANCHE, S.; BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatric Infectious Disease Journal*, n.25, p.848-851, 2006.

JOLLY, R.D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.29, n.1, p.189-196, 1966.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia veterinária*. 6 ed. São Paulo: Manole, 2000.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. London: Academic Press, 1985.

JUDSON, R.; SONGER, J.G. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: in vitro susceptibility to 39 antimicrobial agents. *Veterinary Microbiology*, n.27, v.2, p.145-150, 1991.

KABA, J.; KUTSCHKE, L.; GERLACH, G.F. Developmant of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Veterinary Microbiology*, n.26, p.155-163, 2001.

KALIA, A.; RATTAN, A.; CHOPRA, P. A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. *Analytical Biochemistry*, n.275, p.1-5, 1999.

KRITSKI, A.L.; ROSSETTI, M.L.; BONFIM, G.; CASTELO, A.; QUEIROZ MELO, F.C. Técnica da reação em cadeia da polimerase. *Jornal de Pneumologia*, São Paulo, n.23, v.1, 1997.

LANGENEGGER, H.; LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, n.11, p.1-7, 1991.

LEÓN-VISCAÍNO, L.; GARRIDO ABELLÁN, F.; GONZALEZ CANDELA, M.; CUBERO PABLO, M.J. Clínica de la pseudotuberculosis. *Revista Ovis*. 2002.

LIMA, M.C.L. Prevalência da linfadenite caseosa dos caprinos no município de Casa Nova – Bahia. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1980, 30p.

MALONE F. Current and emerging flock health concerns. In: *Proceedings of Meetings of the British Society of Animal Science*. Antrim: Greenmount College, 2005.

MARTINEZ, E.R.M.; PAIVA, L.R.S. Eletroforese de ácidos nucléicos: uma prática para o ensino de genética. *Genética na Escola*, p.43-48, 2008. Disponível em: <[www.sbg.org.br](http://www.sbg.org.br)>. Acesso em: 05 fev. 2010.

MARTIRE, T.M. Diagnóstico laboratorial da tuberculose na infância: métodos convencionais e métodos rápidos. *Publicação Oficial da Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro*. Pulmão RJ, Suplemento de Pneumopediatria, Rio de Janeiro, n.1, p.20, supl.27, 2009.

MCKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: The major virulence factor, phospholipase D, is downregulated. *Research in Microbiology*, n.158, p.279-286, 2007.

MELLO, F.C.Q.; FONSECA-COSTA, J. A utilidade da biologia molecular no diagnóstico da tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Brasília, v.31, n.3, 2005.

MELO, C.B.; LEITE, R.C. Papilomatose bovina. *Ciência Veterinária Tropical*, n.6, p.1-12, 2003.

MELO, L.E.H.; MELO, M.T.; LEITE, J.E.B.; MAIA, F.C.L.; MOTA, R.A.; SCHINDLER, H.C.; LIMA, J.F.C.; CASTRO, R.S.; SANTOS, N. V. M.; SÁ, L.M. Tuberculose caprina: aspectos nosológicos, radiológicos, anatomo-histopatológicos e presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em caprinos leiteiros do Estado de Pernambuco, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35, 2008, Gramado. Anais... Gramado, 2008.

MELO, L.E.H.; SILVA, T.I.B.; FERNANDES, A.C.C.; BAPTISTA FILHO, L.C.F.; MOTA, R.A.; SILVA, L.B.G. Monitoramento clínico-epidemiológico relacionado ao diagnóstico diferencial entre tuberculose caprina e linfadenite caseosa. In: Seminário nacional sobre brucelose e tuberculose animal, 2010, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, 2010.

MELO, M.T.; MELO, L.E.H.; SALDANHA, S.V.; EVÊNCIO-NETO, J.; TENÓRIO, T.G.S.; NASCIMENTO, E.T.S.; FERNANDES, A.C.C.. Ocorrência da tuberculose caprina no Estado de Pernambuco. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 18, 2005, São Paulo. Anais... São Paulo, 2005.

MENZIES, P.I.; MUCKLE, C.A.; BROGDEN, K.A.; ROBINSON L. A field trial to evaluate a whole cell vaccine for the prevention of caseous lymphadenitis in sheep and goat flocks. *Canadian Journal of Veterinary Research*, n.55, p.362-366, 1991.

MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. The genus *Corynebacterium*. IN: MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. (Ed.), *Veterinary Bacteriology and Virology*. Iowa: The Iowa State University Press, p. 425-440, 1967.

MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R.B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; SILVA, J.A.H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, L.; PAULE, B.; FREIRE, S.M.. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, Salvador, v.1, n.1, p.42-48, 2002.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium*

pseudotuberculosis antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, n.107, p.249-254, 2005.

MIELLE FILHO, A.; REMUALDO, V. *Biologia molecular aplicada ao diagnóstico de doenças infecciosas. Prática Hospitalar - Ano IX, São Paulo*, n.53, 2007.

MILLS, A.E.; MITCHELL, R.D.; LIM, E.K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. *Pathology*, n.29, p.231-233, 1997.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. *Biologia molecular. Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. São Paulo: Hospital Israelita Albert Einstein*, 2004.

MOLLER, 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: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, n.47, p.55-62, 2000.

MOTTA, R.G.; CREMASCO, A.C.M.; RIBEIRO, M.G. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. *Veterinária e Zootecnia*, v.17, n.2, p.200-213, 2010.

MOURA COSTA, M.D.; CAMARA, 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, Salvador*, v.12, n.1, p.1-7, 1973.

MOURA-COSTA, L.F.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; VALE, V.L.C.; PAULE, B.J.A.; PORTELA, R.W.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAEER, R.; BARRETO, L.M.S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde' goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, n.126, p.131-141, 2008.

MUCKLE, C.A.; GYLES, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.46, p.206-208, 1982.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, v.262, p.56-62, 1990.

NAIRN, M.E.; ROBERTSON, J.P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. Australian Veterinary Journal, n.50, p.537-542, 1974.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. Revista Brasileira de Medicina, São Paulo, v.67 supl. 10, 2010.

NOZAKI, C.N.; FARIA, M.A.R.; MACHADO, T.N.M. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, n.67, p.187-189, 2000.

OTTO, P.G. Genética básica para veterinária. 4 ed. São Paulo: Roca, 2006.

PACHECO, L.G.C.; PENA, R.R.; CASTRO, T.L.P.; DORELLA, F.A.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; FROTA, M.N.L.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; ALVES, F.S.F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. Journal of Medical Microbiology, 56, p.480-486, 2007.

PATON, M.W. Applying the experience of CLA in the Southern Hemisphere. In: Proceedings of the Moredun Research Institute/ Scottish Agricultural College Workshop on Caseous Lymphadenitis, p.3-15, 2000.

PATON, M.W.; COLLETT, M.G.; PEPIN, M.; BATH, G.F. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Ed.). Infectious Diseases of Livestock, 3 ed. Cape Town: Oxford University Press Southern Africa, 2005. p.1917-1930.

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, n.65, p.117-119, 1988.

PATON, M.W.; WALKER, S.B.; ROSE, I.R.; WATT, G.F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. Australian Veterinary Journal, n.81, p.91-95, 2003.

PEEL, MM, Palmer GG, Stacpoole AM, Kerr TG. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clinical Infectious Diseases*, n.24, p.185-191, 1997.

PEPIN, M.; BISRAME, A.; MARLY, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis*; biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. *Annals of Veterinary Research*, n.20, p.111-115, 1989.

PINHO, M.S.L. Pesquisa em Biologia Molecular: como fazer? *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v.26, n.3, p.331-336, 2006.

PUGH, G.D. *Sheep and goat medicine*. New York: Elsevier, 2004.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing Company, p.137-143, 1994.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe, p.237-242, 1994.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. 1770p.

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, M.G.; DIAS JUNIOR, J.G.; PAES, A.C.; BARBOSA, P.G.; NARDI JUNIOR, G.; LISTONI, F.J.P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, n.68, p.23-28, 2001.

RIBEIRO, O.C.; SILVA, J.A.H.; MAIA, P.C.C.; CAMPOS, W.G. Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro*, v.8, n.1/2, p.27-29, 1988.

RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R. (Ed.). Doenças de Ruminantes e Eqüídeos. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, p.347-352, 2007.

ROCHE Sistemas de Diagnóstico Limitada. Introdução à PCR. Portugal, 2008. Disponível em: <<http://www.roche.pt/portugal/index.cfm>>. Acesso em: 04 fev. 2011.

SÁ, M.C.A. Incidência de linfadenite caseosa em caprinos e ovinos vivos e abatidos no Vale do São Francisco. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2012, 72p.

SALDANHA, S.V.; EVÊNCIO-NETO, J.; MELO, L.E.H.; MELO, M.T.; TENÓRIO, T.G.S.; FERNANDES, A.C.C. Caracterização das alterações buco-dentais de caprinos criados no Sertão e Zona da Mata do Estado de Pernambuco. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 18, 2005, São Paulo. Anais... São Paulo, 2005.

SANCHES, B.G.S. Avaliação da função fagocítica de células da linhagem monócitos macrófagos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da artrite encefalite caprina, à *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2008. 79f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SENTURK, S.; TEMIZEL, M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. Veterinary Record, n.159, p.216-217, 2006.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L.G.C.; PORTELA, R.W.; BASTOS, B.L.; DORELLA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; GOUVEIA, A.M.G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Research in Veterinary Science, n.88, p.50-55, 2010.

SMITH, P.B. Large animal internal medicine. 4 ed. St Louis: Mosby, 2003.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. Subcutaneous swellings. In: Goat Medicine. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, p.46-49, 1994.

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.

STANFORD, K.; BROGDEN, K.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, n.62, p.38-43, 1998.

STOOPS, S.G.; RENSHAW, H.W.; THILSTED, J.P. Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. American Journal of Veterinary Research, n.45, p.557-561, 1984.

SUNIL, V.; MENZIES, P.I.; SHEWEN, P.E.; PRESCOTT, J.F. Performance of a whole blood interferogamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. Veterinary Microbiology, n.128, p.288-297, 2008.

TIZARD, I. Imunologia veterinária – Uma introdução. 8ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2009. 608p.

TURNER, P.C.; MCLENNAN, A.G.; BATES, A.D.; WHITE, M.R.H. Biologia molecular. 2ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

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

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, R.; PAULE, B.J.A.; NASCIMENTO, I.; MEYER, Roberto. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, Salvador, n.2, p.192-200, 2003.

VALLI, V.E.; PARRY, B.W. Caseous lymphadenitis. In: JUBY, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. (Ed.). Pathology of domestic animals, 5 ed., v.3. San Diego: Academic Press, p.238-240, 2007.



VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: Aplicações e padronização de reações. 2006. Disponível em: <<http://www.etall.hpg.ig.com.br/aula1b.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2011.

WALKER, B. Cheesy gland caseous lymphadenitis in sheep. Sydney: NSW Department of Primary Industries, 1996.

WALKER, J.; JACKSON, H.J.; EGGLETON, D.G.; MEEUSEN, E.N.T.; WILSON, M.J.; BRANDON, M.R. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infection and Immunity*, v.62, n.6, p.2562-2567, 1994.

WATSON, P.J.; PREECE, B.E. Report on 31 caseous lymphadenitis infected sheep farms in England and Wales. *Veterinary Record*, n.148, p.663-665, 2001.

WIEDBRAUK, D.L.; FARKAS, D.H. Molecular methods for virus detection. San Diego: Academic Press, 1995.

WILLIAMSON, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, n.17, p.359-371, 2001.

WILSON, M.J.; BRANDON, M.R.; WALKER, J. Molecular and biochemical of a protective 40 - kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*, v.63, n.1, p.206-211, 1995.

WINDSOR, P.A. Control of Caseous Lymphadenitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, n.27, p.193-202, 2011.

WINDSOR, P.A.; EPPLESTON, J. Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *New Zealand Veterinary Journal*, n.54, p.237-241, 2006.

WINTER, A.C. Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Veterinary Record*, n.140, p.611, 1997.

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

YOZWIAK, M.L.; SONGER, J.G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. American Journal of Veterinary Research. n.54, p.392-397, 1993.

ZARRAGA, C.C.; SCARAMELLI, A.; VALEIRON, C.R. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. Small Ruminant Research, n.65, p.170-175, 2006.

# **ARTIGO CIENTÍFICO**

**Avaliação da reação em cadeia da polimerase em tempo real na detecção do  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos <sup>1</sup>**

Tamyres I. B. Silva<sup>2\*</sup>, Lúcio E. H. Melo<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** - Silva T.I.B., Melo L.E.H., [Evaluation of real time polimerase chain reaction in the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in caprines] Avaliação reação em cadeia da polimerase em tempo real na detecção do *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. Pesquisa Veterinária Brasileira 32(0):00-00. <sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: [tamyres\\_ibs@hotmail.com](mailto:tamyres_ibs@hotmail.com)

The caseous lymphadenitis (CL), infectious disease characterized by the formation of lesions abscedantes, especially in lymph nodes, stands out as a great economic importance because it is one of the main causes of condemnation of carcasses of small ruminants and cause severe depreciation of leather these animals. This study aimed to evaluate the polymerase chain reaction (PCR) in real time for detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats. 643 goats were evaluated, of which 25 animals with lesions abscedantes surface underwent harvest of abscess contents, for the identification of *C. pseudotuberculosis* through bacterial isolation and real time PCR. Additionally, blood, milk and feces were also processed by real time PCR for estimating the elimination of the agent in these specimens. Of the 25 samples content abscess subjected to bacterial isolation and PCR, 72% (18/25) and 36% (9/25), respectively, were positive for *C. pseudotuberculosis*, there is a positive correlation between the tests. The bacterium also was detected at frequencies of 8% (2/25) 4% (1/25) and 0% (0/25) in milk, blood or feces, respectively. The real-time PCR, when applied directly to samples of abscess contents, showed no considerable reliability in the diagnosis of CL in goats, despite the results of the preliminary characterization technique in drug elimination by hematogenous and lactea routes.

INDEX TERMS: lymphadenitis caseous, goats, diagnosis.

**RESUMO.** – A linfadenite caseosa (LC), doença infecciosa caracterizada pela formação de lesões abscedantes, sobretudo, em linfonodos, se destaca como de grande relevância econômica por ser umas das principais causas de condenação de carcaças de pequenos ruminantes e ocasionar intensa depreciação do couro destes animais. Objetivou-se avaliar reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real na detecção do *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. Foram avaliados 643 caprinos, dos quais 25 animais com lesões abscedantes superficiais foram submetidos à colheita de conteúdo de abscesso, para a identificação do *C. pseudotuberculosis* por meio do isolamento bacteriológico e da PCR em tempo real. Adicionalmente, amostras de sangue, leite e fezes também foram processadas pela PCR tempo real, para estimar a eliminação do agente por estes espécimes. Das 25 amostras de conteúdo de abscesso submetidas ao isolamento bacteriológico e à PCR, 72% (18/25) e 36% (9/25), respectivamente, resultaram positivas para o *C. pseudotuberculosis*, havendo correlação positiva entre os testes. A bactéria ainda foi detectada nas frequências de 8% (2/25), 4% (1/25) e 0% (0/25) no leite, sangue e fezes, respectivamente. A PCR em tempo real, quando aplicada diretamente em amostras de conteúdo de abscesso, não apresentou confiabilidade considerável para o diagnóstico da LC em caprinos, apesar dos resultados preliminares da técnica na caracterização da eliminação do agente pelas vias láctea e hematogena.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: linfadenite caseosa, cabras, diagnóstico.

## **INTRODUÇÃO**

A caprinovinocultura, anteriormente voltada apenas à subsistência, tem se tornado uma atividade em ascensão e de grande representação sócio-econômica no Brasil, sobretudo na região Nordeste, que detém a maior parcela do efetivo nacional de caprinos e ovinos (Medeiros, Sano & Ribeiro 2005). Os índices de produtividade de um rebanho estão diretamente relacionados aos diferentes sistemas de criação e ao controle sanitário das propriedades (Barcellos et al. 2002; Carvalho 2011).

Neste contexto, a linfadenite caseosa (LC), doença infecciosa caracterizada pela formação de lesões abscedantes em gânglios superficiais e viscerais ou em

órgãos (Radostits et al. 2007), se destaca como de grande relevância econômica, por ser umas das principais causas de condenação de carcaças de pequenos ruminantes (Costa 2002, Smith 2003, Vale et al. 2003; Fontaine & Baird 2008), além de ocasionar intensa depreciação da lã e do couro destes animais. Situação esta que atribui, portanto, restrições à comercialização, ao manufaturamento e à exportação de produtos cárneos e do couro e seus derivados (Brasil 2008).

Adicionalmente, o déficit na produção leiteira, a predisposição a problemas reprodutivos, infecções intercorrentes e eventuais óbitos são outros aspectos desfavoráveis acarretados pela introdução da LC nos rebanhos (Smith 2003, Radostits et al. 2007).

Sua ocorrência possui importância mundial (Baird & Fontaine 2007, Motta, Cremasco & Ribeiro 2010), principalmente em locais com tradição na criação de ovinos e caprinos, como Nova Zelândia, Espanha, França, Austrália, Suíça e Holanda (Belchior et al. 2006), mas também é considerada alta em vários outros países (Moller et al. 2000, Ben Said et al. 2002, Cubero Pablo et al. 2002, Arsenault et al. 2003, Paton et al. 2003, Paton et al. 2005, Fontaine et al. 2006).

No Brasil, as elevadas taxas de frequência (Bento & Zoni 1986, Nozaki, Faria & Machado 2000, Cubero Pablo et al. 2002, Costa 2002, Motta, Cremasco & Ribeiro 2010) caracterizam um estado de enzootia da LC, especialmente no Nordeste (Moura Costa 1973, Lima 1980, Unanian, Silva & Pant 1985, Alves & Pinheiro 1997, Riet-Corrêa et al. 2007, Melo et al. 2010, Andrade et al. 2012), onde foram relatados valores entre 24 e 50% de caprinos infectados, com destaque para Pernambuco (Riet-Corrêa et al. 2007, Abreu et al. 2008).

Embora existam vários testes para o diagnóstico da doença (Langenegger & Langenegger 1991, Kaba, Kutschke & Gerlach 2001, Belchior et al. 2006, Seyffert et al. 2010), o teste padrão-ouro é o isolamento bacteriológico, associado às provas bioquímicas, porém esta técnica está limitada à identificação de animais com sinais clínicos da enfermidade (Carter 1990, Malone 2005, Baird & Fontaine 2007).

Assim, um aspecto importante a ressaltar é a deficiência na investigação de animais assintomáticos para definir a real prevalência da LC nos rebanhos, demonstrando a necessidade da aplicação de testes diagnósticos capazes de identificar estes portadores inaparentes (Belchior et al. 2006), os quais

representam uma fonte de transmissão em potencial para os outros animais (Ellis et al. 1987, Çetinkaya et al. 2002, Baird & Fontaine 2007).

Objetivou-se com este estudo avaliar a reação em cadeia da polimerase em tempo real na detecção do *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A amostragem foi estabelecida por conveniência, com base em estudo não probabilístico (Marotti et al. 2008), sendo avaliados 643 caprinos, provenientes de 27 rebanhos com aptidão leiteira, idade entre cinco meses a oito anos, das raças Saanen, Toggenburg e Parda Alpina, criados nas Mesorregiões Metropolitana do Recife, Mata, Agreste e Sertão do Estado de Pernambuco.

Os animais foram submetidos ao exame clínico, com ênfase na inspeção e palpação dos linfonodos superficiais e presença de cicatrizes sugestivas de LC (Smith & Sherman 1994, Anderson, Rings & Pugh 2005, Radostits et al., 2007). Dos animais avaliados, 25 caprinos portadores de lesões abscedantes superficiais foram selecionados, sendo colhidas amostras de sangue total com anticoagulante (EDTA), leite, fezes da ampola retal e conteúdo de abscesso.

Para o isolamento bacteriológico do *C. pseudotuberculosis*, as amostras de conteúdo de abscesso, foram semeadas em ágar-sangue ovino a 5% e incubadas a 37°C, por 48 horas. As colônias foram caracterizadas sob os aspectos macroscópicos, microscópicos, pela coloração de Gram, e provas bioquímicas (Carter, Claus & Rikihisa 1986, Carter 1990, Corrêa & Corrêa 1992, Murray et al. 1999).

A extração do DNA das amostras clínicas (sangue, leite, fezes e conteúdo de abscesso) e a PCR em tempo real foi realizada utilizando-se kits comerciais (Blood & Tissue kit - Qiagen®; Master Mix Sybr Green - Qiagen®, respectivamente), seguindo as recomendações do fabricante e protocolos preconizados na literatura (Çetinkaya et al. 2002), com adaptações.

A sequência de *primers*, o gene alvo e o comprimento do fragmento amplificado esperado, utilizados e considerados neste estudo, foram anteriormente publicados (Pacheco et al., 2007) e estão descritas no Quadro 1.

Como controle positivo, foi utilizada amostra de cultura purificada do *C. pseudotuberculosis*, e, como controle negativo, o DNA foi excluído da reação.

Quanto à análise estatística, foi aplicado o método descritivo, para determinar as frequências absoluta e relativa (Sampaio, 1998), e o teste de correlação (Lira, 2004), para avaliar a existência de associação positiva entre o isolamento bacteriológico e a PCR, em nível de significância de  $p > 0,05$ . A sensibilidade, especificidade e acurácia da PCR, considerando o isolamento bacteriológico como padrão-ouro, foram calculadas com base nas equações descritas por Thrusfield (2004).

## **RESULTADOS**

Dos 643 caprinos examinados, 76 (11,8%) apresentaram sinais clínicos compatíveis com a LC, por meio de lesões abscedantes (71/76 - 93,4%) (Fig. 10) ou cicatrizes (5/76 - 6,6%) no tecido tegumentar.

A faixa etária dos animais acometidos variou entre cinco meses e oito anos, sendo a doença observada com maior frequência em animais com idade entre um e três anos (50/76 - 65,8%), apesar de que um cabrito com aproximadamente cinco meses, proveniente da Mesorregião Metropolitana do Recife, já demonstrava lesão abscedante com progressão há dois meses.

Com exceção de nove animais, que apresentavam lesões em região de costado (8/71 - 11,3%) e em articulação (1/71 - 1,4%), sendo este último inclusive um achado raro (Valli & Parry 1993), a maior parte dos abscessos (62 - 87,3%) encontravam-se em linfonodos superficiais (Quadro 2), sendo o submandibular o mais acometido.

Em meio à punção dos abscessos de 25 caprinos sintomáticos, selecionados para formar o grupo de estudo, observou-se a drenagem de um conteúdo de coloração amarelada, com odor fétido e aspecto ora purulento, ora caseoso (Fig. 15), sendo os achados bastante característicos da LC (Smith & Sherman 1994, Jones, Hunt & King 2000, Pugh 2004, Radostits et al. 2007).

Das 25 amostras submetidas ao isolamento bacteriológico, 72% (18/25) resultaram em colônias esbranquiçadas e de aproximadamente dois milímetros de



tamanho, e, na avaliação microscópica, observou-se bactérias *Gram* positivos pleomórficas (Smith 2003, Pugh 2004). A caracterização bioquímica foi compatível com o gênero e espécie investigados (Muckle & Gyles 1982, Songer et al. 1988).

Na PCR em tempo real, as amostras de conteúdo de abscesso apresentaram 36% de positividade (9/25), demonstrando uma sensibilidade e especificidade do teste molecular para a identificação do *C. pseudotuberculosis* de 44,4% e 85,7%, respectivamente, com a acurácia de 56%. Houve correlação positiva entre ambos os testes, em nível de significância de  $p > 0,05$ .

Quanto à PCR em tempo real aplicada em diferentes espécimes clínicos, provenientes dos mesmos 25 caprinos com lesões abscedantes externas, o *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi detectado nas frequências de 8% (2/25), 4% (1/25) e 0% (0/25) em amostras de leite, sangue e fezes (Quadro 3), respectivamente.

## **DISCUSSÃO**

A frequência da LC em caprinos observada neste estudo (11,8%) foi discretamente maior que a registrada em recente pesquisa realizada no semi-árido paraibano (Andrade et al., 2012), porém, ainda inferior àquelas citadas para a região nordeste do país, que variam entre 24 a 50% (Riet-Corrêa et al. 2007, Abreu et al. 2008).

A redução na detecção de casos clínicos da enfermidade pode estar associada ao emprego da punção ou excisão cirúrgica das lesões, que tem se tornado uma prática bastante comum nas criações (Vale et al. 2003, Baird 2006, Windsor 2011), no sentido de melhorar o aspecto externo dos caprinos, visando a comercialização ou o abate. Andrade et al. (2012), por exemplo, relataram que 59% dos caprinos do Estado da Paraíba com LC apresentavam apenas cicatrizes.

Contudo, a eficácia deste procedimento restrito à lesão, muitas vezes meramente estético, é questionável por se tratar a LC de uma doença sistêmica, levando a uma situação de alta periculosidade à integridade sanitária dos rebanhos, em função da consequente manutenção de animais infectados e disseminadores em potencial da doença (Nozaki, Faria & Machado 2000).

Apesar da baixa frequência encontrada, constatou-se que em 88,9% (24/27) das criações estudadas apresentam pelo menos um caprino sintomático, demonstrando, assim, o elevado grau de disseminação do *C. pseudotuberculosis* nos rebanhos do estado e a necessidade da implementação de medidas estratégicas para o controle da LC.

A faixa etária parece ser um aspecto importante, na qual os animais mais velhos, sobretudo após dois anos de idade, são mais acometidos (Gasparoto 1996, Meyer et al. 2002). Contudo, embora haja poucos relatos sobre a ocorrência da LC em animais mais jovens (Santa Rosa et al. 1989), como observado neste estudo, além do contato direto com animais enfermos (Walker 1996, Windsor & Eppleston 2006), existe a possibilidade de infecção por transmissão vertical da doença, sobretudo nas situações de alta prevalência no rebanho e práticas de manejo inadequadas (Silva et al. 2009).

A maior frequência dos abscessos foi observada em áreas correspondentes ao linfonodo submandibular, semelhante às lesões relatadas em ovinos no Oriente Médio (Baird & Fontaine 2007) e associado ao acesso do *C. pseudotuberculosis* através da cavidade oral (Ashfaq e Campbell, 1979). Porém, diversas publicações citaram o linfonodo pré-escapular como o mais frequentemente afetado (Silva & Silva 1982, Unanian et al. 1985, Souza et al. 2011, Andrade et al. 2012), provavelmente por ser uma área susceptível às abrasões ocasionadas por arames de cercas ou vegetações xerófitas, promovendo uma porta de entrada ao agente (Smith & Sherman 1994).

No isolamento bacteriológico obteve-se 72% de isolamento do *C. pseudotuberculosis*, achado semelhante ao descrito por Andrade et al. (2012), que detectaram 68,2% (15/22) de positividade para a bactéria em amostras de caprinos e ovinos.

A PCR em tempo real, por sua vez, apresentou sensibilidade baixa quando comparada ao cultivo bacteriológico, sendo este resultado discordante do trabalho de Pacheco et al. (2007) que, através da extração de DNA e aplicação da PCR diretamente em material purulento, identificou a bactéria de maneira mais rápida e com sensibilidade muito próxima ao exame microbiológico. Inclusive, este

protocolo atualmente é considerado como padrão-ouro para o diagnóstico da LC no Centro Francês de Referência em Corynebacterioses, no Instituto Pasteur.

Çetinkaya et al. (2002) demonstraram uma elevada sensibilidade e especificidade, próximo de 90%, com o uso da PCR, contudo aplicado em cepas isoladas em cultivo. Ribeiro (2009) também obteve maiores concentrações de DNA bacteriano a partir de colônias isoladas.

Neste contexto, admite-se que a baixa sensibilidade da PCR, encontrada neste estudo, possa estar relacionada ao processo de congelamento rápido das amostras, com formação de cristais de gelo e conseqüente ruptura de células (Alves e Guimarães, 2009), liberando expressiva quantidade de enzimas, sobretudo as proteases produzidas por eosinófilos, tipo celular abundante nas lesões de LC. Estas proteases poderiam promover a degradação enzimática de moléculas de DNA da própria *Taq* polimerase, limitando, assim, a amplificação do material genômico (Costa 2002, Bazzo et al. 2004).

Além disso, a presença de moléculas caracterizadas como inibidores da PCR, seja da própria amostra ou de compostos utilizados na extração e purificação do DNA (Quadro 4), que atuam por ligação direta ao material genético, diminuindo a atividade da enzima *Taq* polimerase ou reduzindo a disponibilidade de íons de magnésio (An & Fleming 1991, Soloway et al. 1999, Opel, Chung & McCord 2009), podem ter comprometido o resultado final das reações de PCR neste estudo.

Considerando que o *C. pseudotuberculosis*, após infectar o hospedeiro através da pele, pouco persiste no local de entrada e geralmente progride pelas vias hematogena ou linfática até alcançar outros sistemas (Valli e Parry, 1993), julgou-se necessário avaliar a aplicabilidade da PCR em diferentes espécimes clínicos dos 25 caprinos com lesões abscedantes externas.

A presença da bactéria no leite representa uma extensão da infecção pela via linfática até os linfonodos supra-mamários e parênquima da glândula mamária (Baird & Fontaine 2007), promovendo a formação de abscessos, como foi observado neste estudo (Quadro 2) (Fig. 19), e acarretando em perdas econômicas aos produtores e às indústrias de subprodutos lácteos (Victória et al. 2005). Além disso, o destino do leite dessas propriedades demonstra a importância não apenas na transmissão às crias, mas ainda na saúde pública (Peel et al. 1997), por

representar uma zoonose para indivíduos consumidores de leite de cabra (Watson & Preece 2001, Join-Lambert et al. 2006, Abreu et al. 2008), produto tradicionalmente comercializado no sertão nordestino (Brasil 2011).

Por sua vez, a identificação da bactéria no sangue também é interpretada como uma expansão da infecção (Baird & Fontaine 2007) e tem sido bastante relacionada na disseminação e estabelecimento da doença (Nagy 1976, Burrell 1978, Pepin et al. 1994, Fontaine et al. 2006), ratificando a relevância do controle sanitário, sobretudo quanto à reutilização de agulhas em diferentes animais e em procedimentos cirúrgicos (Smith 2003, Windsor & Eppleston 2006, Riet-Correa, 2007).

Embora as bactérias sejam carreadas por macrófagos e necessitem circular pela via hematogênica ou linfática para se disseminar e atingir outros sítios (Valli e Parry, 1993), observou-se uma reduzida frequência no sangue, provavelmente decorrente da bacteremia transitória de baixo grau assumida pelo *C. pseudotuberculosis* (Hagan, Bruner & Timoney, 1988).

Quanto à via digestiva, há registro do isolamento do *C. pseudotuberculosis* em conteúdo de estômago (Dennis e Bamford, 1966) e linfonodos mesentéricos (Menzies et al. 1991, Smith 2003, Pugh 2004, Belchior et al. 2006, Radostits et al. 2007), remetendo à infecção oral como porta de entrada. Sabe-se, ainda, que o material fecal é uma importante fonte de transmissão da LC, visto a elevada capacidade de sobrevivência da bactéria neste meio (Paule et al. 2003, Fontaine et al. 2006, Baird & Fontaine 2007, Windsor et al. 2011). Porém, a eliminação do *C. pseudotuberculosis* por esta via não foi verificada neste trabalho.

Seddon et al. (1929) e Benham et al. (1962) conseguiram cultivar as bactérias a partir de fezes de ovinos infectados, mas Valli & Parry (1993) descreveram posteriormente que a porção distal do trato intestinal parecia não oferecer riscos de portar o microorganismo. Ribeiro et al. (2001) também não obtiveram sucesso no isolamento bacteriano em fezes de caprinos naturalmente infectados.

## CONCLUSÃO

A PCR em tempo real não apresentou confiabilidade considerável no diagnóstico da linfadenite caseosa quando aplicada diretamente em amostras de conteúdo de abscesso. A presença do *C. pseudotuberculosis* em amostras de leite e sangue evidenciam a importância destes componentes no processo de transmissão da doença, mas o uso do teste molecular nestes espécimes não demonstrou boa reprodutibilidade para ser empregada como ferramenta diagnóstica em animais portadores inaparentes. Adicionalmente, o material fecal de animais infectados não foi considerado relevante na disseminação e para diagnóstico da doença.

Finalmente, considerando que 88,9% das criações de caprinos leiteiros examinados em Pernambuco apresentavam ao menos um caprino sintomático e que não se dispõe de um protocolo diagnóstico confiável para a identificação de animais portadores inaparentes da infecção, apesar dos resultados preliminares da PCR em tempo real na caracterização da eliminação do agente pelas vias láctea e hematogena, o planejamento adequado de medidas para o diagnóstico precoce e o controle da linfadenite caseosa são extremamente necessárias no Estado, visando potencializar a cadeia produtiva de caprinos e seus produtos derivados.

## AGRADECIMENTOS

À equipe técnica do Laboratório Clínico de Grandes Animais, de Bacterioses e de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, em especial ao Prof. Roberto Soares de Castro, por conceder a utilização da infra-estrutura necessária à realização dos ensaios biomoleculares.

## REFERÊNCIAS

Abreu S.R.O., Motta R.A., Rosinha G.M.S., Forner O., Pinheiro Junior J.W., Pereira R.R.B., Castro R.S., Elisei C., Soares C.O., Araújo F.R. & Madureira R.C. 2008. Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, 28:481-487.

- Alves E.A. & Guimarães A.C.R. 2009. Cultivo celular. In: Molinaro E.M., Caputo L.F.G. & Amendoeira M.R.R. (Orgs), Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 5:215-253.
- Alves F.S.F. & Pinheiro R.R. 1997. Linfadenite caseosa: Recomendações e medidas profiláticas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Comunicado Técnico, 33:1-4.
- An S.F. & Fleming K.A. 1991. Removal of inhibitors of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin-wax embedded tissues. J. Clin. Pathol., 44:924.
- Anderson D.E., Rings D.M. & Pugh, D.G. 2005. Enfermidades do Sistema Tegumentar. In: Pugh D.G. 2005 (Ed), Clínica de ovinos e caprinos. Roca, São Paulo. p.232-233.
- Andrade J.S.L., Azevedo S.S., Teles J.A.A., Higino S.S.S. & Azevedo E.O. 2012. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. Pesq. Vet. Bras. 32(2):116-120.
- Arsenault J., Dubreuil P., Girard C., Simard C. & Bélanger D. 2003. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). Prev. Vet. Med., 59:125-137.
- Ashfaq M.K. & Campbell S.G. 1979. A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. Vet. Med./ Small Anim. Clin., 1161-1165.
- Baird G.J. & Fontaine M.C. 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. J. Comp. Pathol., 137:179-210.
- Baird G. 2003. Current perspectives on caseous lymphadenitis. In Practice 25: 62-68.
- Baird G.J. 2006. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. Vet. Rec., 159:500.
- Barcellos J.O.J., Prates E.R., Silva M.D., Montanholi Y.R. & Wunsch C. 2002. Sistemas pecuários no sul do Brasil – “zona campos”: tecnologias e perspectivas. Anais

XIX Reunión de grupo técnico em forrageras del conor sul – Zona campos. Mercedes, Argentina, 10-15. (Resumo)

Bazzo M.L., Ferreira L.A.P., Silva R.M., Scheffer M., Chagas M., Severino J.L., Rovaris D.B., Nauck R. & Ferreira P.C.P. 2004. Relação entre a qualidade de amostras de escarro e o diagnóstico de micobacterioses por PCR. Arq. Catarin. Med. 33(3).

Belchior S.E., Gallardo A., Abalos A., Jodor N. & Jensen, O. 2006. Actualizacion sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. Vet. Arg., 23:258-278.

Ben Said M.S., Ben Maitigue H., Benzarti M., Messadi L., Rejeb A & Amara A. 2002. Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis. Arch. Inst. Pasteur Tunis, 79:51-57.

Benham C.L., Seaman A. & Woodbine M. 1962. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. Bureau of Animal Health, 32:645-657.

Bento A.H.L. & Zoni M.S.F. 1986. Observações sobre a ocorrência da linfadenite caseosa em cabras confinadas no estado do Rio de Janeiro. Rev. Bras. Med. Vet., Rio de Janeiro, 5(8):136-138.

Brasil. 2008. Relatório Setorial: indústria do couro, calçados e artefatos. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, Brasília, DF.

Brasil. 2011. Leite de cabra entra no cardápio da merenda escolar no sertão alagoano. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Agrário do Estado de Alagoas, Maceió, AL.

Burrell D.H. 1978. Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. Res. Vet. Sci. 24:269-276.

Carter G.R. 1990. Diagnostics procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5 ed. California: Academic press Inc.

Carter G.R., Claus W. & Rikihisa Y. 1986. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 3<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 261p.

- Carvalho R.B. 2011. Potencialidades dos mercados para os produtos derivados de caprinos e ovinos. Disponível em <<http://www.capritec.com.br/art040521.htm>> Acesso em 10/08/11.
- Çetinkaya B., Karahan M., Atil E., Kalin R., Baere T.D. & Vaneechoutte M. 2002. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet. Microbiol.* 88:75-83.
- Corrêa W.M. & Corrêa C.N.M. 1992. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2ª ed. Medsi, Rio de Janeiro. p.219-240.
- Costa L.F.M. 2002. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. *Rev. Ciênc. Med. Biol., Salvador*, 1:105-115.
- Cubero Pablo M.J., Real Valcárcel F., González Candela M. & Leónviscaíno L. 2002. Epidemiologia de la pseudotuberculosis. *Rev. Ovis*.
- Dennis S.M. & Bamford V.W. 1966. The role of *Corynebacteria* in perinatal lamb mortality. *Vet. Record*, 79:105-108.
- Ellis T.M., Sutherland S.S., Wilkinson F.C., Mercy A.R. & Paton M.W. 1987. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. *Aust. Vet. J.*, 64:261-263.
- Fontaine M.C. & Baird G.J. 2008. Caseous lymphadenitis. *Small Ruminant Res.*, 76:42-48.
- Fontaine M.C., Baird G., Connor K.M., Rudge K., Sales J., Donachie W. 2006. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24:5986-5996.
- Gasparoto S.W. 1996. Caseous lymphadenitis. *Goat Rancher Magazine*.
- Hagan W.A., Bruner D.W. & Timoney J.F. 1988. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: *Microbiology and infectious diseases of domestic animals*. 8<sup>th</sup> ed. Comstock Publishing, Ithaca.



- Join-Lambert O.F., Ouache M., Canioni D., Beretti J.L., Blanche S., Berche P. & Kayal S. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25:848-851.
- Kaba J., Kutschke L. & Gerlach G.F. 2001. Developmant of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Vet. Microbiol.*, 26:155-163.
- Opel K.L., Chung D. & McCord B.R. 2009. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J. Forensic. Sci.*, 55(1):25-33.
- Langenegger H. & Langenegger J. 1991. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, 11:1-7.
- Lima M.C.L. 1980. Prevalência da linfadenite caseosa dos caprinos no município de Casa Nova – Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA. 30p.
- Lira S.A. 2004. Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 196p.
- Malone F. 2005. Current and emerging flock health concerns. In: *Proceedings of Meetings of the British Society of Animal Science*. Antrim: Greenmount College.
- Marotti J., Galhardo A.P.M., Furuyama R.J., Pigozzo M.N., Campos T.N. & Laganá D.C. 2008. Amostragem em pesquisa clínica: Tamanho da amostra. *Rev. Odontol.* 20(2):186-194.
- Medeiros J.X.; Sano E.E. & Ribeiro J.B.L. 2005. Cenário mercadológico da ovinocultura. *Anais 4º Simpósio Mineiro de Ovinocultura*, Lavras, MG. (Resumo)
- Melo L.E.H., Silva T.I.B., Fernandes A.C.C., Baptista Filho L.C.F., Mota R.A. & Silva L.B.G. 2010. Monitoramento clínico-epidemiológico relacionado ao diagnóstico diferencial entre tuberculose caprina e linfadenite caseosa. *Anais Seminário nacional sobre brucelose e tuberculose animal*, Belo Horizonte, MG. (Resumo)

- Menzies P.I., Muckle C.A., Brogden K.A. & Robinson L. 1991. A field trial to evaluate a whole cell vaccine for the prevention of caseous lymphadenitis in sheep and goat flocks. *Canad. J. Vet. Res.*, 55:362-366.
- Meyer R., Carminati R., Cerqueira R.B., Vale V., Viegas S., Martinez T., Nascimento I., Schaer R., Silva J.A.H., Ribeiro M., Régis L., Paule B. & Freire S.M. 2002. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Rev. Cienc. Med. Biol., Salvador*, 1(1):42-48.
- Moller K., Agerholm J.S., Ahrens P., Jensen N.E. & Nielsen T.K. 2000. Abscess disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 47:55-62.
- Motta R.G., Cremasco A.C.M. & Ribeiro M.G. 2010. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. *Vet. Zootec.*, 17(2):200-213.
- Moura Costa M.D., Camara J.Q., Rocha J.V.N. & Martinez T.C.N. 1973. Linfadenite caseosa dos caprinos no estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. *Bol. Inst. Biol., Salvador*, 12(1):1-7.
- Muckle C.A. & Gyles C.L. 1982. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Can. J. Comp. Med.*, 46:206-208.
- Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C. & Tenover F.C. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7 ed., American Society for Microbiology: Washington, 846p.
- Nagy G. 1976. Caseous lymphadenitis in sheep methods of infection. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 47:197-199.
- Nozaki C.N., Faria M.A.R. & Machado T.N.M. 2000. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 67:187-189.
- Pacheco L.G.C., Pena R.R., Castro T.L.P., Dorella F.A., Bahia R.C., Carminati R., Frota M.N.L., Oliveira S.C., Meyer R., Alves F.S.F., Miyoshi A. & Azevedo V. 2007. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

- from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.*, 56:480–486.
- Paton M.W., Collett M.G., Pepin M. & Bath G.F. 2005. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Ed.). *Infectious Diseases of Livestock*, 3 ed. Cape Town: Oxford University Press Southern Africa. p.1917-1930.
- Paton M.W., Walker, S.B., Rose I.R. & Watt G.F. 2003. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.*, 81:91-95.
- Paule B.J.A, 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. 2003. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon production, IgG avidity and antigen recognition by western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96:129-39.
- Peel M.M., Palmer G.G., Stacpoole A.M. & Kerr T.G. 1997. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* 24(2):185-191.
- Pepin M., Paton M. & Hodgson A.L. 1994. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Cur. Top. Vet. Res.* 1:63-82.
- Pugh G.D. 2004. *Sheep and goat medicine*. New York: Elsevier.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 1770p.
- Ribeiro D. 2009. Análise comparativa de métodos de diagnóstico para linfadenite caseosa em ovinos sintomáticos e assintomáticos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de São Paulo, Araçatuba, SP.
- Ribeiro M.G., Dias Junior J.G., Paes A.C., Barbosa P.G., Nardi Junior G. & Listoni F.J.P. 2001. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium*

*pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. Arqs. Inst. Biológico. 68:23-8.

Riet-Correa F. Linfadenite caseosa. 2007. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. (Ed.). Doenças de Ruminantes e Eqüídeos. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, p.347-352.

Sampaio I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 221p.

Santa Rosa J., Johnson E.H., Alves F.S.F. & Santos F.L.F. 1989. Ocorrência de abscesso hepático em caprinos. Pesq. Agropec. Bras. 24(1):63-68.

Seddon H.R., Belschner H.G., Rose A.L. & Blumer C. 1929. Further observations on the method of infection in caseous lymphadenitis of sheep. Aust. Vet. J. 5:139.

Seyffert N., Guimarães A.S., Pacheco L.G.C., Portela R.W., Bastos B.L., Dorella F.A., Heinemann M.B., Lage A.P., Gouveia A.M.G., Meyer R., Miyoshi A. & Azevedo V. 2010. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Res. Vet. Sci., 88:50-55.

Silva M.U.D. & Silva A.E.D.F. 1982. Linfadenite caseosa em caprinos: observações clínicas de dois anos. Anais 18º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Porto Alegre, SC. (Resumo)

Silva T.I.B., Fernandes A.C.C., Araújo P.B., Vasco Neto H.L.S., Silva D.D., Cunha W.R.X., Silva E.R.R., Melo L.E.H., Santos N.V.M. & Silva F.F. 2009. Ocorrência de linfadenite caseosa em caprino jovem criado na mesorregião metropolitana do Recife. Anais IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, Recife, PE. (Resumo)

Smith P.B. 2003. Large animal internal medicine. 4 ed. St Louis: Mosby.

Smith M.C. & Sherman D.M. 1994. Subcutaneous swellings. In: Goat Medicine. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 46-49.

- Soloway R.D., Hansen K., Lyon D.L., Payne D.A. 1999. Inhibitors presents in blood do not inhibit PCR from buccal cell preparations: case report. *In vivo Attiki*, v.13, p.453.
- Songer J.G., Beckenbach K., Marshall M.M., Olson G.B. & Kelley L. 1988. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, 49:223–226.
- Souza M.F., Carvalho A.Q., Garino Junior F. & Riet-Correa F. 2011. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):224-230.
- Thrusfield M.V. 2004. *Epidemiologia Veterinária*. 2<sup>a</sup> ed. Roca, São Paulo. 556p.
- Unanian M.M., SILVA A.E.D.F. & PANT K.P. 1985. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid North-east Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, 17:57-62.
- Vale V., Freire S., Ribeiro M., Regis L., Bahia R., Carminati R., Paule B.J.A., Nascimento I. & Meyer R. 2003. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Rev. Ciênc. Med. Biol.*, Salvador, 2:192-200.
- Valli V.E.O. & Parry B.W. 1993. Caseous lymphadenitis. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds), *Pathology of Domestic Animals*, Vol. 3, 4<sup>th</sup> ed. Academic Press, San Diego. p.238-240.
- Victoria C., Silva A.V., Elias A.O. & Langoni H. 2005. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. *Arq. Ciênc. Vet. Zool.* 8(2):161-164.
- Walker B. 1996. Cheesy gland caseous lymphadenitis in sheep. Sydney: NSW Department of Primary Industries.
- Watson P.J. & Preece B.E. 2001. Report on 31 caseous lymphadenitis infected sheep farms in England and Wales. *Vet. Rec.*, 148:663-665.

Windsor P.A. & Eppleston J. 2006. Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *New Zeal. Vet. J.*, 54:237-241.

Windsor P.A. 2011. Control of Caseous Lymphadenitis. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.*, 27:193-202.

## QUADROS

**Quadro 1. Gene alvo, sequência de *primers* e comprimento do fragmento amplificado para o *Corynebacterium pseudotuberculosis***

Gene alvo	Sequência de <i>primers</i> 5' a 3'	Fragmento (pares de base)
PLD	D <sup>a</sup> – GGC GGT GGC GGA GTT GAA GGC GAT G	203
	R <sup>b</sup> – GCC GCG AGC GAG TCT GGG CGA TGT C	

<sup>a</sup> Direto, <sup>b</sup> reverso.

**Quadro 2. Distribuição corpórea dos abscessos em caprinos criados no Estado de Pernambuco**

Localização dos abscessos	Frequência absoluta	Frequência relativa
Articulação	1	1,4%
Região do costado	8	11,3%
Linfonodo parotídeo	3	4,2%
Linfonodo poplíteo	3	4,2%
Linfonodo pré-crural	7	9,9%
Linfonodo pré-escapular	15	21,1%
Linfonodo submandibular	27	38,0%
Linfonodo supra-mamário	7	9,9%
Total	71	100%

**Quadro 3. Resultado do isolamento bacteriológico e da PCR em tempo real na identificação do *C. pseudotuberculosis* em diferentes espécimes provenientes de caprinos criados no Estado de Pernambuco**

Amostras	Isolamento bacteriológico de abscesso	PCR em tempo real			
		Abscesso	Leite	Sangue	Fezes
1	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
7	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
8	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO
9	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
11	NEGATIVO	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
12	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
13	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
14	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO
15	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
16	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
17	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
18	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
19	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
20	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO
21	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
22	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
23	<b>POSITIVO</b>	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
24	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	<b>POSITIVO</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

**Quadro 4. Exemplos de inibidores da reação de PCR.**

Origem	Inibidores da reação de PCR
Abscesso	Íons de cálcio.
Amostras clínicas	Leite
	Íons de cálcio e proteinases.
	Fezes
	Sais biliares e polissacarídeos.
	Sangue
	Hemoglobina, lactoferrina e imunoglobulina G.
Colheita das amostras	Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), tubos de polipropileno e poliestireno.
Compostos encontrados no laboratório	Pó de luva, fenol, etanol, isopropanol e clorofórmio.



## FIGURAS

Figura 1. Isolamento bacteriológico do *C. pseudotuberculosis* em meio ágar sangue ovino a 5%.



Figura 2. Caprino com abscesso em região parotídea.



Figura 3. Caprino com cicatriz secundária à linfadenite caseosa.



Figura 4. Caprino jovem com abscesso em região xifóide.



Figura 5. Caprino com abscesso em linfonodo submandibular.



Figura 6. Resultado da PCR em tempo real para o gene PLD (*C. pseudotuberculosis*), demonstrando a amplificação do controle positivo e das amostras de conteúdo de abscesso e leite de caprino.

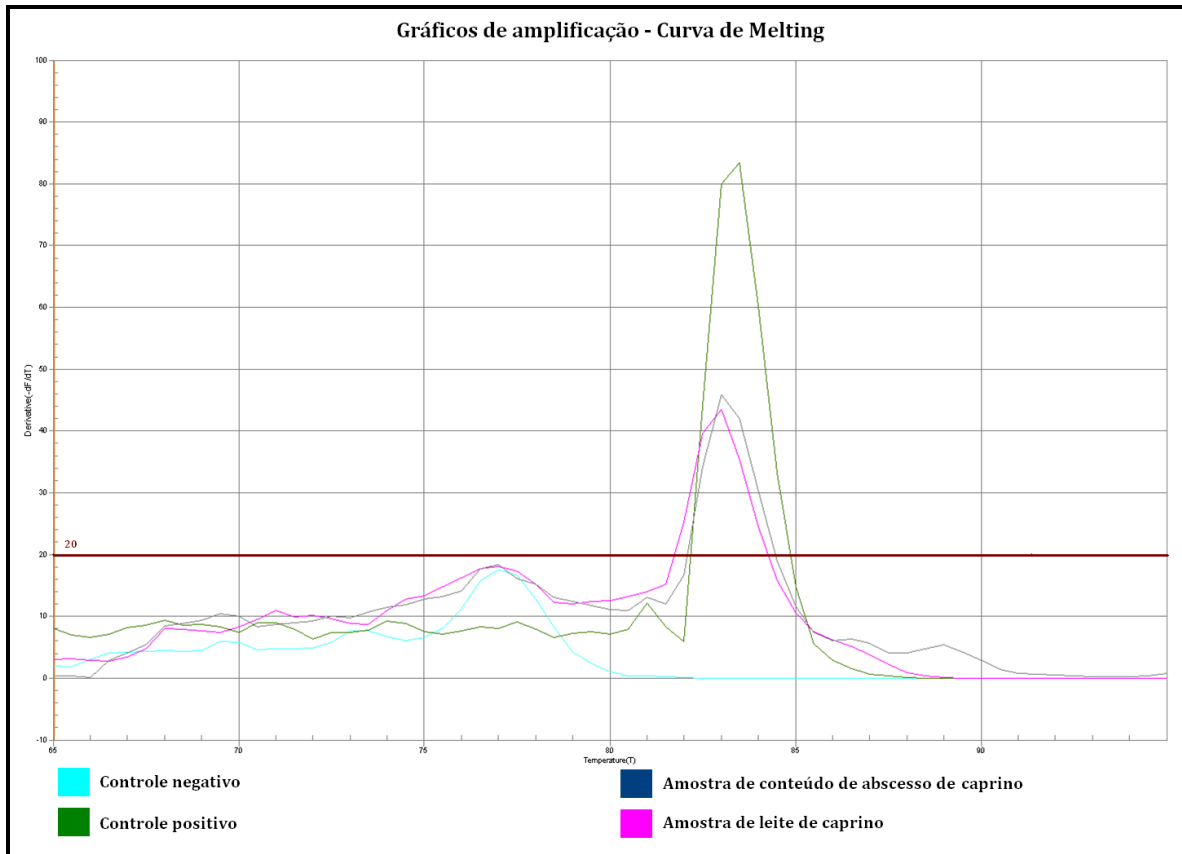


Figura 7. Resultado da PCR em tempo real para o gene PLD (*C. pseudotuberculosis*), demonstrando a amplificação do controle positivo e da amostra de sangue de caprino.

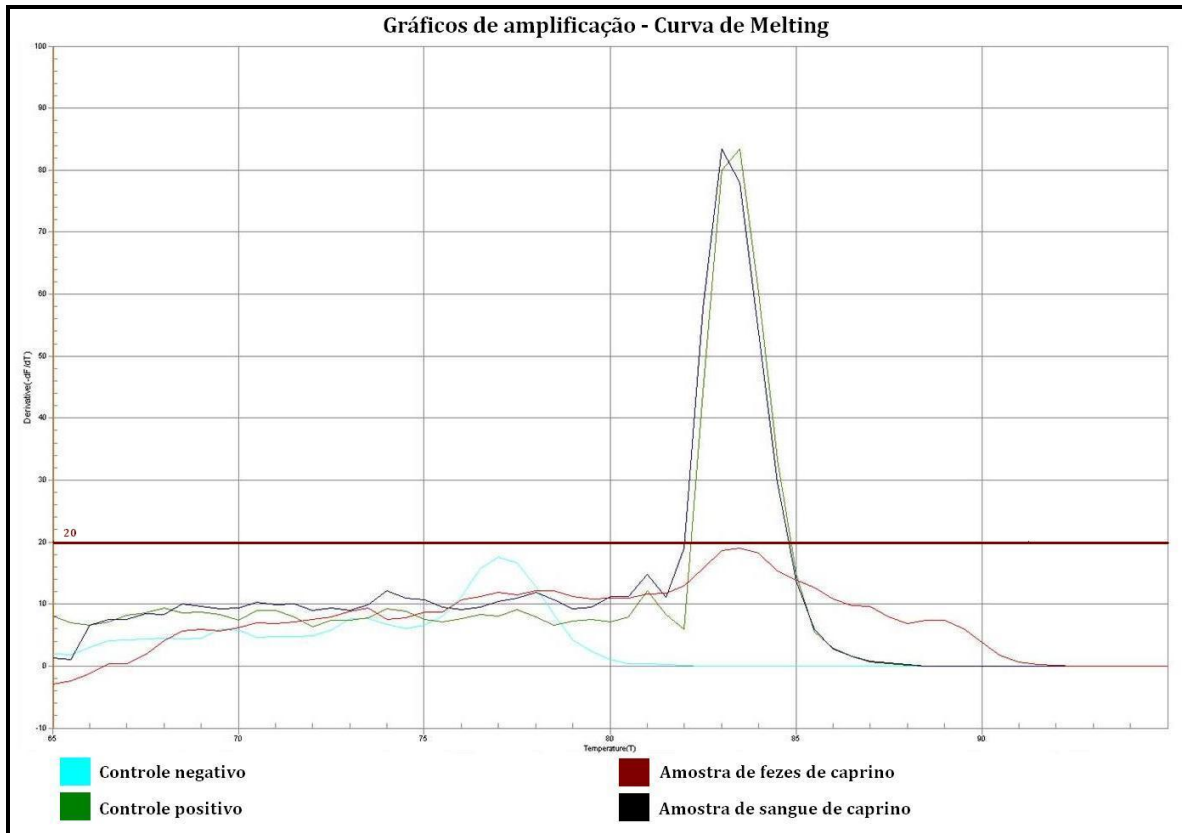


Figura 8. Abscesso em úbere de caprino.



# **ANEXO**

## FIGURAS

Figura 1. Rebanho de caprinos leiteiros acometidos pela linfadenite caseosa no Estado de Pernambuco.



Figura 2. Palpação de linfonodos superficiais em caprino.



Figura 3. Colheita de sangue da veia jugular externa de caprino.



Figura 4. Colheita de leite de caprino.



Figura 5. Colheita de fezes de caprino.



Figura 6. Punção aspirativa por agulha fina de abscessos em região parotídea (esq.) e mamária (dir.) de caprinos.





Figura 7. Extração de DNA de espécimes de caprinos: Maceração da amostra (A), adição das soluções (B), incubação em banho-maria (C) e eluição do material genético (D).



Figura 8. Preparação do mix para as reações (A) e aparelho termociclador para realização da PCR em tempo real (B).



Figura 9. Articulação de caprino acometido pela linfadenite caseosa.



Figura 10. Conteúdo do abscesso de caprino acometido pela linfadenite caseosa.



Figura 11. Colônias cultivadas em ágar sangue ovino a 5%, características de *C. pseudotuberculosis*.



Figura 12. Cocobacilos *Gram* positivos, característicos de *C. pseudotuberculosis*, observados por microscopia óptica. Aumento de 100X.

