



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Maria da Conceição Aquino de Sá

**Incidência de linfadenite caseosa em caprinos e ovinos vivos e
abatidos no Vale do São Francisco**

Petrolina – PE
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Maria da Conceição Aquino de Sá

**Incidência de linfadenite caseosa em caprinos e ovinos vivos e
abatidos no Vale do São Francisco**

Trabalho apresentado a Universidade
Federal do Vale do São Francisco –
UNIVASF, Campus Ciências Agrárias,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da
Costa
Co-orientadora: Dra. Josir Laine Aparecida
Veschi

Petrolina - PE

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria da Conceição Aquino de Sá

Incidência de linfadenite caseosa em caprinos e ovinos vivos e abatidos no Vale do São Francisco

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em **Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.**

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Petrolina, 27 de janeiro de 2012

Dedicatória:

A minha filha, tudo na minha vida...

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida.

Ao Professor Dr. Mateus Matuzzi da Costa, que sempre me orientou, responsável pelo meu crescimento, muito obrigada pela confiança depositada e pelo carinho que sempre me tratou.

À Dra. Josir Veschi, pelos conselhos e co orientação.

A minha filha, grande companheira de trabalho, presença constante na minha vida, razão do meu ser.

Aos meus familiares, Mamãe, Papai, Mabel e minha sobrinha Emily, pelo apoio.

À Professora Adriana, pelo incentivo e pela amizade.

À Carina, Gisele e Rodolfo, anjos sem asas na minha vida...

À Evandro e Grace, tudo começou com vocês, muito obrigada.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Univasf, amigos essenciais no desenvolvimento do experimento, Aldo, Alessandra, Alexsandra, Alan, André, Chirles, Clerísson, Daniela, , Gilvan, Isabela, Jamila, Jammille, Jarbas, Jeniffer, Jonieudes, Juciene, Junior, Layse, Keidy, Leandro, Luciana, Manoel, Marcelo, Mariana, Marielly, Marisa, Márcia, Milka, Naedja, Nara, Noelly, Renan, Renata, Renata Souza, Rodolfo, Taty, Samira, Valdenice, Wellington, por tudo, desde a lavagem de vidrarias até as boas madrugadas no Abatedouro.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e a todos os professores e colegas, em especial Carla e Renilde, companheiras eternas.

À FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ.

Aos funcionários do *Campus* de Ciências Agrárias da UNIVASF.

Ao Sr. Gonçalo e principalmente aos ovinos, por doarem o seu sangue para a pesquisa.

Epígrafe:

Quando a ideia de um repouso surgir o adiamento da obra
que te cabe fazer, persiste com a disciplina mais um
pouco e o dever bem cumprido ser nos à alegria perene.
André Luiz

RESUMO

A situação da linfadenite caseosa (LC) no Vale do São Francisco é até então desconhecida, por isso é necessário buscar informações sobre a doença. Este estudo teve por objetivo caracterizar a prevalência da LC em vinte propriedades de Petrolina-PE e região, bem como de animais abatidos nos abatedouros de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). Também objetivou verificar por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a presença dos genes de virulência da fosfolipase D (*pld*) e do sistema de transporte de ferro *fagA*, B, C e D. Além disto, o presente estudo também objetivou caracterizar o perfil de sensibilidade de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a desinfetantes e antibióticos, relacionando estes perfis com a produção de biofilme. Das 108 amostras coletadas em propriedades, 65 foram oriundas de ovinos e 43 de caprinos. Nos abatedouros, obtiveram-se 449 amostras de abscessos tanto de linfonodos superficiais, como de linfonodos internos e vísceras. Todas as amostras coletadas foram submetidas a cultivo em ágar sangue em aerobiose por 48h. Decorrido este tempo, colônias suspeitas foram identificadas por suas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais. A partir daí, 168 isolados representativos foram submetidos a PCR para averiguação da presença dos genes de virulência. Para os testes de sensibilidade e produção de biofilme foram avaliados 398 isolados, que após confirmação da viabilidade e pureza foram submetidos ao teste de Kirb Bauer modificado. A habilidade dos isolados em produzir biofilme foi avaliada pelo teste de aderência seguida da coloração por violeta de genciana. Das amostras coletadas nas propriedades (n=81) 75% apresentaram cultura bacteriológica positiva para *C. pseudotuberculosis*. Foram isolados *C. pseudotuberculosis* de todas as propriedades avaliadas. O mesmo aconteceu com as amostras de abatedouro. Das amostras coletadas no abatedouro (n=449), 54,10% foram de linfonodo pré-escapular e 26,50% de vísceras, mostrando que existe uma alta incidência da forma subclínica. Os genes *fagA*, *fagB* e *pld* foram detectados em todos os isolados. O gene *fagC* e D foram encontrados em 167 (99,40%) e 160 (95,23%) isolados, respectivamente. A combinação de todos os fatores esteve presente em 160 (95,23%) dos isolados estudados. Com relação aos antimicrobianos a sensibilidade obtida foi de 100% para florfenicol, 100% para tetraciclina, 99,25% para enrofloxacin, 99,25% para ciprofloxacina, 99,25% para lincomicina, 98,99% para cefalotina, 98,74% para norfloxacina, 98,74% para sulfazotrim, 97,74% para gentamicina, 94,22% para ampicilina, 91,71% para amoxicilina, 91,21% para penicilina G, 89,19% para neomicina e 0% para novobiocina. Os desinfetantes foram efetivos para os isolados em 100% para o formol e clorexidina, 99,50% para a amônia quaternária, 87,69% para o cloro e 81,41% para o iodo. Setenta e cinco por cento dos isolados foram fracos ou não produtores de biofilme, o que pode justificar os perfis de sensibilidade obtidos. Os dados apresentados indicam a grande distribuição do *C. pseudotuberculosis* na região de estudo, bem como a importância da sensibilização dos produtores para a adoção das medidas de controle para a LC.

Palavras chave: antimicrobianos, caprino-ovinocultura, desinfetante, virulência

ABSTRACT

The situation of caseous lymphadenitis (CL) in the São Francisco valley is unknown, so it is necessary to seek information about the disease. This study aimed to characterize the prevalence of LC in twenty properties of Petrolina-PE and region as well as from animals slaughtered in slaughterhouses of Petrolina (PE) and Juazeiro (BA). It also aimed to verify through the Polymerase Chain Reaction (PCR), the presence of phospholipase D (*pld*) and of the iron transport system *fagA*, B, C and D virulence genes. In addition, this study also aimed to characterize the sensitivity of isolates of *C. pseudotuberculosis* to disinfectants and antibiotics, and relate these profiles with the production of biofilm. Of the 108 samples collected from farms, 65 were derived from sheep and 43 goats. In slaughterhouses, we obtained 449 samples from abscesses of both superficial lymph nodes, as internal lymph nodes and viscera. All samples were submitted to culture on blood agar in aerobically conditions for 48 hours. After this time, suspected colonies were identified by their morphological, biochemical and staining features. So, 168 representative isolates were subjected to PCR to investigate the presence of virulence genes. For susceptibility testing and biofilm production were evaluated 398 isolates, which after confirmation of the viability and purity were tested using the modified Kirb Bauer. The ability of isolates to produce biofilms was assessed by adherence followed by staining with gentian violet. Among the samples collected in the farms (n=81), 75% had positive bacterial culture for *C. pseudotuberculosis*. Of all the evaluated properties was isolated *C. pseudotuberculosis*. The same happened to all the samples of slaughter. Of the samples collected at the slaughterhouse (n=449), 54.10% of these were pre-scapular lymphnode and visceral 26.50%, showing that there is a high incidence of subclinical form. *fagA*, *fagB* and *pld* genes were detected in all isolates. The *fagC* and D genes were found in 167(99.40%) and 160 (95.23%) isolates, respectively. The combination of all factors was present in 160 (95.23%) isolates studied. With respect to antimicrobial sensitivity obtained was 100% for florfenicol, 100% to tetracycline, 99.25% for enrofloxacin, ciprofloxacin for 99.25%, 99.25% for lincomycin, cephalothin to 98.99%, 98.74% to norfloxacin, 98.74% for sulfazotrim, 97.74% to gentamicin, 94.22% for ampicillin, 91.71% for amoxicillin, 91.21% for penicillin G, 89.19% to neomycin and 0% for novobiocin. The disinfectants were effective for the isolates in 100% for formaldehyde and chlorhexidine, 99.50% for the quaternary ammonium, 87.69% for chlorine and 81.41% to iodine. Seventy-five percent of isolates were weak or non-biofilm producers, which may explain the sensitivity profiles obtained. The data presented show the wide distribution of *C. pseudotuberculosis* in the study region, as well as the importance of awareness among producers for the adoption of control measures for the LC.

Keywords: antimicrobial, goat and sheep industry, disinfectants, virulence

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1: Padrão de tamanho da PCR para os genes fosfolipase D, *fagA*, B,C e D de isolados de *C. pseudotuberculosis*.....46

Capítulo 3

Figura 1: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de *C. pseudotuberculosis* obtidos de casos de linfadenite caseosa.....58

Figura 2: Perfil de sensibilidade a desinfetantes de amostras de *C. pseudotuberculosis* obtidos de casos de linfadenite caseosa.....59

Figura 3: Presença de biofilmes em amostras de *C. pseudotuberculosis*.....60

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Amostras de abscessos coletados e respectivos isolamentos de <i>C. pseudotuberculosis</i> de Propriedades de caprinos e ovinos no Vale do São Francisco.....	32
---	----

Tabela 2: Abscessos coletados em caprinos e ovinos nos Abatedouros de Petrolina-PE e Juazeiro-BA.....	33
--	----

Capítulo 2

Tabela 1. Relação dos iniciadores utilizados para detecção dos genes de virulência.....	45
--	----

Tabela 2. Condições de reação da PCR para os genes de virulência estudados.....	46
--	----

Tabela 3. Combinações dos genes de virulência nos isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i>	47
---	----

Capítulo 3

Tabela 1. Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos e desinfetantes de acordo com a produção de biofilme nos isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i> obtidos de caprinos e ovinos.....	60
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LC		Linfadenite caseosa
PE		Pernambuco
BA		Bahia
IBGE		Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PLD		Fosfolipase D
ATP		Adenosina Trifosfato
<i>fagA</i>		Proteína Integral de Membrana
<i>fagB</i>		Transportador de enterobactina de ferro
<i>fagC</i>		ATP-proteína de ligação da membrana
<i>fagD</i>		Sideróforos –proteína de ligação de ferro
PAI		Ilhas de Patogenicidade
ELISA		Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
DNA		Ácido desoxirribonucléico
RNA		Ácido Ribonucléico
PCR		Reação em cadeia da Polimerase
RNAr		RNA ribossômico
DNAr		DNA Ribossômico
rpoB		Gene codificador da subunidade beta da RNA polimerase
mPCR		multiplex-PCR
CAMP		Christie, Atkins e Munch-Peterson
CAAF		Citologia apurativa com agulha fina
UNIVASF		Universidade Federal do Vale do São Francisco
DNAse		desoxirribonuclease
P.S.N.C		Projeto Senador Nilo Coelho
NE		Nordeste
FACEPE		Fundação de amparo e pesquisa de Pernambuco
CNPq		Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
TSA		Agar triptose de soja
pb		par de bases
UV		Ultravioleta
Kcl		Cloreto de potássio

Mg ₂		Magnésio
MgCl ₂		Cloreto de Magnésio
pH		Potencial hidrogeniônico
CLSI		Clinical and Laboratory Standards Institute
BHI		Brain Heart Infusion Broth
TSB		Caldo triptose de soja
DO		Densidade Óptica
IRMA		Índice de resistência múltipla

LISTA DE SÍMBOLOS

%		Porcentagem
°C		Graus Celsius
h		hora
β		Beta
n=		número
n °		número
mM		Milimolar
μ L		Microlitro
μ m		Micrometro
μ g		Micrograma
nm		Nanometro
M		mol

SUMÁRIO

	RESUMO.....	6
	ABSTRACT.....	7
	LISTA DE FIGURAS.....	8
	LISTA DE TABELAS.....	9
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
	LISTA DE SIMBOLOS.....	12
1.	Introdução Geral.....	15
2.	Referencial Teórico.....	16
2.1	Importância econômica da criação de caprinos e ovinos.....	16
2.2	Linfadenite caseosa.....	18
2.2.1	Etiologia e aspectos epidemiológicos.....	18
2.2.2	Impacto econômico da linfadenite caseosa.....	20
2.2.3	Patogenia.....	20
2.2.4	Sinais clínicos.....	22
2.2.5	Diagnóstico.....	23
2.2.6	Controle e profilaxia.....	24
2.2.7	Potencial zoonótico.....	25
3.	Artigos científicos.....	27
	Artigo 1.....	27
	RESUMO.....	27
	ABSTRACT.....	28
1.	INTRODUÇÃO.....	29
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1	Coleta de amostras.....	30
2.2	Isolamento e identificação bacteriana.....	31
3.	RESULTADOS.....	31
4.	DISCUSSÃO.....	34
5.	CONCLUSÃO.....	36
	AGRADECIMENTOS.....	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
	Artigo 2.....	40

	RESUMO.....	40
	ABSTRACT.....	41
1.	INTRODUÇÃO.....	42
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1	Local.....	43
2.2	Isolados bacterianos.....	43
2.3	Caracterização molecular dos isolados.....	44
3.	RESULTADOS.....	46
4.	DISCUSSÃO.....	47
5.	CONCLUSÃO.....	49
	AGRADECIMENTOS.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
	Artigo 3.....	52
	RESUMO.....	52
	ABSTRACT.....	53
1.	INTRODUÇÃO.....	54
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1	Local.....	55
2.2	Isolados bacterianos.....	55
2.3	Teste de sensibilidade as drogas antimicrobianas.....	55
2.4	Teste de sensibilidade a desinfetantes.....	56
2.5	Produção de biofilme.....	57
3.	RESULTADOS.....	58
4.	DISCUSSÃO.....	61
5.	CONCLUSÃO.....	63
	AGRADECIMENTOS.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1. Introdução Geral

A caprino-ovinocultura é uma atividade existente em vários países, principalmente em regiões semiáridas, que apresentam características bem peculiares, como a falta de adoção de tecnologias (SAMPAIO et al., 2009).

O Brasil dispõe de um efetivo de 9.355.220 caprinos e 16.628.571 ovinos, sendo que no Nordeste, o rebanho de caprinos e ovinos é de 8.521.388 e 9.371.905, respectivamente, com um maior rebanho no estado da Bahia, constando de 2.933.629 cabeças de ovinos e 3.020.849 caprinos. Já no estado de Pernambuco, a quantidade de ovinos é de 1.351.934 e 1.720.128 de caprinos, concentrando essas criações nas regiões do submédio São Francisco. Nesta região, os maiores rebanhos são encontrados nos municípios de Casa Nova, Uáua, Remanso, Juazeiro na Bahia e Floresta, Custódia, Sertânia e Petrolina em Pernambuco (IBGE, 2010).

No entanto, apesar do tamanho dos rebanhos nessas regiões, a sua produtividade ainda é baixa, devido a diversos fatores, como a irregularidade das chuvas, que afeta a produção de alimentos e como consequência aumenta a taxa de mortalidade, diminui o ganho de peso e a taxa de desfrute. Outro importante fator para a baixa produtividade dos caprinos e ovinos geralmente acontece por falta de adoção de tecnologias pelos produtores. Porém, nos últimos anos ressalta-se melhoria nos sistemas de criação dos pequenos ruminantes em função do aumento da demanda de carne e leite pelo mercado consumidor, sendo essa atividade importante para a comunidade rural, gerando maiores rendimentos, melhorando as condições econômicas dos pequenos produtores, assegurando sua subsistência (PEDROSA et al., 2003).

Dessa forma, a caprino-ovinocultura é a principal atividade agropecuária do sertão nordestino, representando uma contribuição para o crescimento econômico da região, aumentando a oferta de alimentos, pois embora ainda desorganizado, o setor de processamento de carnes e seus derivados está expandindo, assim o crescimento da cadeia produtiva já é visível, tendo como consequência uma melhor qualidade de vida dos seus integrantes (MORRIS, 2009; SAMPAIO et al., 2009).

As enfermidades causadas por vírus e bactérias ameaçam o desenvolvimento do agronegócio brasileiro. Estudo realizado por Pinheiro et al., (2000) no estado do

Ceará, mostrou que práticas sanitárias são precárias nas propriedades produtoras de caprinos independente do regime de criação, com uma mortalidade média de 22,8% e 4,6% para jovens e adultos, respectivamente. Por falta de adoção do manejo sanitário, várias doenças ocorrem e são apontadas como responsáveis pela redução da produtividade caprina e ovina, dentre as quais pode ser destacada a linfadenite caseosa (RIBEIRO et al.,1988). A LC é uma doença crônica, causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caracterizada por abscessos externos e internos. O animal apresenta enfraquecimento geral e baixa produção de carne e leite, chegando a causar a morte. Cerca de 90% das propriedades caprinas do sertão do estado de Pernambuco apresentam a forma clínica da doença (ALENCAR, 2010).

Uma vez que ainda não existe um tratamento eficaz, a prevenção até o momento é a melhor solução para o controle da doença. Nesse sentido a inspeção periódica do rebanho, o isolamento dos animais doentes, bem como a limpeza e desinfecção das instalações e fômites é de primordial importância para diminuir a disseminação da enfermidade.

Em função da significativa ocorrência da LC em propriedades de caprinos e ovinos, necessita-se estudar os fatores de virulência, que causam a enfermidade, bem como, o perfil de sensibilidade do agente etiológico aos desinfetantes e antibióticos e sua relação com estruturas, como o biofilme. Dessa forma, objetivou-se realizar uma avaliação da incidência de linfadenite caseosa em caprinos e ovinos na região do sub-médio São Francisco, além de realizar a caracterização fenotípica e genotípica, sensibilidade a antimicrobianos e desinfetantes, bem como verificar a habilidade na produção de biofilme dos isolados de *C. pseudotuberculosis*.

2. Referencial Teórico

2.1 Importância econômica da criação de caprinos e ovinos

O mercado internacional possui uma grande demanda por carne de caprinos e ovinos, principalmente nos países do Mediterrâneo e de origem muçulmana. Esta demanda é suprida principalmente por animais provenientes de países como Nova

Zelândia e Austrália. Dessa forma, tendências de mercado mostram que houve um ligeiro aumento no preço da carne, mas não o suficiente para melhorar o lucro (BOUTONNET, 1999; OLIVEIRA et al., 2008).

A produtividade dos sistemas de criação é de extrema importância e nesse contexto é necessário pesquisar formas de aumentar os índices produtivos da caprino-ovinocultura (BOUTONNET, 1999; MORRIS, 2009). Com o advento do consumo sustentável, produtos de origem animal serão atrativos ao consumidor, quando apresentarem nas suas especificações rastreabilidade e autenticidade do produto, que serão padronizados por selos de origem (BOYAZOGLU & MORAND-FEHR, 2011).

A produção de caprinos e ovinos representa um grande potencial socioeconômico para o agronegócio mundial, embora exista uma necessidade de incrementar as ações voltadas para esse setor, buscando uma maior diversificação nos produtos. Assim, é primordial adequar a cadeia de produção desde a propriedade até o consumidor, incorporando novas tecnologias, passando da exploração de subsistência para a comercialização organizada e apropriada para o mercado cada vez mais exigente por produtos de origem animal com melhor qualidade (BANDEIRA et al., 2007; ALVES et al., 2008).

Com o advento das mudanças no comércio internacional, proporcionando abertura dos mercados, a atividade agropecuária vem buscando aperfeiçoar as suas unidades produtivas, a fim de tornarem-se mais competitivas. Neste contexto, torna-se imperativo para a caprino-ovinocultura obter uma maior eficiência produtiva (VIDAL et al., 2006).

No que se refere ao manejo nas propriedades, existem dois sistemas de produção. Aquela dos grandes produtores, onde a tecnologia é utilizada para otimização das características genéticas e dos manejos sanitário, reprodutivo e nutricional dos rebanhos, onde os animais são mais produtivos. Contudo, a maior parte das propriedades permanece ainda a pecuária de subsistência, onde não existe escrituração zootécnica, entre outras, caracterizando-se pela pouca tecnificação (PINHEIRO et al., 2000).

Para a transição e consolidação da caprino-ovinocultura como agronegócio, é necessário buscar o ganho coletivo, mudar a mentalidade dos envolvidos nos diferentes segmentos da cadeia produtiva. Organizar, articular e integrar satisfatoriamente todos esses segmentos, objetivando fornecer ao consumidor final

uma carne de qualidade, com regularidade de oferta através da produção em escala a um preço competitivo (SAMPAIO et al., 2009).

2.2 Linfadenite caseosa

2.2.1 Etiologia e aspectos epidemiológicos

A linfadenite caseosa (LC), vulgarmente chamada de mal do caroço, possui ocorrência mundial, sendo descrita como uma doença infecto-contagiosa, crônica e subclínica em ovinos e caprinos. Enfermidades produzidas por estes micro-organismos são descritas em outras espécies animais, como a linfangite ulcerativa em equinos, abscessos superficiais em bovinos, suínos, cervos e animais de laboratório. O patógeno também foi isolado em búfalos, veados, porcos espinhos, lhamas e camelos (DORELLA et al., 2006).

Corynebacterium pseudotuberculosis, agente etiológico da LC, foi descrito pela primeira vez por Nocard em 1888, a partir de um caso de linfangite bovina. Sua nomenclatura atual foi adotada em 1948, na 6ª edição do *Bergey's Manual*. No entanto, a designação *Corynebacterium ovis* ainda é usada como sinônimo. *C. pseudotuberculosis* caracteriza-se como um bacilo Gram-positivo pleomórfico, pequeno, irregular, imóvel, anaeróbico, intracelular facultativo de macrófagos, fermentativo e não formador de esporos. Suas colônias possuem aspecto esbranquiçado e são rodeadas por zona estreita de hemólise completa, medindo 0,5 a 0,6 µm por 1 a 3 µm, podendo apresentar aspecto cocóide, de clavas ou bacilos, mostrando-se isolado ou formando grupamentos irregulares. Aparecem em esfregaços corados individualmente, em pares ou em paliçadas e em grupos angulares semelhantes a letras chinesas (HOLT et al., 1994; QUINN et al., 2005). *Corynebacterium* spp. faz parte do grupo dos actinomicetos, juntamente com outros gêneros como *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, possuindo características comuns, relacionadas a composição da parede celular, a qual contém peptidoglicanos, arabinogalactaneos e ácidos micólicos, além de uma alta proporção de guanina e citosina no genoma (DORELLA et al., 2006). A virulência neste micro-

organismo está ligada aos lipídeos de sua parede celular e a produção de uma exotoxina a fosfolipase D (pld). Essa enzima hidrolisa esfingomielina na membrana das células mamárias liberando colina. Nos estágios iniciais de infecção, ela aumenta a sobrevivência e a multiplicação do *C. pseudotuberculosis* (QUINN et al., 1994; MEYER et al., 2002, QUINN et al., 2005).

A classificação fenotípica de *C. pseudotuberculosis* é baseada nas características de cultivo e em provas bioquímicas. A bactéria é catalase e urease positivas, fermenta carboidratos sem a produção de gás (maltose, manose, glicose) e não fermenta a lactose. Não possui atividade proteolítica, portanto é incapaz de hidrolisar a gelatina ou digerir a caseína (QUINN et al., 1994; DORELLA et al., 2006).

A transmissão desta doença se dá no meio ambiente pelo contato direto entre animais saudáveis com portadores, principalmente no momento de ruptura do abscessos. Este exsudado fica na vegetação, nos alimentos, madeira e principalmente no solo, por até oito meses (SANTA ROSA, 1996).

Distribuída em grande parte do mundo, a LC é encontrada no Norte e América do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Europa, Ásia e África (ARSENAULT et al., 2003). Arsenault et al. (2003) realizaram um estudo para estimar a prevalência de algumas enfermidades que acometem caprinos e ovinos, em dois abatedouros em Quebec no Canadá. A prevalência estimada para esta enfermidade foi de 21%, sendo que os abscessos estavam presentes, em maior proporção, nos linfonodos da cavidade torácica. No Egito, estudo para determinar aspectos epidemiológicos associados à LC encontrou 33,23% e 10,74% de prevalência para ovinos e caprinos, respectivamente (AL-GAABARY, 2010). Com relação aos aspectos epidemiológicos, estudos realizados no Nordeste do Brasil têm-se observado que a LC é a doença de maior prevalência (PINHEIRO et al., 2000; VALE et al., 2003; ALENCAR et al., 2010; SOUZA et al., 2011).

Souza et al. (2011), observaram a prevalência e a distribuição de lesões da LC em ovinos no município de Mulungu (Paraíba) e encontraram 15,9% de lesões macroscópicas semelhantes à LC. Em estudo no sertão de Pernambuco, Alencar et al. (2010) visitaram 150 propriedades, observando a presença de abscessos cutâneos, sugestivos de LC em 92,5% das propriedades estudadas. No estado do Ceará, Pinheiro et al. (2000), analisaram 127 propriedades, verificando que a ocorrência de LC é de 66,9%.

2.2.2 Impacto econômico da Linfadenite Caseosa

A LC tem trazido uma série de prejuízos a caprino-ovinocultura mundial e brasileira com perdas significativas para a economia rural (MEYER et al., 2002; ARSENAULT et al., 2003; FONTAINE & BAIRD, 2008; GUIMARÃES et al., 2011). Caracterizada por formação de lesões necróticas encapsuladas caseosas, a LC tem causado grande impacto nos criatórios, além de provocar significativas perdas aos produtores de ovinos e caprinos em todos os países, sendo estas decorrentes dos prejuízos causados pela redução do rendimento da carne, lã, leite, pele, diminuição da eficiência reprodutiva, atraso no crescimento, menor ganho de peso, descarte precoce de animais e comercialização dos animais por valor inferior ao praticado no mercado (SOUZA et al., 2011). A LC é a principal causa de condenação de carcaças de ovinos em matadouros na Austrália (ARSENAULT et al., 2003).

A LC constitui um importante desafio para a caprino-ovinocultura, sendo necessária a implantação de medidas de biossegurança, importantes para o controle da doença, mantendo a sua prevalência em níveis aceitáveis (GUIMARÃES et al., 2011).

2.2.3 Patogenia

O mecanismo de desenvolvimento das lesões começa logo após a penetração do *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro geralmente através da mucosa oral, nasal e ocular, ou por meio de feridas na pele, onde o micro-organismo propaga-se rapidamente pelo sistema linfático até o linfonodo, onde produz a exotoxina, responsável pela formação do abscesso e infiltração contínua de células inflamatórias, aumentando a permeabilidade vascular. Assim, a doença pode ocorrer nos linfonodos, apresentando abscesso caseoso externo ou também manifestar-se na forma visceral, caracterizada por lesões internas principalmente nos linfonodos mediastinais, mas também podendo ocorrer no fígado, rins, coração,

medula espinhal, testículos, glândula mamária e via respiratória. Observa-se que lesões pulmonares são bastante comuns e podem apresentar-se como a principal fonte de contaminação no rebanho através da produção de aerossóis infectados (FONTAINE et. al., 2006, BAIRD & FONTAINE, 2007, FONTAINE & BAIRD, 2008).

Uma vez que a infecção tenha se estabelecido uma expansão gradual do linfonodo pode ocorrer e dependendo da sua localização, a ruptura pode ocorrer para extrair o conteúdo purulento. Inicialmente, o pus dentro dos abscessos é macio e semi-líquido, ao longo do tempo o material torna-se mais sólido, pela presença de pequenos nódulos de mineralização. Esses focos calcificados tendem a se formar em camadas, mostrando uma aparência de lesões lamelares (FONTAINE & BAIRD, 2008).

Dentre os fatores de virulência, a enzima Fosfolipase D é encontrada nas linhagens de *C. pseudotuberculosis*. Esta enzima possui ação de exotoxina glicoprotéica ou citotoxina capaz de hidrolisar a esfingomielina, enfraquecendo as membranas celulares e favorecendo a infecção pelo micro-organismo. Além disso, provoca a ruptura dos eritrócitos ovinos nos meios de cultura. Aparentemente, *C. pseudotuberculosis* não sintetiza outra citolisina com efeito hemolítico (QUINN et al., 1994). Muitos estudos específicos das vias de fosfolipase foram realizados com o *C. pseudotuberculosis*, a fosfolipase D é a mais estudada, sendo um fator de virulência importante para a patogenicidade do agente (HODGSON et al., 1999).

Dorella et al., (2006) verificou que a Fosfolipase D (pld), aumenta a permeabilidade vascular e constitui um fator piogênico estável que atrai leucócitos e a presença de lipídios na superfície. Os lipídios permitem a sobrevivência das bactérias dentro das células fagocíticas do hospedeiro, como também são responsáveis pela disseminação da bactéria da infecção primária, que começa com inflamação local, atingindo os linfonodos regionais e formação de abscessos.

Os genes o *fagA* (proteína integral de membrana), o *fagB* (transportador de enterobactina de ferro), o *fagC* (ATP-proteína de ligação da membrana citoplasmática) e *fagD* (Sideróforos-proteína de ligação de ferro), operon envolvido em sistemas de absorção de ferro bacterianas foram identificados imediatamente a jusante do gene *pld*. Embora estes genes não sejam bem expressos *in vitro*, a expressão *in vivo* parece contribuir para a virulência de *C. pseudotuberculosis*, principalmente em caprinos (PEEL et al., 1997; BILLINGTON et al., 2002).

Atualmente, o genoma de duas linhagens do *C. pseudotuberculosis* foi sequenciado pela rede Genômica de Minas Gerais e Proteômica do Pará. Esses dados vão ajudar a identificar alvos específicos para o diagnóstico, como também desenvolver vacinas e medicamentos (RUIZ et al., 2011).

O estudo das ilhas de patogenicidade (PAI) pode auxiliar na identificação de fatores de virulência bacteriana, pois sua presença em bactérias patogênicas indica altas concentrações de genes de virulência, os quais codificam mecanismos de adesão, invasão, colonização e proliferação no hospedeiro além da evasão do sistema imunológico. O fato das ilhas de patogenicidade serem transmitidas horizontalmente indica que os fatores de virulência podem contribuir para o aumento da adaptabilidade das cepas em diferentes hospedeiros. Esta característica foi demonstrada pela descoberta de genes com funções associadas à absorção de ferro, carbono e Magnésio, uma vez que esta absorção aumenta a sobrevivência em condições de estresse (RUIZ et al., 2011).

2.2.4 Sinais clínicos

A LC é marcada por um processo inflamatório nos linfonodos, caracterizado pela formação de abscessos com conteúdo purulento, de aspecto caseoso e amarelado. A doença se inicia com o aumento do volume dos linfonodos, que com a evolução, tornam-se flutuantes. Os linfonodos acometidos com maior frequência são os pré-parotídeos e pré-escapulares, podendo ocorrer abscessos em linfonodos internos como os bronquiais, mediastínicos e nos pulmões, causando quadros respiratórios como tosse crônica e nos mesentéricos, determinando o emagrecimento progressivo do animal (SANTA ROSA, 1996; RIBEIRO, 1997).

Nos casos crônicos com lesões viscerais, o animal apresenta anemia e hipoproteinemia. Estes abscessos podem ser localizados em qualquer sistema do organismo. A forma visceral da doença é a que possui maior gravidade, visto que o diagnóstico clínico é muito difícil e ela pode levar à debilidade do animal,

disseminação de abscessos no organismo, condenação de vísceras e carcaça e, até mesmo, morte de animais (SANTA ROSA, 1996).

2.2.5 Diagnóstico

Para o diagnóstico é necessário identificar os animais com presença clínica da linfadenite caseosa, realizando a palpação dos linfonodos externos, sendo necessário isolar os animais positivos. Após isolamento dos animais, coleta-se o exsudado para cultivo da amostra em laboratório (BAIRD & FONTAINE, 2007).

O cultivo e isolamento do agente constitui a principal ferramenta no diagnóstico da LC em pequenos ruminantes. Este é realizado com ágar base sangue ovino a 8%, seguido da incubação por 48h a 37°C, em aerobiose. Após o crescimento microbiano, pequenas colônias brancas secas, friáveis e cercadas por uma zona de β -hemólise são características do *C. pseudotuberculosis*. Na coloração de Gram são observados cocos bacilos gram positivos. A identificação do *C. pseudotuberculosis* é geralmente realizada por meio de testes bioquímicos, sendo observada a produção de catalase e reações positivas nos testes de glicose, frutose, galactose, manose, maltose e uréia e reações negativas nos testes de redução do nitrato e esculina (HOLT et al., 1994; QUINN et al., 1994). Um importante teste para confirmação do agente é o de CAMP reverso, onde acontece uma ação inibitória da fosfolipase D sobre a β -hemolisina do *Staphylococcus aureus* (COSTA 2002; QUINN et al., 2005)

A punção aspirativa com agulha fina é muito útil e a citologia aspirativa pode ser usada como método diagnóstico (RIBEIRO et al., 2001). Para Al-Gaabary et al. (2010), o exame histopatológico dos linfonodos permite o diagnóstico da doença. Esta metodologia é muito importante para o diagnóstico da forma visceral. Souza et al. (2011) descrevem como característico da LC lesões histológicas, como uma área de necrose central composta de restos celulares.

Alguns testes sorológicos são utilizados no diagnóstico do *C. pseudotuberculosis* baseados em técnicas de imunofluorescência indireta,

microaglutinação, imunodifusão em gel de ágar, *western blotting*, fixação de complemento, hemaglutinação indireta e ELISA. Este último teste usa componentes da parede celular e a fosfolipase D purificada, para detectar o patógeno no animal, com sensibilidade e alta especificidade. Além disto, o teste de ELISA pode detectar a infecção em animais nos estágios iniciais da doença, antes que os abscessos fiquem evidentes, e mesmo nos animais sem sinais clínicos (LANGENEGGER & LANGENEGGER, 1991; BAIRD & FONTAINE, 2007; BINNS et al., 2007).

Técnicas moleculares podem ser utilizadas para o diagnóstico da LC. A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma alternativa aos métodos convencionais de diagnóstico, sendo mais específico. O uso de métodos moleculares para análise de sequências do gene RNAr 16S (DNAr) tem mostrado uma importante ferramenta para determinar o grau de parentesco do gênero *Corynebacterium* (KHAMIS et al., 2005). Porém para *C. pseudotuberculosis*, essa metodologia é de difícil análise, pois as sequências do rRNA 16S não diferem este do *Corynebacterium ulcerans* (RIEGEL et al., 1995). Çetinkaya et al. (2002) desenvolveram um ensaio de PCR baseado no gene 16S rDNA, para identificar a prevalência do *C. pseudotuberculosis*, porém este estudo apresentou algumas limitações, pois dependia do cultivo bacteriano, e esta técnica não era específica o suficiente para distinguir o *C. pseudotuberculosis* do *C. ulcerans*. O gene *rpoB* (gene codificador da subunidade beta da RNA polimerase), pode ser uma alternativa para diferenciar as espécies (KHAMIS et al., 2004).

Pacheco et al. (2007) desenvolveram um ensaio de PCR-*multiplex* (mPCR) que amplifica, simultaneamente, três genes específicos do *C. pseudotuberculosis*: 16S rDNA (RNA ribossômico 16S), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), e *pld* (exotoxina fosfolipase D), onde facilita o diagnóstico diferenciando o *C. pseudotuberculosis* de outros micro-organismos presentes nos abscessos, principalmente *C. ulcerans*.

2.2.6 Controle e profilaxia

A implantação de programas de erradicação para LC tem diversas dificuldades, pois os animais subclínicos não são diferenciados dos animais sadios, o que impede o diagnóstico eficiente. Outro aspecto importante é que uma vez estabelecida esta doença é difícil de erradicar, porque o tratamento medicamentoso não é eficaz, sendo o descarte do animal importante estratégia (DERCKSEN et al., 2000; DORELLA et al., 2006). Paralelo à terapia antimicrobiana, são indicadas medidas profiláticas buscando o controle da introdução de animais na propriedade, além de medidas sanitárias (GUIMARÃES et al., 2011).

De acordo com Ribeiro et al. (2001) também deve ser utilizada vacina comercial em todo o plantel, além de sugerir o uso da citologia aspirativa com agulha fina (CAAF), como método alternativo no diagnóstico da doença. Muitos estudos vêm sendo realizados para obtenção de vacinas, que induzam alto nível de proteção aos animais, contra a LC. Estas vacinas podem ser constituídas por células bacterianas mortas, as bacterinas, e células bacterianas vivas, pela toxina inativada, os toxóides, da *C. pseudotuberculosis*, ou pela associação destes componentes, utilizando ou não algum tipo de adjuvante (VALE et al., 2003). Uma vacina atenuada contra LC foi produzida pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola. A vacina está disponível sob forma líquida e deve ser administrada pela via subcutânea. Estudos verificaram que a vacina possui 83,3% de eficácia contra a LC em caprinos (RIBEIRO et al., 1991). Um estudo realizado por Hodgson et al. (1999), testou a eficácia de uma vacina com a forma geneticamente inativada da fosfolipase D, em ovinos, substituindo a histidina 20 pela serina. Os resultados indicaram que a vacina conferiu uma proteção de 44%, contra uma proteção de 95% oferecida pela vacina produzida pela inativação da fosfolipase D.

2.2.7 Potencial zoonótico

Na Austrália, Pell et al. (1997), descreveram dez casos de linfadenite caseosa em humanos, a maioria, relativos a doença ocupacional, já que esses pacientes foram expostos anteriormente a ovinos. A série de casos em humanos, quase

duplica o número de notificações da doença em humanos na Austrália. Esses casos foram tratados por incisão e drenagem da linfadenite suppurativa e utilização de antibióticos. No entanto, o aumento do uso de uma vacina contra linfadenite caseosa em ovinos na Austrália, resultou na diminuição dessa zoonose.

3. Artigos Científicos

Artigo 1

Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos vivos e abatidos no Vale do São Francisco

Maria da Conceição Aquino de Sá, Josir Laine Aparecida Veschi, Mateus Matiuzzi da Costa

RESUMO

A caprino-ovinocultura é uma atividade presente em diversos países, a qual apresenta grande importância econômica, principalmente em regiões semiáridas. Ultimamente o agronegócio vem se consolidando e melhorando as condições de produção e sanitárias, visando produtos de melhor qualidade. A linfadenite caseosa (LC), causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é uma doença infecciosa que acomete ovinos e caprinos, resultando em grandes prejuízos econômicos. O conhecimento real da situação sobre a linfadenite caseosa no Vale do São Francisco é desconhecido, por isso é necessário buscar informações sobre a doença. Este estudo propôs o levantamento da incidência de LC em vinte propriedades de Petrolina-PE e região, bem como de animais abatidos nos abatedouros de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). Em todas as propriedades visitadas havia suspeita da doença, pois os animais apresentavam abscessos supurados ou não supurados nos linfonodos ou tecido subcutâneo. Das 108 amostras coletadas em propriedades, 65 foram oriundas de ovinos e 43 de caprinos. Nos abatedouros, obtiveram-se 449 amostras de abscessos tanto de linfonodos superficiais, como de linfonodos internos e vísceras. Todas as amostras coletadas foram submetidas a cultivo em ágar sangue em aerobiose por 48h. Decorrido este tempo, colônias suspeitas foram identificadas como *C. pseudotuberculosis* por suas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais. Das amostras coletadas nas propriedades (n=81) 75% apresentaram cultura bacteriológica positiva para *C. pseudotuberculosis*. De todas as propriedades avaliadas foram isolados *C. pseudotuberculosis*. Da mesma forma de todas as amostras de abatedouro foi isolado o agente da linfadenite caseosa, indicando uma prevalência de 16% para os animais abatidos em Petrolina e 6% para os animais abatidos em Juazeiro. Do total das amostras coletadas no abatedouro (n=449), 54,10% destas foram obtidas de linfonodo pré-escapular, 18,70% no fígado, 4,90% do pulmão, 0,2% dos rins, 0,50% do esôfago e 2,20% do Intestino grosso, demonstrando que existe uma alta incidência de abscessos na forma subclínica. Por meio dos resultados obtidos no presente estudo, salienta-se a importância do estabelecimento de medidas de prevenção e controle da enfermidade pelos caprinos-ovinocultores, associando o cuidado na introdução de animais na propriedade a inspeção periódica do rebanho e o descarte de animais positivos.

Palavras-chave: agronegócio, avaliação sanitária, caprino-ovinocultura

ABSTRACT

The goat and sheep industry is an activity present in several countries, which has great economic importance, especially in semiarid regions. Lately agribusiness is consolidating and improving production conditions and health, aiming to better quality products. The caseous lymphadenitis (LC), caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is an infectious disease affecting sheep and goats, resulting in economic losses. Knowledge of the actual situation on caseous lymphadenitis in the São Francisco Valley is unknown, so it is necessary to seek information about the disease. This study has proposed search the incidence of LC in twenty properties of Petrolina-PE and region, as well as from animals slaughtered in slaughterhouses of Petrolina (PE) and Juazeiro (BA). In all farms visited was suspected of the disease, because the animals had ruptured abscesses or suppurative lymph nodes or subcutaneous tissue. Of the 108 samples collected from farms, 65 were derived from sheep and 43 goats. In slaughterhouses, we obtained 449 samples from abscesses of both superficial lymph nodes, as internal lymph nodes and viscera. All samples were submitted to culture on blood agar in aerobically conditions for 48 hours. After this time, suspected colonies were identified as *C. pseudotuberculosis* by their morphological, biochemical and staining features. Among the samples collected in the farms (n=81), 75% was positive bacterial culture for *C. pseudotuberculosis*. Of all evaluated properties was isolated *C. pseudotuberculosis*. Likewise for all slaughterhouse samples was isolated the agent of caseous lymphadenitis, indicating a prevalence of 16% for animals slaughtered in Petrolina and 6% for animals slaughtered in Juazeiro. Of the total samples collected at the slaughterhouse (n=449), 54.10% of these were found in the pre-scapular lymph nodes, 18,70% in liver, 4.90% in the lung, 0,2% in kidney, 0.50% in the esophagus and 2.20% in the intestine, showing that there is a high incidence of abscesses in subclinical form. Through the results obtained in this study highlight the importance of establishing measures to prevent and control the disease by producers of sheep and goats, involving the careful introduction of animals on the property, the periodic inspection of the herd and disposal of animals positive.

Keywords: agribusiness, sheep and goat, sanitary evaluation

1. INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura é uma atividade presente em quase todos os países, principalmente em regiões semiáridas. Essas regiões são caracterizadas por concentrações de chuvas em curto período, sendo os demais marcados por secas, contribuindo para a baixa produção nos animais, principalmente naqueles criatórios com pouca adoção de tecnologias (BOUTONNET, 1999).

No entanto, o consumidor exige produtos de qualidade, o que obriga os produtores a novas adequações, buscando melhorar a oferta de carne e leite e seus derivados no mercado. Assim, são várias as ações que devem ser praticadas pelos pecuaristas, entre elas a compreensão do seu negócio, visando programar manejo adequado, desde a compra de animais com boa adaptabilidade a região, resistentes a doenças, com boa terminação e principalmente que sejam precoces (OLIVEIRA et al., 2008). Estudos mostram que a caprino-ovinocultura pode proporcionar um grande impulso na economia do país. Porém, é primordial a integração entre todos os participantes do negócio, desde a fase da produção, processamento e principalmente da distribuição. O produtor deve ser sempre atualizado quanto às exigências sanitárias do mercado (BOYAZOGLU & MORAND-FEHR, 2001).

Estudo realizado por Pinheiro et al. (2000), mostrou que no estado do Ceará, de maneira geral, o manejo sanitário nas criações de caprinos é pouco utilizado independente se o regime de criação é extensivo ou intensivo. Assim, foi observada uma mortalidade média de 22,8% e 4,6% para jovens e adultos respectivamente. Por isso, a falta do manejo sanitário, contribui para a ocorrência de muitas doenças, entre elas a linfadenite caseosa (RIBEIRO et al., 1988).

A linfadenite caseosa se caracteriza por um processo inflamatório de linfonodos, caracterizado pela formação de abscessos com conteúdo purulento de aspecto caseoso e amarelado (RIBEIRO, 1997). Nos casos crônicos, com lesões viscerais, o animal apresenta anemia e hipoproteïnemia. Esses abscessos podem ser localizados em qualquer sistema do organismo (SANTA ROSA, 1996). Esta é uma doença ocasionada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* e acometem ovinos e caprinos, entre outras espécies. Essa enfermidade é prevalente entre pequenos ruminantes na maioria dos países, provocando um impacto negativo na

economia mundial, significativas perdas de carne e pele, sem mencionar o bem estar animal (FONTAINE & BAIRD, 2008).

A frequência de abscessos cutâneos sugere a presença de linfadenite caseosa, como a doença de maior frequência em caprinos no estado de Pernambuco. Assim, demonstra a necessidade de implantar medidas de biossegurança para controlar a doença e aumentar a produtividade da caprino-ovinocultura (ALENCAR et al., 2010).

Este estudo propõe o levantamento da linfadenite caseosa em caprinos e ovinos de propriedades de Petrolina-PE e região, bem como de animais abatidos no abatedouro de Petrolina-PE e Juazeiro-BA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

Foram visitadas vinte propriedades nas cidades de Afrânio-PE, Floresta-PE, Jatobá-PE, Petrolândia-PE e Petrolina-PE, onde os animais foram submetidos a exames através de palpação dos linfonodos superficiais: parotídeos, submandibulares, pré-escapulares, pré-crurais, poplíteos, mamários. Quanto observados os abscessos, foi realizado a lavagem anti sépsia com álcool a 70%, em seguida foi feita a extirpação cirúrgica para coleta do exsudado usando *swabs* estéreis para coleta.

Também foram coletadas amostras de animais abatidos no Abatedouro Municipal de Petrolina-PE e Abatedouro de Juazeiro-BA, no período de dezembro de 2010 e janeiro de 2011. A coleta de amostras dos abscessos foi realizada na evisceração. No abatedouro de Juazeiro, é realizada inspeção *ante mortem*, e os animais que apresentam sinais clínicos não seguem para o abate, sendo devolvidos aos proprietários, assim foram coletados apenas amostras subclínicas.

Após a coleta das amostras, estas foram remetidas em meio de *Stuart* modificado sob refrigeração para o Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do *Campus* Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF.

2.2. Isolamento e identificação bacteriana

No laboratório, as amostras foram cultivadas em ágar base enriquecido com sangue ovino a 8%, sendo as placas incubadas por 48 horas em estufa a 37°C. (CARTER, 1990). Após crescimento, foi realizada coloração de Gram e testes de catalase e CAMP (PELCZAR JR et al., 2007). As colônias bacterianas isoladas foram estudadas quanto aos aspectos macro e micromorfológicos, bioquímicos e tintoriais (QUINN et al. 1994). Foram os testes de fermentação de açúcares (maltose e glicose), teste de esculina, teste de redução de nitrato, determinação da presença de DNase e urease.

3. RESULTADOS

Após o cultivo em ágar sangue por 48 horas foram obtidas colônias brancas, secas mostrando hemólise. Na coloração de Gram, foram observados cocobacilos gram positivos, que apresentaram prova de catalase positiva e teste de CAMP reverso, bem como os seguintes resultados nos testes bioquímicos: maltose positiva, glicose positiva, uréia positiva, esculina negativa, nitrato negativo e DNase negativa. Estas características são próprias do *C. pseudotuberculosis*.

Em todas as propriedades visitadas existiam animais que apresentavam abscessos fechados ou já abscedados nos linfonodos ou tecido subcutâneo,

fazendo suspeitar de linfadenite caseosa. O rebanho existente em dezenove propriedades pasta na vegetação e vem às vezes até os currais para beber água e receber complemento alimentar, em forma de concentrados, feno ou silagem. Nessas propriedades, o rebanho geralmente é composto de animais mestiços. As instalações dessas propriedades são currais de chão batido, sem cobertura, dificultando o conforto térmico desses animais. Além disso, não possuem um local adequado para o tratamento da linfadenite caseosa e outras enfermidades. A maioria dos proprietários relatou que não descartam adequadamente o material retirado dos abscessos, onde na maioria dos casos, os abscessos são supurados no campo, facilitando assim a contaminação para outros animais. De todas as propriedades visitadas, apenas uma possuía todo o plantel em regime de criação intensiva. Neste criatório, utiliza-se manejo reprodutivo, melhoramento genético, ração balanceada e, escrituração zootécnica, que indicava uma prevalência da linfadenite caseosa de aproximadamente 10% do plantel.

Foi coletado um total de 108 amostras de abscessos nas fazendas, conforme Tabela 1, sendo 58 de ovinos e 50 de caprinos. Destas amostras, em 81 (75%) foi isolado *C. pseudotuberculosis*, sendo que nas demais amostras foram cultivados outros micro-organismos, como *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp.

Tabela 1: Amostras de abscessos coletados e respectivos isolamentos de *C. pseudotuberculosis* de propriedades de caprinos e ovinos no Vale do São Francisco.

Localidade	Nº de propriedades	Nº caprinos	Nº ovinos	Isolados
Petrolina-P. Bebedouro	01	18	0	14
Petrolina– P. S.N.C. N 3	01	03	03	02
Petrolina – P.S.N.C. C 1	03	0	12	09
Petrolina – Lajedo	06	05	28	30
Afrânio	01	02	0	02
Floresta	01	04	03	07
Petrolândia	05	14	09	11
Jatobá	02	04	03	06
Total	20	50	58	81

Dos animais abatidos no bipolo Petrolina e Juazeiro, foram coletadas amostras oriundas de linfonodos externos e também dos órgãos internos, como pulmão, rim, vísceras, masseter e fígado (Tabela 2). Os animais abatidos em Petrolina foram oriundos das cidades de Afrânio-PE, Dormentes-PE, e Petrolina-PE, porém não existe abate separado por categoria animal, de forma que ovinos e caprinos são abatidos juntos. Além disso, os animais são abatidos por lotes (caprinos e ovinos) adquiridos de diversas propriedades por um intermediário. No abatedouro de Juazeiro, os animais são abatidos individualmente. Neste caso todas as amostras foram obtidas de ovinos, provenientes das cidades de Juazeiro e Curaça-BA.

Em relação às amostras coletadas nos abatedouros, foi observado que 54,1% dessas amostras foram provenientes do linfonodo pré-escapular, seguido por abscessos no fígado, onde foram encontrados 19% e 8,0% dos achados em Petrolina e Juazeiro respectivamente, mostrando que existe uma alta incidência de abscessos neste órgão. Abscessos também foram obtidos em outros órgãos internos (Tabela 2).

Tabela 2: Abscessos coletados em caprinos e ovinos nos Abatedouros de Petrolina-PE e Juazeiro-BA.

	Petrolina	%	Juazeiro	%	Total	Percentual Total
Pré-escapular	237	54,24	6	50,02	243	54,1
Sub-mandibular	64	14,64	0	0,00	64	14,3
Iguinal	0	0,00	1	8,33	1	0,2
Pré-cural	0	0,00	1	8,33	1	0,2
Fígado	83	18,99	1	8,33	84	18,7
Pulmão	21	4,81	1	8,33	22	4,90
Intestino Grosso	9	2,06	1	8,33	10	2,2
Masseter	20	4,57	0	0,00	20	4,5
Rim	1	0,23	0	0,00	1	0,2
Esôfago	2	0,46	0	0,00	2	0,5
Mesentérico	0	0,00	1	8,33	1	0,2
Total de Abscessos	437	100	12	100	449	100
T. de Animais Abatidos	2790		190		2980	-

4. DISCUSSÃO

A situação real da linfadenite caseosa na região do Vale do São Francisco, até então é desconhecida, dessa forma é necessário buscar informações que possibilitem solucionar questões referentes à doença. Durante as visitas nas propriedades observou-se que existe pouca adoção de tecnologias, as quais foram descritas em apenas uma propriedade. Estes resultados podem justificar a alta prevalência da enfermidade nas propriedades. Outros estudos realizados no estado de Pernambuco (ABREU et al., 2008a) revelaram a mesma prevalência (100%), que a descrita para as propriedades da região de Petrolina. Alencar et al. (2010) ao verificar perfil sanitário de propriedades do sertão Pernambucano observaram uma frequência de 92,5% de abscessos cutâneos nas propriedades avaliadas. Isto indica que a frequência da LC pode variar de acordo com a região de estudo, contudo grande atenção deve ser dada ao semiárido pernambucano, em particular o vale do São Francisco.

Nos animais abatidos foi encontrada uma ocorrência de LC em 15,66% (437/2790) dos animais abatidos em Petrolina e 6,31% (12/190) dos animais abatidos em Juazeiro, mostrando números preocupantes para a economia local. Nossos resultados são semelhantes aos observados por Souza et al. (2011) avaliando ovinos deslanados no estado da Paraíba. Entretanto, os valores descritos no presente estudo foram menores que os descritos por Arsenaut et al. (2003). O menor índice observado nos animais abatidos em Juazeiro deve-se a inspeção *ante mortem* executada, o qual não permite que animais com infecção clínica sejam abatidos. Segundo Baird & Malone (2010), a inspeção de animais no abatedouro pode ser uma importante medida para monitorar a situação da LC nos rebanhos, contudo esta prática ainda não é realizada no abatedouro de Petrolina-PE.

No presente estudo, os abscessos observados estavam em linfonodos pré-escapulares (54,10%). Nos animais abatidos em Juazeiro, os abscessos pré-escapulares também são mais frequentes. Souza et al. (2011), observaram que dos 1.466 ovinos abatidos na Paraíba, 15,9%, apresentaram lesões macroscópicas semelhantes à linfadenite caseosa, sendo sua maior prevalência nos linfonodos pré-escapulares, nos parotídeos e no pré-cural. Essa maior ocorrência pode ser

justificada pelo fato desse linfonodo estar localizado mais superficialmente, ficando exposto aos fômites, as instalações e a vegetação, que na região estudada, possuem muitos espinhos (RIET-CORREA et al., 2001).

Abscessos em outros órgãos internos também foram observados porém com menor frequência o que esta de acordo com o descrito com Arsenaut et al. (2003). Segundo Fontaine & Bird (2008) a ocorrência de abscessos em órgãos internos pode estar associada à disseminação hematogena do patógeno. Abscessos nos pulmões foram observados em 4,9% dos animais abatidos. Lesões neste órgão são descritas (SOUZA et al., 2011) e indicam uma importante fonte para contaminação de animais nos rebanhos, especialmente quando a lesão pulmonar é a única observada nos animais (FONTAINE & BIRD, 2008). Além disto, a prevalência de abscessos internos indica a importância da adoção de métodos de diagnóstico mais acurado, visto que o simples exame visual dos animais com a remoção dos abscessos pode não ser uma medida eficaz para o controle da enfermidade (Baird & Malone, 2010).

Na maioria das amostras coletadas dos animais provenientes de propriedades rurais e em todas de abatedouro foram isoladas bactérias com perfil bioquímico de *C. pseudotuberculosis* (CARTER, 1990; QUINN et al., 1994; PELCZAR JR et al., 2007). Porém, houve crescimento de outros micro-organismos, como *Proteus* spp. e *Bacillus* spp.. Outros agentes bacterianos podem ser isolados sozinhos ou em associação com o *C. pseudotuberculosis* em casos de linfadenite caseosa, como *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. e *R. equi* (ABREU et al., 2008). *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. são considerados habitantes normais da pele e o primeiro pode ser isolado provocando infecções piogênicas (HIRSH & ZEE, 2003).

A alta frequência de LC observada neste estudo pode estar associada com procedimentos de manejo, que favorecem a disseminação do agente entre os animais, como tatuagem, marcação, corte de cauda, castração, utilizando ferramentas sem esterilização. Além disso, a região de criação dos animais possui vegetação composta por plantas cactáceas, que provocam ferimentos na pele dos animais, somando-se ainda a esses fatores, a habilidade do micro-organismo sobreviver ao ambiente por vários meses, além de várias propriedades sem assistência técnica (PINHEIRO et al., 2000). Por isso a necessidade de limpeza periódica das instalações, cochos e bebedouros, como também a adoção de um

calendário de vacinas e vermifugação, bem como limpeza e desinfecção do umbigo e separação dos animais doentes em piquete próprio (BANDEIRA et al., 2007).

Nesse trabalho foi constatado que os principais problemas sanitários são pouca limpeza nas instalações, animais doentes juntos dos animais sadios, o que provoca vários tipos de doenças entre elas as helmintoses, linfadenite caseosa, mastite, pneumonia e artrite são mais frequentes nos animais criados sob regime semi-intensivo/intensivo do que sob regime extensivo, concordando com o estudo de Pinheiro et al. (2000). A propriedade com regime intensivo de produção, embora com melhores instalações, controle zootécnico, ração balanceada, calendário de vacinação e vermifugação, apresentou uma ocorrência de 10% de linfadenite caseosa, mostrando que nesse caso, o problema pode estar relacionado com a alta densidade animal.

A similaridade dos resultados dos diversos estudos na região NE (PINHEIRO et al., 2000; ALENCAR et al., 2010), com aqueles obtidos neste trabalho reforça o potencial de disseminação do *C. pseudotuberculosis*. Logo, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos sobre caracterização zoonosológica nos rebanhos brasileiros, estudos epidemiológicos que determinem a incidência e prevalência das principais enfermidades, desenvolvimento e uso de métodos moleculares para identificação e tipagem dos patógenos, técnicas para diagnóstico diferencial e quantificação dos prejuízos oriundos dos problemas sanitários (PINHEIRO et al. 2000).

5. CONCLUSÕES

Deve ser destacada a grande ocorrência de lesões e do isolamento de *C. pseudotuberculosis* de animais em propriedades rurais e no abatedouro de Petrolina e Juazeiro, sendo que este fato pode estar associado à baixa tecnificação e fatores como a vegetação observada nas propriedades rurais do semiárido pernambucano e bahiano.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE (Fundação de Amparo e Pesquisa de Pernambuco) pela concessão da bolsa de pós-graduação para estudante Maria da Conceição Aquino de Sá, bem como a bolsa de iniciação científica para Grace Barbosa dos Santos. Este trabalho foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Nº - 479624/2010-0).

Esse trabalho possui autorização do Comitê de Ética em Pesquisa em Estudos Humanos e Animais da Univasf sob o número 27091054 de 06 de outubro de 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. R. O. et al. Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco, **Pesq. Vet. Bras.** v. 28, n. 10, p.481- 487, 2008.

ABREU, S.R. O. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de Pernambuco, Brasil. **Vet. e Zootecnia**, v.15, n.3, p. 502-509, 2008a.

ALENCAR, S. P. et al. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco, **Ciência animal**, v.11, n. 1, p. 131-140, 2010.

ARSENAULT, J. et al. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Prev. Vet. Med.** v. 59, p. 67-81, 2003.

BAIRD, G.J, MALONE, F.E, Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA TESTING. **Veterinary Record**, v. 166, p. 358-362, 2010.

BANDEIRA, D. A. et al. Característica de produção da caprinocultura leiteira na região do Cariri na Paraíba, **Ciência Veterinária Tropical**, v. 10, n. 1, p. 29 – 35, 2007.

BOUTONNET, J.P. Perspectives of the sheep meat world market on future production systems and trends, **Small Ruminant Research**, v. 34, p. 189-195, 1999.

BOYAZOGLUA, J., MORAND-FEHR, P. Mediterranean dairy sheep and goat Products and their quality A critical review, **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 1-11, 2001.

CARTER, G.R., **Diagnostic procedures in veterinary Bacteriology and mycology**, 5^a ed. California, Academic press Inc. p.620,1990.

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

HIRSH, D.C, ZEE, Y. C, **Microbiologia Veterinária**, Guanabara Koogan, 2003, 446p.

OLIVEIRA, A. N. et al. Características da carcaça de caprinos mestiços Anglo-Nubiano, Boer e sem padrão racial definido, **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1073-1077, 2008.

PELCZAR JR., M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R., **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2^a Ed. São Paulo, 2007, 77 p.

PINHEIRO, R.R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.52, n.5, p.534-543, 2000.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, 1994, 648p.

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J.A.H.; PEREIRA FILHO, M. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.10, n.2, p.23-24, 1988.

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

RIET-CORREIA, F, SCHILD, A. L, MENDEZ, M.D.C, LEMOS, R.A.A, **Doenças de Ruminantes e Equinos**, Livraria Varela, 2001, vol. 1, 426 p.

SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle**. 1ª ed. Brasília/Sobral: EMBRAPA, 1996, 167-170p.

SOUZA, M.F. et al. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba, **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 3, p. 224-230, 2011.

Artigo 2

Distribuição dos genes *pld* e *fagA,B,C* e *D* em *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolados de caprinos e ovinos

Maria da Conceição Aquino de Sá, Gisele Veneroni Gouveia, Mateus Matiuzzi da Costa

RESUMO

A linfadenite caseosa é uma doença crônica e subclínica que acomete caprinos e ovinos. Uma vez estabelecido, o micro-organismo se multiplica causando inflamação, necrose e formando abscesso caseoso. A bactéria causa grandes perdas econômicas, principalmente aos pequenos produtores. Pouco se sabe da arquitetura genética de *C. pseudotuberculosis*, sendo que a maioria dos genes estudados codifica fatores de virulência. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a presença dos genes de virulência da fosfolipase D (*pld*), proteína integral de membrana (*fagA*), transportador de enterobactina de ferro (*fagB*), ATP- proteína de ligação da membrana citoplasmática (*fagC*) e Sideróforos- proteína de ligação de ferro (*fagD*) em isolados de *C. pseudotuberculosis*, obtidos de casos de linfadenite caseosa de caprinos e ovinos, da região do Vale do São Francisco. Um total de 168 isolados foi utilizado neste estudo. Destes isolados 145 foram obtidos de abscessos em linfonodos superficiais e 23 de abscessos em vísceras. Os DNAs foram termo-extraídos em um volume final de 500 µl. A PCR foi utilizada para averiguação da presença dos genes de virulência. Os genes *fagA*, *fagB* e *pld* foram detectados em todos os isolados. O gene *fagC* foi positivo em 167 (99,40%) isolados. O gene *fagD* foi o menos frequente, sendo detectado em 160 (95,23%) isolados. A combinação de todos os fatores esteve presente em 160 (95,23%) dos isolados estudados. Todas as amostras de órgãos viscerais foram positivas para os genes estudados. Os fatores de virulência pesquisados são frequentes entre os isolados de *C. pseudotuberculosis* obtidos de casos de LC, confirmando sua importância na patogênese da enfermidade.

Palavras chave: Linfadenite caseosa, Fosfolipase D, *fagA*, B, C e D, patogenicidade

ABSTRACT

The caseous lymphadenitis is a chronic and subclinical disease that affects goats and sheep. Once established, the micro-organism multiplies causing inflammation, necrosis and caseous abscess. The bacterium causes economic losses, especially to small producers. The genetic architecture of *C. pseudotuberculosis* is still poorly known, and the most studied genes encode virulence factors. The objective of this paper was to verify, using the Polymerase Chain Reaction (PCR), the presence of the phospholipase D (*pld*), membrane integral protein (*fagA*), enterobactin transporter of iron (*fagB*), ATP-binding protein of the cytoplasmic membrane (*fagC*) and siderophore-iron-binding protein (*fagD*) virulence genes in isolates of *C. pseudotuberculosis* obtained from cases of caseous lymphadenitis in goats and sheep, of the region of the São Francisco Valley. A total of 168 isolates was used in this study. These isolates, 145 were obtained from abscesses in the superficial lymph nodes and 23 from abscesses in viscera. The DNA was heat extracted in a final volume of 500 µL. PCR was used to investigate the presence of virulence genes. *fagA*, *fagB* and *pld* genes were detected in all isolates. The *fagC* gene was positive in 167 (99.40%) isolates. The *fagD* gene was less frequent, being detected in 160 (95.23%) isolates. The combination of all factors was present in 160 (95.23%) isolates studied. All samples of visceral organs were positive for the genes studied. The virulence factors surveyed are frequent among isolates of *C. pseudotuberculosis* obtained from cases of LC, confirming its importance in the pathogenesis of the disease, its wide distribution in field isolates confirmed its potential for construction of live attenuated vaccines.

Keywords: Caseous lymphadenitis, phospholipase D, *fagA*, B, C e D, pathogenicity

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram positiva, responsável pela linfadenite caseosa (LC), uma doença infecto-contagiosa de difícil diagnóstico, que acomete caprinos e ovinos, causando grandes prejuízos (FONTAINE & BAIRD, 2008). O micro-organismo se multiplica causando inflamação, com características necróticas formando abscesso caseoso (QUINN et al., 1994; DORELLA et al., 2006). Embora, *C. pseudotuberculosis* seja de grande importância, sua patogênese ainda é pouco caracterizada. Avanços na área genômica têm permitido a descoberta de novos genes, principalmente relacionados à virulência (D' FONSECA et al., 2008).

A hemólise é característica do *C. pseudotuberculosis* e considerada uma importante marca da virulência de vários micro-organismos. Esta característica é muito importante, uma vez que tem sido associado com a captura de ferro, o qual é um micronutriente associado à obtenção de energia e multiplicação bacteriana (JOST & BILLINGTON, 2004)

O produto do gene para a fosfolipase D (*pld*) é considerado como principal fator de virulência do *C. pseudotuberculosis* (HODGSON et al., 1999). O gene *pld* codifica uma exotoxina, que aumenta a permeabilidade vascular, promovendo a disseminação das bactérias (HODGSON et al., 1994). Embora não seja considerada diretamente hemolítica esta tem sido reportada como capaz de produzir hemólise sinérgica e complemento dependente (JOST & BILLINGTON, 2004).

Além do gene *pld* também outros importantes fatores de virulência são o *fagA* (proteína integral de membrana), o *fagB* (transportador de enterobactina de ferro), o *fagC* (ATP- proteína de ligação da membrana citoplasmática) e *fagD* (Sideróforos – proteína de ligação de ferro), os quais estão organizados em um operon envolvido na absorção de ferro, que confere ao *C. pseudotuberculosis* persistência em infecções de caprinos. Esse operon está localizado a jusante do gene *pld*, contribuindo para a virulência do *C. pseudotuberculosis* (BILLINGTON et al., 2002).

Vários trabalhos têm sido conduzidos no intuito de caracterizar a virulência de *C. pseudotuberculosis*, principalmente objetivando o desenvolvimento de novas vacinas e terapias para o controle da LC (ÇETINKAYA et al., 2002, D'FONSECA et

al., 2008). Pacheco et al. (2007) utilizaram o gene *pld* para desenvolver um ensaio de PCR *multiplex*, onde incluiu os genes *rpoB* e 16S rRNA, o que permitiu diferenciar *C. pseudotuberculosis* de outras espécies como *C. diphthiae* e *C. ulcerans*.

Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar, por meio da PCR, a presença dos genes de virulência *pld*, *fagA*, *fagB*, *fagC* e *fagD*, em isolados de *C. pseudotuberculosis*, obtidos de linfadenite caseosa de caprinos e ovinos, da região do Vale do São Francisco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, no *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) de Petrolina-PE.

2.2. Isolados bacterianos

Um total de 168 isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi utilizado neste estudo. Os isolados foram obtidos a partir de amostras de linfadenite caseosa de caprinos e ovinos vivos, provenientes de propriedades de Afrânio-PE (n=02), Floresta-PE (n=04), Jatobá-PE (n=02), Petrolândia-PE (n=04) e Petrolina- PE (n=38), bem como de animais abatidos nos abatedouros de Petrolina-PE (n=116) e Juazeiro-BA (n=02). Destes isolados 145 foram obtidos de abscessos em linfonodos

superficiais e 23 de abscessos em vísceras. Os isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foram previamente identificados por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quinn et al. (1994). As culturas foram repicadas em meio ágar Triptona de Soja (TSA), e então utilizadas para caracterização molecular.

2.3. Caracterização molecular dos isolados

O DNA dos isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi termo-extraído em um volume final de 500 µl. A PCR foi utilizada para averiguação da presença dos genes *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD* e *pld*, com a utilização de iniciadores específicos apresentados na Tabela 1. Os iniciadores para amplificação dos genes *fagA*, *fagB*, *fagC* e *fagD* foram desenhados com o programa Primer3 Plus (Disponível em <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi>). A qualidade dos iniciadores foi verificada no site <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>, tomando-se cuidado para optar por primers que possuíssem $\Delta G > 0$, para que as reações espontâneas não ocorram ou o mais próximo de zero, que formassem o menor número possível de hairpins. Os primers utilizados para amplificação do gene *pld* foram descritos por Hodgson et al., 1990.

Tabela 1. Relação dos iniciadores utilizados para detecção dos genes de virulência.

gene	Sequência	Produto	Referência
<i>Pld</i> F	5'ATGAGGGAGAAAGTTGTTTAA3'	924 pb	Hodgson et al., 1990.
<i>Pld</i> R	5'TCACCACGGGTTATCCGC3'		Hodgson et al., 1990.
<i>Fag</i> _A_F	5'AGCAAGACCAAGAGACATGC3'	245 pb	Esse trabalho
<i>Fag</i> _A_R	5'AGTCTCAGCCCAACGTACAG3'		Esse trabalho
<i>Fag</i> _B_F	5'GTGAGAAGAACCCCGGTATAAG3'	291 pb	Esse trabalho
<i>Fag</i> _B_R	5'TACCGCACTTATTCTGACACTG3'		Esse trabalho
<i>Fag</i> _C_F	5'GTTTGGCTATCTCCTTGGTATG3'	173 pb	Esse trabalho
<i>Fag</i> _C_R	5'CGACCTTAGTGTTGACATACCC3		Esse trabalho
<i>Fag</i> _D_F	5'GAGACTATCGACCAGGCAGA3'	226 pb	Esse trabalho
<i>Fag</i> _D_R	5'ACTTCTTGGGGAGCAGTTCT3'		Esse trabalho

Para a realização da PCR, foram empregadas as condições descritas na Tabela 2. A reação de amplificação para o gene *pld* constou das seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 30 segundos, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 40 segundos, temperatura de anelamento de 61°C por 40 segundos, e extensão a 72°C por 40 segundos. Após o término dos ciclos houve uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos. Para os demais genes, a diferença foi em relação à temperatura de anelamento que foi de 58°C, 55°C, 60°C e 61°C para os genes *fagA*, *fagB*, *fagC* e *fagD*, respectivamente. Em seguida, os produtos de amplificação foram analisados em gel agarose 1,5% adicionado de brometo de etídeo e visualizados sobre iluminação ultravioleta (UV).

Tabela 2. Condições de reação da PCR para os genes de virulência estudados

Produtos da reação	Genes de virulência				
	<i>pld</i>	<i>fagA</i>	<i>fagB</i>	<i>fagC</i>	<i>fagD</i>
Tampão de enzima	1X(10mM	Tris- pH 8,3, MgCl ₂ 2,6 mM, 50 mM KCl)			
MgCl ₂ (mM)	1	1,4	1,3	1,3	1,3
dNTPs (mM)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Primers (mM)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Taq DNA polimerase (U)	2,5	0,15	2,5	2,5	2,5
DNA molde (μL)	4	4	4	4	4
Água ultra pura (μL)	15,25	15,05	15,10	15,10	15,10
Total (μL)	25	25	25	25	25

3. RESULTADOS

A especificidade dos iniciadores utilizados foi comprovada pela aplicação do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, permitindo a observação de uma banda específica para cada produto de amplificação (figura 1).

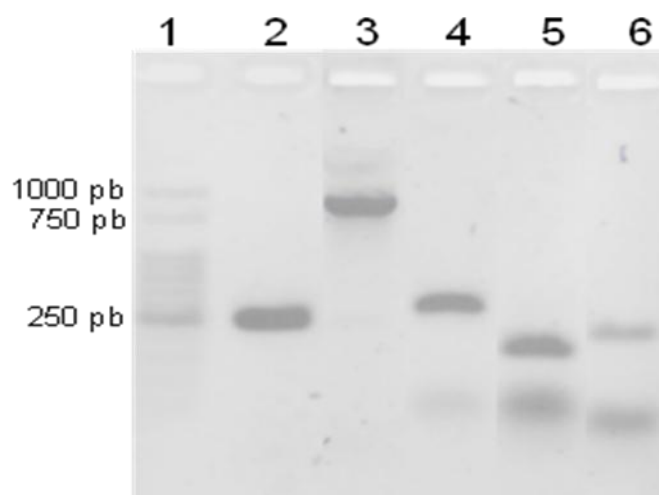


Figura 1: Padrão de tamanho do PCR para os genes fosfolipase D *fagA*, B, C e D de isolados de *C. pseudotuberculosis*.

As colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representam respectivamente: Padrão de tamanho de 50 bp (Ludwig Biotec), PCR para o gene *fagA* (245 pb), PCR para o gene da fosfolipase D (924 pb), PCR para o gene *fagB* (291 pb), PCR para o gene *fagC* (173 pb) e PCR para o gene *fagD* (226 pb).

O genes *fagA*, *fagB* e *pld* foram positivos em todos os isolados. Já o *fagC* foi presente em 99,40% (167) dos isolados testados, enquanto que o gene *fagD* apresentou a menor frequência de 95,23% (160 isolados). As combinações dos fatores de virulência observada nos 168 isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* encontram-se na Tabela 3. Todas as amostras coletadas nos órgãos viscerais foram positivas para os cinco genes testados. O gene *fagD* foi menos frequente em amostras coletadas de animais abatidos.

Tabela 3. Combinações dos genes de virulência nos isolados de *C. pseudotuberculosis*

Combinações dos genes	Número de isolados positivos	Percentual (%)
<i>fagA/fagB/pld</i>	1	0,60
<i>fagA/fagB/fagC/pld</i>	7	4,17
<i>fagA/fagB/fagC/fagD/pld</i>	160	95,23

4. DISCUSSÃO

A PCR é um método preciso, eficiente e de alta sensibilidade que pode confirmar a identificação de um patógeno rapidamente, utilizando material coletado diretamente das lesões, bem como de isolado em cultivo (PACHECO et al., 2007). Além da taxonomia, também se pode caracterizar a presença de genes de virulência, demonstrando assim o potencial do microrganismo em ocasionar a enfermidade.

Nesse trabalho, o gene *pld* foi encontrado em todas as amostras, o que está de acordo com outros trabalhos que mostram a disseminação do gene *pld* nos isolados de *C. pseudotuberculosis* (HODGSON et al., 1990; ÇETINKAYA et al., 2002; PACHECO et al., 2007). Este gene codifica a exotoxina fosfolipase D, uma enzima que catalisa a dissociação da esfingomielina, aumenta a permeabilidade vascular e a sobrevivência do *C. pseudotuberculosis* nas células, sendo responsável pela invasão do organismo e transporte para os linfonodos regionais através de

fagócitos (BAIRD & FONTAINE, 2007). Esse gene está associado com alto grau de virulência dessa bactéria.

Os mecanismos pelo qual o *pld* se expressa ainda não estão bem esclarecidos, porém se observa que ele pode ser regulado por uma variedade de fatores ambientais que podem envolver a vinculação de repressores, ativadores ou mudanças na estrutura do DNA (MCKEAN et al., 2007). Todos os isolados avaliados neste estudo apresentaram teste de CAMP reverso, indicando a expressão da *pld*. Pacheco et al. (2011) ao comparar proteomas de duas cepas com diferenças quanto a sua virulência, observaram que esta proteína foi expressa apenas no isolado virulento. A atenuação do gene *pld* reduz a virulência dos isolados de *C. pseudotuberculosis* e impede o desenvolvimento da linfadenite caseosa (MCNAMARA et al., 1994), sendo que isolados *knockout* para *pld* podem representar novos candidatos para confecção de vacinas vivas atenuadas (SIMMONS et al., 1998, MEYER et al., 2002).

Para Billington et al. (2002), os genes putativos *fagA*, B, C e D, estão relacionados com absorção e regulação de ferro pelo *C. pseudotuberculosis*, e estão localizados a jusante do gene *pld*. Esses genes são pouco expressos *in vitro*, mas quando expressos *in vivo* acentuam a virulência de *C. pseudotuberculosis*, o que indica que para expressão destes genes possam ser necessários fatores presentes nos hospedeiros. Nesse trabalho os genes *fagA*, B e *pld* apresentaram uma frequência de 100% nos isolados testados. Mutante *knockout* para o gene *fagB(C)* apresentou reduzida virulência em um estudo de inoculação em cabras (BILLINGTON et al., 2002). Esta informação é importante dado que todos os isolados avaliados no presente estudo eram virulentos. Os genes *fagC* e *fagD* foram detectados em menor frequência, contudo esta foi maior do que 95%. Todos os isolados negativos para os genes *fag* foram obtidos de abscessos externos.

Estudos desta natureza são importantes, pois a maior parte dos trabalhos na literatura contempla um número menor de isolados de *C. pseudotuberculosis* (BILLINGTON et al., 2002; PACHECO et al., 2011). Os resultados apresentados aqui contemplam um grande número de isolados virulentos, o que é interessante para se mapear a distribuição destes importantes fatores de virulência nestas bactérias.

Considerando que o tratamento da linfadenite caseosa é difícil, a vacinação surge como uma importante alternativa (MEYER et al., 2002). O potencial de

interferência dos genes *pld* e *fag* no *fitness* bacteriano e na sua habilidade em multiplicar e sobreviver no interior dos hospedeiros (JOST & BILLINGTON, 2004) os colocam como importantes candidatos para confecção de vacinas vivas (HODGSON et al., 1999; BILLINGTON et al., 2002).

5. CONCLUSÃO

Os fatores de virulência avaliados estão presentes entre as amostras de *C. pseudotuberculosis* estudadas, sugerindo um alto potencial patogênico para essas bactérias. Sua ampla distribuição nos isolados de campo confirma seu papel na patogênese bacteriana e potencial para uso na construção de vacinas vivas.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE (Fundação de Amparo e Pesquisa de Pernambuco) pela concessão da bolsa de pós-graduação para estudante Maria da Conceição Aquino de Sá, bem como a bolsa de iniciação científica para Grace Barbosa dos Santos. Este trabalho foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Nº - 479624/2010-0).

Esse trabalho possui autorização do Comitê de Ética em Pesquisa em Estudos Humanos e Animais da Univasf sob o número 27091054 de 06 de outubro de 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIRD, G.J., FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J. Comp. Pathol.** v.137, p. 179–210, 2007.

BILLINGTON, S et al., Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 208, p. 41-45, 2002.

ÇETINKAYA, B et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR, **Veterinary Microbiology** v. 88, p. 75-83, 2002.

D`AFONSECA, V et al. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications, **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 252-260, n. 1, 2008.

DORELLA, F.A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Vet Rec.** V. 37 p. 201–218, 2006.

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

HODGSON, A. L. et al. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* Phospholipase D. **Vaccine**, v. 17, p. 802–808, 1999.

HODGSON, A. L.M et al. Protection of sheep against Caseous Lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5275-5280, n. 12, 1994.

HODGSON, A. L.M, BIRD, P, NISBET, I. T. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of the Phospholipase D Gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Journal of bacteriology**, v. 172, p. 1256-1261, n. 3, 1990.

JOST, B.H., BILLINGTON, S.J. *Corynebacterium* and *Arcanobacterium* in: GYLES, C. L., PRESCOTT, J.F., SONGER, G., THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 3 ed. John Wiley&Sons, 2004, p. 77-86.

MCKEAN, S. C, DAVIES, J. K, MOORE, R. J, Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death, **Microbiology**, v. 153, p. 2203-2211, 2007.

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

MEYER, R, et al. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Ci. Méd. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.

PACHECO, L. G.C et al. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Microbiology**, v. 11:12, 2011.

PACHECO, L. G.C et al. 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**, vol. 56, p. 480-486, 2007

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, 1994, 648p.

SIMMONS, C. P et al. Vaccine Potential of Attenuated Mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep, **American Society for Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 474-479, 1998.

Artigo 3

Atividade antimicrobiana *in vitro* de desinfetantes, perfil de sensibilidade a agentes antimicrobianos e produção de biofilme de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos na região de Petrolina-PE.

Maria da Conceição Aquino de Sá, Mateus Matiuzzi da Costa

RESUMO

A linfadenite caseosa é uma importante enfermidade que afeta caprinos e ovinos, podendo ser subclínica ou até levar a morte dos animais. Esta enfermidade está associada à redução na produtividade dos rebanhos e acarreta sérios prejuízos a caprino-ovinocultura. Desta forma a adoção de medidas de controle é muito importante. Para tal, a remoção de abscessos e tratamento com desinfetantes e drogas antimicrobianas podem ser recomendados. O objetivo do presente estudo foi caracterizar o perfil de sensibilidade de isolados de *C. pseudotuberculosis* a desinfetantes e antibióticos, relacionando estes perfis com a produção de biofilme. Foram avaliados 398 isolados que após confirmação da viabilidade e pureza foram submetidos aos testes de sensibilidade às drogas antimicrobianas pelo teste de Kirby-Bauer modificado. As drogas avaliadas foram: novobiocina, florfenicol, neomicina, gentamicina, ampicilina, amoxicilina, penicilina G, enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, tetraciclina, cefalotina, sulfazotrim e lincomicina. A sensibilidade aos desinfetantes foi determinada pelo teste de microdiluição empregando iodo, clorexidina, cloro, amônia quaternária e formol, nas respectivas concentrações de uso. A habilidade dos isolados em produzir biofilme foi avaliada pelo teste de aderência em microplacas seguido da coloração por violeta de genciana. Com relação aos antimicrobianos a sensibilidade obtida foi de 100% para florfenicol, 100% para tetraciclina, 99,25% para enrofloxacin, 99,25% para ciprofloxacin, 99,25% para lincomicina, 98,99% para cefalotina, 98,74% para norfloxacin, 98,74% para sulfazotrim, 97,74% para gentamicina, 94,22% para ampicilina, 91,71% para amoxicilina, 91,21% para penicilina G, 89,19% para neomicina e de 0% para novobiocina. Os desinfetantes foram efetivos para os isolados em 100% para o formol e clorexidina, 99,50% para a amônia quaternária, 87,69% para o cloro e 81,41% para o iodo. Setenta e cinco por cento dos isolados foram fracos ou não produtores de biofilme o que pode justificar os perfis de sensibilidade obtidos. A grande eficácia, principalmente dos agentes desinfetantes indica a importância de medidas terapêuticas, como a drenagem dos abscessos para o controle da linfadenite caseosa.

Palavras chave: enfermidade, patogenicidade, produtividade, terapia.

ABSTRACT

The caseous lymphadenitis is an important disease that affects sheep and goats, can be subclinical or lead to death of animals. This disease is associated with reduction in livestock productivity and causes severe losses to goat and sheep industry. Thus the adoption of control measures is very important. So, the removal of abscess and treatment with disinfectants and antimicrobial drugs can be recommended. The aim of this study was to characterize the sensitivity of *C. pseudotuberculosis* isolates to disinfectants and antibiotics, and to relate these profiles with the biofilm production. We evaluated 398 isolates, which after confirmation of the viability and purity, were subjected to sensitivity tests to antimicrobial drugs by modified Kirby Bauer test. The drugs were: novobiocin, florfenicol, neomycin, gentamicin, ampicillin, amoxicillin, penicillin G, enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, tetracycline, cephalothin, lincomycin and sulfazotrim. Sensitivity to disinfectants was determined by microdilution test using iodine, chlorhexidine, chlorine, quaternary ammonia and formaldehyde in the concentrations their use. The ability of isolates to produce biofilm was evaluated by the adhesion test in microplates followed by staining with gentian violet. With respect to antimicrobial sensitivity obtained was 0% for novobiocin, 100% for florfenicol, 89.19% for neomycin, 97.74% for gentamicin, 94.22% for ampicillin, 91.71% for amoxicillin 91.21 % for penicillin G, 99.25% to enrofloxacin 99.25% to ciprofloxacin, 98.74% for norfloxacin, 100% for tetracycline, 98.99% for cephalothin, 98.74% for sulfazotrim and 99.25% for lincomycin. The disinfectants were effective in 81.41% of the isolates in the case of iodine, 87.69% for chlorine, 99.50% for the quaternary ammonium and 100% for formaldehyde and chlorhexidine. Seventy-five percent of isolates were weak or non-biofilm producers which may explain the sensitivity profiles obtained. The great effectiveness, mainly of disinfecting agents indicates the importance of therapeutic measures, such as drainage of abscesses in the control of caseous lymphadenitis.

Keywords: disease, pathogenicity, productivity, therapy

1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa é causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sendo uma doença importante, que gera consideráveis perdas para a caprino-ovinocultura (ÇETINKAYA et al., 2002). O controle dessa enfermidade é difícil dentro de um rebanho, sua natureza subclínica e o longo período de incubação tornam difícil a distinção entre animais saudáveis e com a doença, por isso sua prevalência é alta (DORELLA et al., 2006).

Uma importante alternativa para o controle da enfermidade é a remoção de abscessos e aplicação de desinfetantes (SANTIAGO et al., 2010). O uso de antimicrobianos para tratamentos dos abscessos também é recomendado, embora com resultados controversos (ABREU et al., 2008; WASHBURN et al., 2009). Estas duas opções são muito importantes, pois visam reduzir a disseminação do patógeno no ambiente, a qual ocorre no momento da ruptura dos abscessos (BAIRD & FONTAINE et al., 2007).

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos é um fenômeno crescente e de grande importância à saúde humana e animal (PEEL et al., 1997). Vários mecanismos são associados a este fenômeno em bactérias do gênero *Corynebacterium* (OLSON et al., 2002). O biofilme consiste de microcolônias em uma superfície e são importantes estruturas associadas à patogenicidade dos microorganismos, uma vez que os protegem contra condições ambientais adversas (CLUTTERBUCK et al., 2007). Os biofilmes também são associados a infecções crônicas, sendo estas muitas vezes refratárias ao tratamento com drogas antimicrobianas, visto que estes compostos têm dificuldade de penetrar nos biofilmes, bem como as células do biofilme podem apresentar estados metabólicos reduzidos não assimilando os agentes terapêuticos (COSTERTON et al., 1999). Biofilmes já foram descritos em *C. pseudotuberculosis*, *C. renale* e *C. diphtheriae* (OLSON et al., 2002; GOMES et al., 2009). Os objetivos do presente estudo foram caracterizar a sensibilidade aos agentes antimicrobianos e desinfetantes de isolados de *C. pseudotuberculosis*, obtidos de casos de linfadenite caseosa. Da mesma

forma, relacionar os perfis de sensibilidade obtidos com a habilidade dos isolados em produzir biofilme.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, no *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) de Petrolina.

2.2. Isolados bacterianos

Um total de 398 isolados foram obtidos a partir de abscessos de linfadenite caseosa de caprinos e ovinos, provenientes de propriedades de Afrânio-PE, Floresta-PE, Jatobá-PE, Petrolândia-PE e Petrolina-PE, bem como de animais abatidos nos abatedouros de Petrolina-PE e Juazeiro-BA. As amostras foram semeadas primariamente em ágar Sangue ovino a 8% e os micro-organismos foram depois identificados por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme Quinn et al. (1994) e Holt et al. (1994).

2.3. Teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas

O teste de sensibilidade foi realizado pelo método modificado de difusão em disco Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966; CLSI, 2007), sendo o micro-organismo inoculado e incubado em caldo Muller Hinton por 24 horas a 37 °C, obtendo-se uma turvação na escala 0,5 de MacFarland, depois as amostras foram transferidas com auxílio de *swab* estéril para placas contendo Ágar Muller Hinton sangue ovino a 5%, utilizando os discos contendo os seguintes antibióticos: novobiocina (30 µg) e florfenicol (30 µg), os aminoglicosídeos: neomicina (30 µg), gentamicina (10µg); betalactâmicos: ampicilina (10 µg) amoxicilina (10 µg), penicilina G (10 µg); quinolonas: enrofloxacina(05 µg), ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10µg); tetraciclina: tetraciclina (30 µg); cefalosporina: cefalotina (30 µg); sulfonamidas: sulfazotrim(25µg); lincosamidas: lincomicina (2µg), logo após foram incubados a 37°C por 48 horas. Depois da incubação foram lidos os halos de inibição.

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos foi calculado dividindo-se o número de grupos antimicrobianos aos quais os isolados foram resistentes pelo total de grupos testados (KRUMPERMAM, 1983).

2.4. Teste de sensibilidade a desinfetantes

Para determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* para *C. pseudotuberculosis*, foram utilizados os desinfetantes com os seguintes princípios ativos: iodo, clorexidine, cloro, amônia quaternária e formol, seguindo descrições do protocolo M7-A7 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007). Os desinfetantes foram diluídos em caldo BHI-(Brain Heart Infusion Broth), para alcançar as concentrações de 0,125% de cloro, 15% de amônia quartenária, 2,5% de iodo, 5% de formol e 0,5% de clorhexidine. Na preparação do inóculo, colônias bacterianas foram incubadas em 3 mL de caldo BHI por 24 horas a 37 °C para a obtenção de uma suspensão com turvação equivalente a escala 0,5 de Mac Farland (10^6 Unidade Formadora de Colônia). Desta suspensão foram transferidos 100µL para o tubo contendo 9,9 mL também de caldo BHI, sendo que 10µL (10^4 UFC) serão colocados em cada poço contendo a diluição dos desinfetantes. As placas foram incubadas a 37°C por 48h. Após esse período foi retirada uma alíquota de

10µL de cada poço e semeada na superfície de ágar BHI incubando-a novamente por mais 48h a 37°C. Foi considerada como inibição quando não houve crescimento do micro-organismo. Para controle negativo, foi utilizado um poço apenas com o caldo BHI e para controle positivo foi utilizado um poço com o caldo BHI e o inóculo bacteriano. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. Produção de biofilme

Para a caracterização da produção fenotípica de biofilme foi utilizado o teste com a violeta de genciana. Como controle negativo para este teste foi utilizado um isolado de *Escherichia coli* DH5-alfa que não forma biofilme e também poços com caldo tripton de soja (TSB) estéril (MERINO et al., 2009). Os isolados de *C. pseudotuberculosis* foram incubados em três mililitros de TSB e incubados a 37°C por 48 horas. Em seguida, a análise quantitativa da formação de biofilme em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo reto foi realizada da seguinte forma: as suspensões bacterianas foram padronizadas em novo caldo TSB com densidade óptica (DO) de 0.2 em comprimento de onda de 570 nm. Então, 200 µL desta suspensão foram transferidos para os poços da microplaca e incubada a 37°C por 24h. Após a incubação o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 200µl de tampão fosfato salino (PBS) a 0,01M e pH 7,2. As bactérias que permaneceram aderidas foram fixadas com 200µl de metanol PA. Após quinze minutos, o conteúdo de cada poço foi aspirado e a microplaca ficou em temperatura ambiente para secar. Em seguida os poços foram corados por 5 min com 200µl de solução cristal violeta a 2% e lavados por seis vezes com água destilada. Depois ficou em temperatura ambiente até secar, o corante impregnado nas células bacterianas aderidas foi eluído com 160µl de solução de ácido acético a 33%. A DO de cada poço foi aferida em comprimento de onda de 570 nm utilizando leitor de ELISA (Leitora ELISA ASYS EXPERT PLUL BioChrom). Após a leitura as amostras foram classificadas em negativas ou positivas para formação de biofilme. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3. RESULTADOS

Para o teste de sensibilidade a antimicrobianos, os resultados percentuais estão descritos na Figura 1. Dos antibióticos testados obteve-se sensibilidade para as seguintes drogas: florfenicol (n=398/398), tetraciclina (n=398/398), lincomicina (n=395/398), enrofloxacina (n=395/398), ciproflaxacina (n=395/398), cefalotina (n=394/398), norfloxacina (n=393/398), sulfazotrim (n=393/398), gentamicina (n=389/398), ampicilina (n=375/398), amoxicilina (n=365/398), penicilina G (n=363/398), neomicina (n=355/398) e novobiocina (n=0/398).

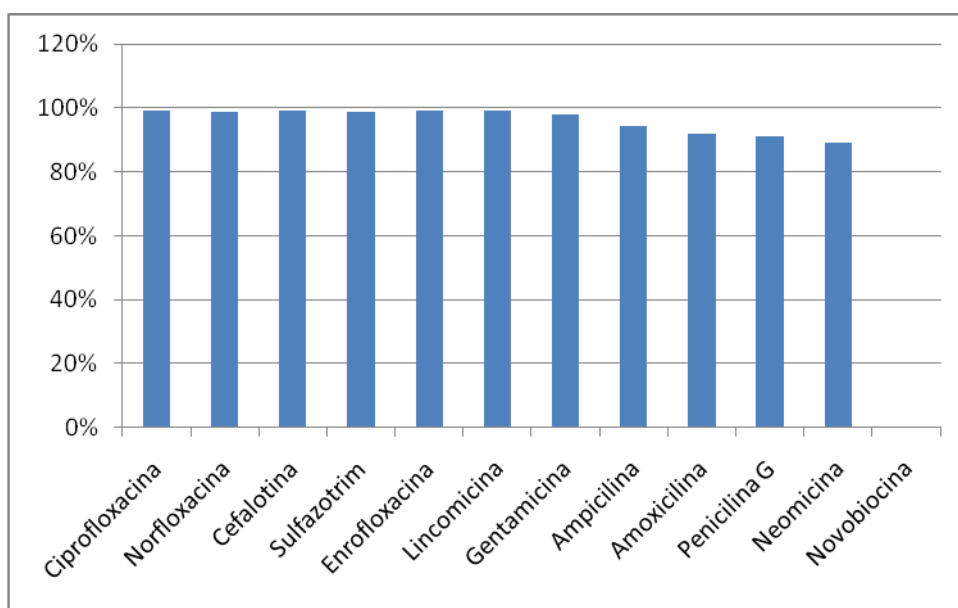


Figura 1. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de *C. pseudotuberculosis* obtidos de casos de linfadenite caseosa

Os resultados do teste de sensibilidade aos desinfetantes encontram-se descritos na Figura 2. Estes demonstraram que o clorexidine e o formol foram efetivos em todos os isolados testados (398/398), para a amônia quartenária foi de 99,50% (396/398), para o cloro a sensibilidade foi de 87,69% (349/398) e o iodo foi efetivo em 81,41% (324/398) dos isolados.

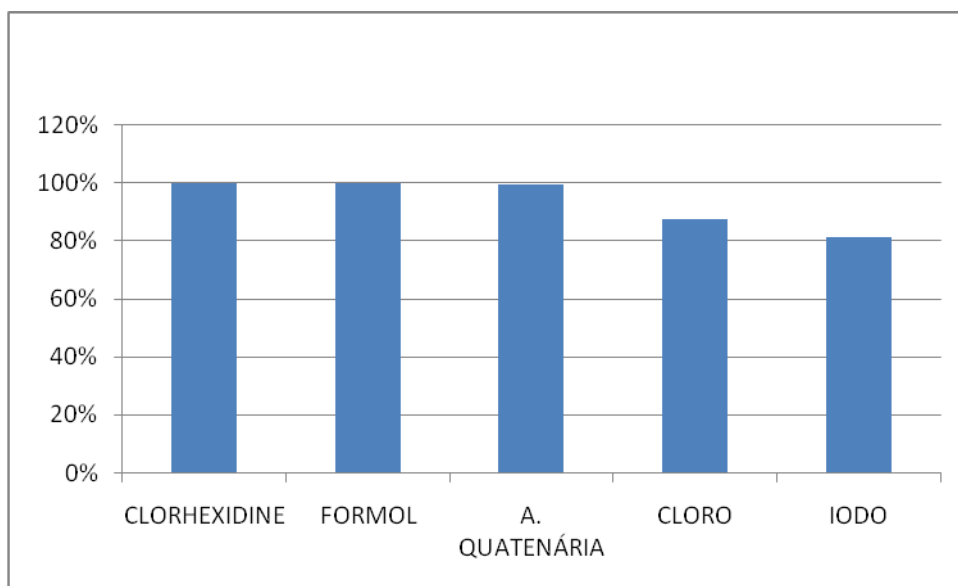


Figura 2. Perfil de sensibilidade a desinfetantes de amostras de *C. pseudotuberculosis* obtidos de casos de linfadenite caseosa

No teste para determinação da capacidade dos isolados em produzir biofilme observa-se que 32 amostras foram negativas para formação desta estrutura, porém houve uma formação fraca de biofilmes em 252 amostras. Enquanto que em 75 amostras aconteceu formação moderada de biofilmes e em 39 amostras obteve-se uma forte formação de biofilmes. Na Figura 3 observa-se o percentual de formação de biofilmes para as amostras estudadas.

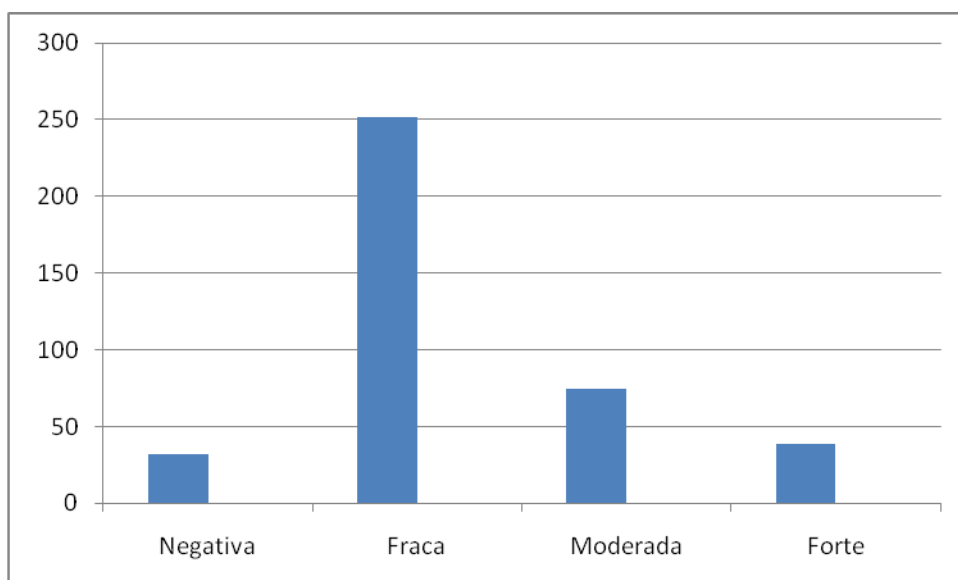


Figura 3. Presença de biofilmes em amostras de *C. pseudotuberculosis*

As médias dos índices de resistência múltipla às drogas antimicrobianas e aos desinfetantes em relação à produção de biofilme estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Média dos Índices de resistência múltipla aos antimicrobianos e desinfetantes de acordo com a produção de biofilme nos isolados de *C. pseudotuberculosis* obtidos de caprinos e ovinos.

Produção de Biofilme	IRMA Desinfetantes	IRMA Antibióticos
Negativa (n= 32)	0,131	0,156
Fraca (n= 252)	0,061	0,160
Moderada (n= 75)	0,045	0,164
Forte (n=39)	0,041	0,163

Onde: n: número de isolados IRMA índice de resistência múltipla, calculado conforme descrições de Krumperman, 1983.

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam uma alta sensibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos, sendo que treze das drogas testadas apresentaram eficácia superior a 89%. Mesmos resultados são descritos em relação aos testes *in vitro* realizados por outros pesquisadores (MUCKLE & GYLES 1982; ABREU et al., 2008). Nenhum dos isolados analisados neste estudo foi sensível a novobiocina, valor superior ao descrito por Abreu et al., 2008, que reportou uma resistência de 87,09%. A alta sensibilidade aos demais antibióticos é justificada, uma vez que os proprietários não fazem uso habitual de antibióticos na criação de caprinos e ovinos.

Embora a sensibilidade aos antimicrobianos diminua muito no animal, devido essa bactéria induzir a formação de uma cápsula fibrosa, que impede o contato entre o patógeno e o fármaco utilizado (BAIRD & FONTAINE, 2007). A terapia antimicrobiana normalmente é utilizada em animais de alto valor zootécnico, como uma alternativa ao descarte dos mesmos (ABREU et al., 2008; BAIRD & MALONE, 2010). Washburn et al. (2009) tentou três regimes de tratamento antimicrobiano para a linfadenite caseosa em ovelhas e cabras, utilizando a penicilina G e a tulatromicina, contudo estes não resultaram em sucesso. Um tratamento a base de rifampicina e oxitetraciclina através do acesso externo de linfonodos demonstrou resultado na redução de abscessos, contudo sem comprovação interna ou bacteriológica (SENTURK & TEMIZEL, 2006; BAIRD, 2006).

Os desinfetantes também são utilizados na busca de um controle para a linfadenite caseosa (SANTIAGO et al, 2010). Nesse estudo os desinfetantes testados demonstraram uma sensibilidade superior a oitenta por cento, sendo a maior atividade descrita para o formol e o clorexidine, que foram efetivos para todos os isolados. No presente estudo também foi avaliado o formol a 5%, encontrando uma sensibilidade para todos os isolados, contudo essa substância causa vários problemas quando utilizado no abscesso caseoso, incluindo a destruição dos tecidos epitelial e muscular, além de necrose (ALVES & PINHEIRO, 2003). Porém, o motivo para inclusão dessa substância na presente pesquisa foi o relato de uso por vários proprietários quando da coleta das amostras. Assim, essa substância requer mais estudos para minimizar seus efeitos tóxicos e carcinogênicos. Para o iodo, foi

encontrado uma sensibilidade de 81%, dados divergentes dos descritos por Santiago et al., (2010) que obtiveram a maior zona de inibição (63mm) testando a tintura de iodo a 10%. Pode-se justificar essa menor sensibilidade pelo uso constante do iodo em diversas concentrações por parte dos produtores no momento da extirpação do abscesso caseoso.

A maior parte dos isolados (71,35%) foi negativo ou fraco para produção de biofilme. Fato este que pode estar associado à grande sensibilidade observada aos antimicrobianos e desinfetantes. Ao compararmos o IRMA médio obtido para estes isolados verificamos que o índice foi menor para os antimicrobianos e maior para os desinfetantes, indicando uma possível associação entre a produção de biofilme e a resistência as drogas antimicrobianas. Bactérias produtoras de biofilme apresentam aumento da síntese de exopolissacarídeo, o que contribui para a resistência aos antibióticos (COSTERTON et al., 1999). Olson et al. (2002) ao testar a sensibilidade de *C. pseudotuberculosis* a sete antimicrobianos, entre eles a tetraciclina e a ampicilina, encontrou uma alta resistência quando as bactérias estavam em biofilme, quando comparadas com as formas plantônicas.

Nosso estudo indicou a grande sensibilidade tanto aos desinfetantes como aos antimicrobianos dos isolados de *C. pseudotuberculosis* avaliados. A remoção cirúrgica e aplicação de iodo esta entre as principais medidas de controle adotadas no Brasil (ALVES & PINHEIRO, 2003).

Segundo Baird & Malone (2010) embora práticas, a remoção cirúrgica e a terapia antimicrobiana sozinhas não são medidas eficazes de longo prazo para erradicação da LC. O uso de testes sorológicos e descarte dos animais podem apresentar melhores resultados. Os mesmos autores destacam que qualquer programa de controle da LC só é possível se os produtores estiverem motivados. Sendo este também um dos aspectos mais importantes para o controle da enfermidade na região do sertão pernambucano e baiano, de onde foram coletadas as amostras analisadas na presente pesquisa.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi verificada uma alta sensibilidade aos antimicrobianos estudados, bem como aos desinfetantes, o que pode estar relacionado com a pouca produção de biofilme pelo *C. pseudotuberculosis*, indicando a importância da drenagem dos abscessos com aplicação de antisséptico para controle da linfadenite caseosa.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE (Fundação de Amparo e Pesquisa de Pernambuco) pela concessão da bolsa de pós-graduação para estudante Maria da Conceição Aquino de Sá, bem como a bolsa de iniciação científica para Grace Barbosa dos Santos. Este trabalho foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Nº - 479624/2010-0).

Esse trabalho possui autorização do Comitê de Ética em Pesquisa em Estudos Humanos e Animais da Univasf sob o número 27091054 de 06 de outubro de 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S.R. O. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de Pernambuco, Brasil. **Vet. e Zootecnia**, v.15, n.3, p. 502-509, 2008.

ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R. Controle da Linfadenite Caseosa pela aplicação de solução de formol no abscesso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.25, n.3, p.130-132, 2003.

BAIRD, G.J, MALONE, F.E, Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA TESTING. **Veterinary Record**, v. 166, p. 358-362, 2010.

BAIRD, G.J, FONTAINE, M. C, *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J.Comp. pathol**, v. 137, p. 179-210, 2007.

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

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C. TURCK, M. **Antibiotic susceptibility testins by a standardized single disk method**. American Journal of Clinical Pathology, v.45, n. 4, p.493-496, 1966.

Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI 2007, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI/ NCCLS, M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLUTTERBUCK, A.L. et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.1-17, 2007.

COSTERTON, J.W, STEWART, P. S, GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections, **Science**, v. 284, 1999.

ÇETINKAYA, B. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Rev. Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 75-83, 2002.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Vet Rec**, v. 37, p. 201-218, 2006.

GOMES, D. L.R et al. *Corynebacterium diphtheriae* as na emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence, **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1419-1427, 2009.

HOLT, J. G., et. al, Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Holt J. G., Krieg N.R., Sneath P. H.A., Staley J. T(Eds)., **Bergeys's manual of determinative bacteriology**, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994. P. 593.

KRUMPERMAN, P.H, Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, p. 165-170, 1983.

MERINO, N. et al. Proteína A- Mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. V. 191, n. 3, p. 832-843, 2009.

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

OLSON, M. E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. V.66, p. 86-92, 2002.

PEEL, M. M. et al. Human Lymphadenitis Due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 185-191, 1997.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. WOLFE, 1994, 648p.

SANTIAGO, L.B et al. Avaliação in vitro da sensibilidade da corynebacterium pseudotuberculosis frente a diferentes tipos de antissépticos e desinfetantes e determinação de sua curva de crescimento, **Arq. Inst. Biol.**, v. 77, n. 4, p. 593-600, 2010.

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

WASHBURN, K.E. et al. Comparison of three treatment regimens for sheep and goats with caseous lymphadenitis. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 234, n.9, p. 1162-1166, 2009

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Petrolina-PE e região possui uma grande ocorrência de linfadenite caseosa, fato que pode estar associado à pouca adoção de tecnologias;

Os produtores precisam se conscientizar da importância da prevenção da enfermidade, principalmente na higienização dos utensílios e ferramentas, além do descarte adequado com o material caseoso;

Os isolados de *C. pseudotuberculosis* apresentaram fatores de virulência, sugerindo uma grande patogenicidade;

Foi encontrada sensibilidade dos isolados de *C. pseudotuberculosis* para drogas antimicrobianas, assim como aos desinfetantes clorexidine, amônia quartenária, cloro e iodo.

Para um programa de controle da linfadenite caseosa é necessário a motivação por partes dos produtores, principalmente na região do sertão pernambucano e baiano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. R. O. et al. Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco, **Pesq. Vet. Bras.** v. 28, n. 10, p.481- 487, 2008.

ABREU, S.R. O. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de Pernambuco, Brasil. **Vet. e Zootecnia**, v.15, n.3, p. 502-509, 2008a.

ALENCAR, S. P. et al. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco, **Ciência animal**, v.11, n. 1, p. 131-140, 2010.

AL-GAABARYA, A. S. et. al. Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. **Small Ruminant Research.** v. 94, p. 117-124, 2010.

ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R. Controle da Linfadenite Caseosa pela aplicação de solução de formol no abscesso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.25, n.3, p.130-132, 2003.

ALVES, M. L. et al. Linfadenite caseosa: Revisão de literatura. **Revista Científica Elet. de Med. Veterinária**, ano VI, n. 11, 2008.

ARSENAULT, J. et al. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Prev. Vet. Med.** v. 59, p. 67-81, 2003.

BAIRD, G.J, MALONE, F.E, Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA TESTING. **Veterinary Record**, v. 166, p. 358-362, 2010.

BAIRD, G.J., FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J. Comp. Pathol.** v.137, p. 179–210, 2007.

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

BANDEIRA, D. A. et al. Característica de produção da caprinocultura leiteira na região do Cariri na Paraíba, **Ciência Vetrinária Tropical**, v. 10, n. 1, p. 29 – 35, 2007.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C. TURCK, M. **Antibiotic susceptibility testins by a standardized single disk method**. American Journal of Clinical Pathology, v.45, n. 4, p.493-496, 1966

BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, p. 41-45, 2002.

BINNS, S. H., GREEN, L. E., BAILEY, M., Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 169-179, 2007.

BOUTONNET, J.P. Perspectives of the sheep meat world market on future production systems and trends, **Small Ruminant Research**, v. 34, p. 189-195, 1999.

BOYAZOGLUA, J., MORAND-FEHR, P. Mediterranean dairy sheep and goat Products and their quality A critical review, **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 1-11, 2001.

CARTER, G.R., **Diagnostic procedures in veterinary Bacteriology and mycology**, 5^a ed. California, Academic press Inc. p.620,1990.

Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI 2007, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI/ NCCLS, M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLUTTERBUCK, A.L. et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 1-17, 2007.

COSTA L.F.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Rev Cienc Med Biol**. v. 1, p. 105-115, 2002.

COSTERTON, J.W, STEWART, P. S, GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections, **Science**, v. 284, 1999.

ÇETINKAYA, B. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Rev. Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 75-83, 2002.

DERCKSEN, D. P. et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 167-175, 2000.

D' AFONSECA, V et al. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications, **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 252-260, n. 1, 2008.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, **Vet. Res.** v. 37, p. 201-218, 2006.

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

FONTAINE, M. C. et al. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, p. 5986-5996, 2006.

GOMES, D. L.R et al. *Corynebacterium diphtheriae* as na emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence, **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1419-1427, 2009.

GUIMARÃES, A. S. et al. Review: veterinary microbiology caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **The II OAB Journal**, v. 2, p. 33-43, 2011.

HIRSH, D.C, ZEE, Y. C, **Microbiologia Veterinária**, Guanabara Koogan, 2003, 446p.

HODGSON, A. L. et al. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using agenetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* Phospholipase D. **Vaccine**, v. 17, p. 802–808, 1999.

HODGSON, A. L.M et al. Protection of sheep against Caseous Lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5275-5280, n. 12, 1994.

HODGSON, A. L.M, BIRD, P, NISBET, I. T. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of the Phospholipase D Gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Journal of bacteriology**, v. 172, p. 1256-1261, n. 3, 1990.

HOLT, J. G., et. al, Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Holt J. G., Krieg N.R., Sneath P. H.A., Staley J. T(Eds)., **Bergeys's manual of determinative bacteriology**, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994. P. 593.

IBGE- <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default>, acesso em 18/06/2011.

JOST, B.H., BILLINGTON, S.J. *Corynebacterium* and *Arcanobacterium* in: GYLES, C. L., PRESCOTT, J.F., SONGER, G., THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 3 ed. John Wiley&Sons, 2004, p. 77-86.

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

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

KRUMPERMAN, P.H, Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, p. 165-170, 1983.

LANGENEGGER H, LANGENEGGER J. Monitoramento Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. **Pesq. Vet. Bras.** v. 11, p. 1-7, 1991.

MCKEAN, S. C, DAVIES, J. K, MOORE, R. J, Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death, **Microbiology**, v. 153, p. 2203-2211, 2007.

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

MERINO, N. et al. Proteína A- Mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**. V. 191, n. 3, p. 832-843, 2009.

MEYER, R., et al. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* **R. Ci. Méd. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.

MORRIS, S. T. Economics of sheep production, **Small Ruminant Research**, v.86, p. 59-62, 2009.

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

OLSON, M. E. et al. Biofilm bactéria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. V.66, p. 86-92, 2002.

OLIVEIRA, A. N. et al. Características da carcaça de caprinos mestiços Anglo-Nubiano, Boer e sem padrão racial definido, **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1073-1077, 2008.

PACHECO, L. G.C et al. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Microbiology**, v. 11:12, 2011.

PACHECO, L. G.C. et al. 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**, vol. 56, p. 480-486, 2007.

PEDROSA, K. Y. F et al. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na zona noroeste do Rio Grande do Norte. **Caatinga**, v. 16, n. ½, p. 17-21, 2003.

PEEL, M. M. et al. Human Lymphadenitis Due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 185-191, 1997.

PELCZAR JR., M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R., **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2ª Ed. São Paulo, 2007, 77 p.

PINHEIRO, R.R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.52, n.5, p.534-543, 2000.

QUINN, P.J., et al., **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 115-122p, 2005.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. WOLFE, 1994, 648p.

RIBEIRO, M. G. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arq. Inst. Biol.**, v. 68, n. 1, p. 23-28, 2001.

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

RIBEIRO, O. C. et al. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 26, n. 4, p. 461-465, 1991.

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J.A.H.; PEREIRA FILHO, M. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.10, n.2, p.23-24, 1988.

RIEGEL, P. et al. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* spp. **FEMS Microbiology Letter**, v. 126, n. 3, p. 271–276, Mar. 1995.

RIET-CORREIA, F, SCHILD, A. L, MENDEZ, M.D.C, LEMOS, R.A.A, **Doenças de Ruminantes e Equinos**, Livraria Varela, 2001, vol. 1, 426 p.

RUIZ, J. C. et al. Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains, **PLoS ONE** , v. 6, p. 1-16, 2011.

SAMPAIO, B. et al. A Economia da Caprinocultura em Pernambuco: Problemas e Perspectivas, **Revista de Economia**, v. 35, n. 2, p. 137-159, Editora UFPR, 2009.

SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle**. 1ª ed. Brasília/Sobral: EMBRAPA, 1996, 167-170p.

SANTIAGO, L.B et al. Avaliação in vitro da sensibilidade da *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a diferentes tipos de antissépticos e desinfetantes e determinação de sua curva de crescimento, **Arq. Inst. Biol.**, v. 77, n. 4, p. 593-600, 2010.

SIMMONS, C. P et al. Vaccine Potential of Attenuated Mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep, **American Society for Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 474-479, 1998.

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

SOUZA, M.F. et al. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba, **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 3, p. 224-230, 2011.

VALE, V., et. al. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Rev Cienc Med Biol*. v. 2, p. 192-200, 2003.

VIDAL, M. F. et al. Análise econômica da produção de ovinos em lotação rotativa em pastagem de capim Tanzânia(*Panicum maximum*(Jacq)), **R.E.R**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 04, p. 801-818, 2006.

WASHBURN, K.E. et al. Comparison of three treatment regimens for sheep and goats with caseous lymphadenitis. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 234, n.9, p. 1162-1166, 2009