

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Corynebacterium*
pseudotuberculosis ovis ISOLADAS DE OVINOS E CAPRINOS**

Patrícia Rodrigues de Melo

CAMPO GRANDE, MS
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**Caracterização de amostras de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas
de ovinos e caprinos**

Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from
sheep and goats

Patrícia Rodrigues de Melo

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Grácia Maria Soares Rosinha

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS
2013

Certificado de aprovação

PATRÍCIA RODRIGUES DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *CORYNEBACTERIUM*
PSEUDOTUBERCULOSIS ISOLADAS DE OVINOS E CAPRINOS**

**Characterization of samples of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates
from sheep and goats**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

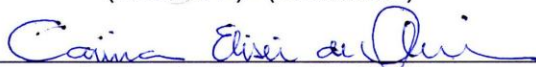
Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado (a) em: 30/07/2013

BANCA EXAMINADORA:



Doutora Grácia Maria Soares Rosinha
(EMBRAPA) - (Orientadora)



Doutora Carina Elisei de Oliveira
EMBRAPA



Doutora Simone Simionatto
UFGD

A Deus...

*E aos que dedicaram
suas vidas por mim em terra:
mãe, pai, e avós maternos e
paternos. A eles todo o meu amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom maravilhoso da vida, que sempre renova minhas forças e me mostra o caminho a seguir, por estar a todo o momento presente, a ele toda honra, glória e louvor por cada momento maravilhoso, por cada presente dado todos os dias, por cada aprendizado. Por cada oportunidade colocada em meu caminho. Obrigada Pai Celestial!

À minha mãe Edilamar Rodrigues de Melo, por todos os ensinamentos que tens me transmitido desde o início da minha vida, sempre ao meu lado vibrando por cada conquista e me apoiando em todos os meus sonhos. Esta conquista é tua. Obrigada por toda dedicação, e por ter feito o impossível para que eu estivesse feliz, e fazendo aquilo que amo. Mãe amo você!

Ao meu querido pai Antônio José de Melo que hoje faz sua morada no plano espiritual, por ter sido o primeiro a acreditar no meu sonho, se orgulhar, e fazer o impossível para que tudo se realizasse. Apesar de não estar presente de corpo, sei que está ao meu lado. Agradeço e dedico toda conquista a você. Amo você. Saudade eterna!

A minha família em especial aos meus queridos avós, meus amados irmãos, e a meu tio Edilson José de Melo que fez a diferença em minha vida, especialmente após a partida de meu pai, o qual hoje eu considero como um segundo pai, sempre confiando, me encorajando e com palavras que fizeram toda diferença em minha vida.

A minha orientadora Grácia Maria Soares Rosinha, que abriu as portas para o início da minha vida profissional, obrigada por toda a confiança, ensinamentos, paciência, apoio, orientação, e pela oportunidade. Obrigada!

Aos meus colegas de laboratório que desde os tempos da iniciação científica tem me acompanhado e muito me ajudaram, obrigada a todos pelo apoio.

A professora Dr^a Gisele Brasiliano de Andrade, pelo auxílio e dedicação para o enriquecimento deste trabalho. Obrigada pela paciência, gentileza, pelo tempo cedido e pelos ensinamentos, passamos pouco tempo juntas, mas fez toda a diferença, levarei ensinamentos para a minha vida. Grata!

E a todos aqueles que de maneira indireta me ajudaram e torceram muitos deles não imaginam o quanto sou grata, sejam por uma palavra amiga de conforto, ou mandando energias positivas para a concretização de um sonho.

Gratidão!!!

*Um pequeno grão de alegria e esperança dentro do
coração de cada um é capaz de transformar qualquer
coisa... Pois a vida é construída nos sonhos e
concretizada no AMOR.*

Chico Xavier

Resumo

MELO, P.R. Caracterização de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* isoladas de ovinos e caprinos. 2013. xx f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

O objetivo nesse estudo foi a caracterização bioquímica, genotípica e análise de virulência e patogenicidade de amostras isoladas de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. Foram utilizadas cinco amostras: CBO (*Corynebacterium* Ovino) 2512, CBO 28033, CBC (*Corynebacterium* Caprinos) 70D, CBC 118, CBC NPC e duas amostras controle 1002 (Linfovac) e (00512 Fiocruz). Para a identificação bioquímica, utilizou-se o kit APIcoryne (Bio Merieux-França), que confirmou todas as amostras como *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. A caracterização genotípica foi realizada pelo teste de PCR-RFLP, para a restrição do gene *rpoB*, com as enzimas *MseI* e *StuI*. Que geraram fragmentos de 98 e 348 pb, e 191 e 255 pb respectivamente, para todas amostras incluindo as duas amostras controle. Indicando que não houve variabilidade genotípica entre as amostras. As amostras foram avaliadas quanto à virulência e patogenicidade, em camundongos BALB/c com inoculação de quatro doses de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL). A análise de virulência revelou que as amostras CBO 2512 e CBO 28033 inoculadas com 1×10^6 UFC/mL nos camundongos, foram mais virulentas, pois causaram 100% de morte. A partir do teste de patogenicidade, foi observado que as amostras CBC 70D, CBC NPC, CBC 118 são patogênicas, e pouco virulentas. A análise anatomopatológica caracterizou macroscopicamente e microscopicamente, os abscessos desenvolvidos pela *C. pseudotuberculosis* em órgãos. Histologicamente estes foram caracterizados por uma área central de necrose, área de infiltrado inflamatório e cápsula do abscesso formado pelo tecido conjuntivo fibroso. Concluindo que este trabalho bem caracterizou as cinco amostras de *C. pseudotuberculosis*, e servirá de base para pesquisas futuras, envolvendo a análise genômica, testes diagnósticos, tratamentos e vacinas para a linfadenite caseosa.

Palavras - chave: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, virulência, patogenicidade, PCR-RFLP, anatomopatologia.

ABSTRACT

MELO, P.R. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats. 2013. xx f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

The aim of this study was the biochemical characterization, and genotypic analysis of virulence and pathogenicity of isolates of *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. Five samples were used: CBO (*Corynebacterium* Ovino) 2512, CBO 28033, CBC (*Corynebacterium* Caprinos) 70D, CBC 118, CBC NPC and two control samples 1002 (Linfovac) e (00512 Fiocruz). For biochemical identification, was used kit APICoryne (Bio Merieux-França), confirmed that all samples as *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. The genotypic characterization was performed by test PCR-RFLP, for restriction the gene *rpoB*, with the enzymes *MseI* and *StuI*. Which generated fragments of 98 and 348 bp, 191 and 255 bp respectively, for all samples including the two control samples. Indicating no genotypic variability among samples. He samples were evaluated for virulence and pathogenicity in BALB / c mice inoculated with four doses of colony-forming units per milliliter (CFU/mL). Virulence analysis revealed that the strains CBO 2512 and CBO 28033 inoculated with 1×10^6 CFU/mL in mice, were more virulent, because death caused 100%. From the pathogenicity test was observed that the samples CBC 70D, CBC NPC, CBC 118 are pathogenic, and slightly virulent. the anatomopathologic analysis has characterized macroscopically and microscopically, abscesses developed by *C. pseudotuberculosis* in organs. Histologically, they were characterized by a central area of necrosis, area of inflammatory infiltrate and abscess capsule formed by fibrous connective tissue. Concluding that this work well characterized the five samples of *C. pseudotuberculosis*, and serve as the basis for future research involving genomic analysis, diagnostic tests, treatments and vaccines for caseous lymphadenitis.

Keywords: caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, virulence, pathogenicity, PCR-RFLP, anatomopathology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 LINFADENITE CASEOSA	10
2.1 MICROBIOLOGIA.....	11
2.2 BIOQUÍMICA.....	12
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	12
2.3.1 Distribuição	13
2.3.2 Hospedeiros	13
2.3.3 Transmissão	14
2.4 PATOGENIA	15
2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	16
2.6 DIAGNÓSTICO.....	17
2.6.1 Diagnóstico Padrão-ouro	17
2.6.2 Diagnóstico Molecular	17
2.6.3 Diagnóstico Sorológico	18
2.7 IMUNOLOGIA	18
2.8 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....	19
2.9 ANATOMOPATOLOGIA.....	21
REFERÊNCIAS	24
Caracterização de amostras de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> isoladas de ovinos e caprinos.....	29
RESUMO.....	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	43
AGRADECIMENTOS	46
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A ovinocaprinocultura de corte está inserida por todo o mundo. Esta atividade apresenta suma importância principalmente para os pequenos e médios produtores. A criação de ovinos e caprinos possui um grande potencial e apresenta uma boa alternativa de produto para o setor agropecuário. Os produtos oriundos dessa atividade incluem a produção de leite, carne, lã e couro. Esses rebanhos são adaptáveis às condições adversas encontradas nos diferentes biomas.

Segundo o IBGE o efetivo de ovinos no ano de 2011 foi de 17.662.201 milhões, com crescimento de 1,62% comparado ao ano de 2010, e o efetivo de caprinos foi de 9.384. 894 milhões, com crescimento de 0,77%. O Estado da Bahia se destaca no setor de caprinos, representando o maior rebanho do Brasil com 2.741.818 milhões, e, para o setor de ovinos, o destaque é para o Rio Grande do Sul, com rebanho de 4.000.297 milhões. O estado do Mato Grosso do Sul representa 39.556 do efetivo de caprinos e 497.631 cabeças de ovinos (IBGE 2011).

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecciosa crônica, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (ALVES et al. 2007). Esta se caracteriza pela formação de abscessos com um conteúdo caseoso, que pode se manifestar em duas formas: superficial, que acomete os linfonodos superficiais, e profundo que atinge linfonodos mais profundos e também os órgãos dos animais infectados. Esta doença constitui grande importância do ponto de vista econômico, acarretando grandes perdas no setor leiteiro, condenação e desperdício de carcaças, e a desvalorização da pele e da lã (BROWN et al. 1985).

Esta doença tem sido relatada em diversos países, incluindo o Brasil, Nova Zelândia, Estados Unidos, Austrália, África do Sul, França, Reino Unido e Canadá (CONNOR et al. 2000, PATON et al. 2010).

A transmissão ocorre de forma direta através do contato com ferimentos na pele ocasionados de procedimentos comuns tais como tosquia e castração (SOARES et al. 2013). A disseminação e a transmissão estão relacionadas com a detecção tardia, principalmente na forma visceral da doença, que só é possível ser detectado no exame *post mortem*, ou na hora do abate em frigoríficos.

Apesar de sua grande importância, principalmente pelas perdas ocasionadas neste setor, não há diagnóstico, vacina e tratamento eficiente, itens esses indispensáveis no combate e erradicação da LC. O diagnóstico geralmente utilizado é a cultura bacteriana do material purulento que se encontra no abscesso, seguido de teste bioquímico e eventualmente teste

molecular. No entanto esses métodos são utilizados após a punção aspirativa dos abscessos superficiais. No caso da manifestação interna, esses métodos são incapazes de identificar a doença (DORELLA et al. 2009). O tratamento é realizado com antibióticos, no entanto este procedimento não é recomendado, pois além de necessitar de um longo período para o tratamento, os fármacos utilizados não penetram a cápsula do abscesso e assim não combatem o microrganismo. Na tentativa de controlar a doença no rebanho, é realizada a extirpação dos abscessos externos, método também ineficiente visto que não ocorre a eliminação da bactéria do organismo. Além disso, pode ocorrer a descarga do material contaminado no ambiente onde se localiza o rebanho, e pode resultar na infecção de animais sadios (VOIGT et al. 2012).

Faz-se necessário a realização de novos estudos para o conhecimento mais detalhado e completo de *C. pseudotuberculosis*. O entendimento aprofundado da biologia de *C. pseudotuberculosis*, auxiliará em futuros estudos, contribuindo para o desenvolvimento de novas vacinas e auxílio no controle e erradicação da LC. Portanto, as investigações sobre as variações genéticas realizadas por meio da caracterização molecular entre amostras da mesma espécie elucidarão dúvidas sobre o comportamento epidemiológico desse agente infeccioso (ABREU et al. 2013). As técnicas mais avançadas tais como a PCR-RFLP, e a utilização de genes com regiões hipervariáveis, auxiliam no diagnóstico, e se destacam por diferenciar *C. pseudotuberculosis* de outras espécies e que apresentam sinais clínicos semelhantes (PAVAN et al. 2012).

Os estudos de patogenicidade e virulência das amostras selvagens em camundongos podem auxiliar no desenvolvimento de novas vacinas e testes diagnósticos. Neste contexto, objetiva-se neste trabalho a caracterização bioquímica, genotípica, análise de virulência e, patogenicidade das amostras isoladas de *C. pseudotuberculosis* e o estudo anatomopatológico dos animais inoculados.

2 LINFADENITE CASEOSA

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente causador da LC, uma doença infectocontagiosa crônica, considerada também uma zoonose ocupacional (ALVES et al. 2007). Em ovinos e caprinos a LC pode causar abscessos nos linfonodos superficiais como: parotídeo, poplíteos, pré-crurais, pré-escapulares, submandibulares, supramamários, e em linfonodos profundos como nos tecidos subcutâneos, linfonodos mediastínicos e bronquiais, e

pode desenvolver abscessos também em vísceras como nos pulmões, fígado, rins e baço (BINNS et al. 2007, GUIMARÃES et al. 2011).

Esta doença é responsável por significativos prejuízos econômicos para a cadeia produtiva de ovinos e caprinos no mundo todo. Causa a redução no rendimento da carne, leite, lã, afeta a eficiência reprodutiva, além da condenação das carcaças e da pele nos abatedouros (ARSENAULT et al. 2003). Na maioria dos casos a LC não manifesta sinais clínicos, sendo possível observar a doença somente após o exame *post-mortem*.

A *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi descrita pela primeira vez por Edmond Isidore Etienne Nocard em 1888, a partir de um caso de linfangite bovina (ALVES et al. 2007). Em 1891, o bacteriologista Hugo Von Preïsz identificou uma bactéria similar, isolada de um abscesso encontrado no rim de um ovino. Desde então esta bactéria foi conhecida durante alguns anos como bacilo Preïsz-Nocard. Este nome designado à esta bactéria sofreu várias alterações ao longo do tempo, até que em 1980 o termo *C. pseudotuberculosis* foi oficialmente reconhecido. Sua nomenclatura atual foi adotada em 1948, na 6ª edição do *Bergey's Manual* (BAIRD & FONTAINE 2007).

2.1 MICROBIOLOGIA

Corynebacterium pseudotuberculosis caracteriza-se como bacilo Gram-positivo, podendo apresentar-se na forma cocóide, isolado ou formando agrupamentos irregulares; são imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos, não esporulam e medem entre 0,5-0,8 µm por 1,0-3,0 µm (SANTOS et al. 2009). As bactérias do gênero *Corynebacterium*, são agrupadas com bactérias do gênero *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, os quais fazem parte do grupo dos actinomicetos aeróbicos, caracterizadas por apresentar uma camada densa, externa à parede celular, compostas por lipídeos (ALVES et al. 2007, MOTTA et al. 2010).

A condição ideal para seu crescimento é de 37° C a um pH de 7,0 a 7,2, o tempo de incubação varia entre 48 ou 72 horas (DORELLA et al. 2006). Os meios de cultura utilizados são os enriquecidos como Ágar sangue, ágar infusão de coração e cérebro (BHI) ou caldo BHI. Também cresce em meios enriquecidos com soro animal ou proteínas vegetais. Adicionando extrato de levedura, triptona ou lactoalbumina, consegue-se um crescimento melhor (DORELLA et al. 2009, ALVES et al. 2007). No meio sólido enriquecidos com

sangue, a bactéria apresenta uma característica morfológica que é a formação de pequenas colônias brancas arredondadas no período de 24 a 48 horas, após esse tempo as colônias aumentam de tamanho e passam a apresentar uma coloração creme. Em meio líquido, após 24 horas, é possível visualizar o crescimento da bactéria formando um alo em volta do tubo falcon com a formação de uma película, resultado da sua característica hidrofóbica e uma leve turvação do meio. Setenta e duas horas é o tempo ideal de incubação para o crescimento (COSTA et al. 2002). *C. pseudotuberculosis* é sensível a antibióticos tais como: cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetropim e penicilina G, no entanto a susceptibilidade pode variar de acordo com cada isolado (DORELLA et al. 2009).

2.2 BIOQUÍMICA

Bioquimicamente, *C. pseudotuberculosis* caracteriza-se pela produção de catalase, urease, redução de nitrato a nitrito, fermentação de carboidratos sem produção de gás como: manose, glicose, maltose, galactose (variável), não fermenta lactose, não tem atividade proteolítica, não hidrolisa a gelatina e não digere a caseína. É oxidase negativa, beta-hemolítica, e produz a exotoxina fosfolipase D (DORELLA et al. 2006). Pode haver diferenças entre os resultados nas provas bioquímicas, principalmente na capacidade de fermentação, isso porque há diferenças de biovariedades entre as cepas (ALVES et al. 2007, Costa 2002). O teste mais indicado para as provas bioquímicas para o gênero *Corynebacterium* é o sistema API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France), este consiste em uma bateria de 21 testes bioquímicos realizados no período entre 24 a 48 horas. O kit contém 20 microtubos contendo os substratos para 11 testes enzimáticos que são: pirazinamidase, redução de nitrato, fosfatase alcalina, β -galactosidase, pirrolidonil arilamidase, α -glucosidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, hidrolise de gelatina, aesculina, uréase e glucuronidase. Contêm também testes para fermentação de carboidratos composto por 8 testes: manitol, maltose, sacarose, glucose, D-Xylose, glicogênio, lactose e ribose (SOTO et al. 1994). A bactéria é classificada em dois biovars: *C. pseudotuberculosis ovis*, responsável por provocar a doença em ovinos e caprinos e *C. pseudotuberculosis equi*, que causa a doença em equinos e bovinos. Essa diferença é dada pela redução de nitrato negativa para o biovar *ovis* e redução de nitrato positiva para o biovar *equi* (GUIMARAES et al. 2011).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

2.3.1 Distribuição

A LC possui uma distribuição mundial. A disseminação da LC pelo mundo se deu pela importação de ovinos e caprinos, onde o trânsito de animais infectados levou a bactéria, que é altamente resistente, a países onde antes não havia a doença. *Corynebacterium pseudotuberculosis* tem sido identificada em países que apresentam grande rebanho de caprinos e ovinos, como Austrália, Argentina, África do Sul, Estados Unidos, Nova Zelândia, Uruguai, Chile, França, Itália, Grã-Bretanha, Sudão, Turquia, União Soviética, Dinamarca, Nigéria e Brasil (BILLINGTON et al. 2002, COSTA 2002, ARSENAULT et al. 2003, BATEY, 1986, LANGENEGGER et al. 1991). No Brasil já foi identificada a ocorrência da doença em alguns Estados, como por exemplo, Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul, e nos Estados do Nordeste onde possuem os maiores rebanhos do país, principalmente de caprinos, que resulta, conseqüentemente, em uma alta prevalência da doença, causando grandes prejuízos, principalmente para os pequenos criadores que têm a ovinocaprinocultura como sua principal atividade econômica (COSTA, 2002).

2.3.2 Hospedeiros

Diversos mamíferos podem ser hospedeiros para *C. pseudotuberculosis* e desenvolver a LC tais como: ovinos, caprinos, camelídeos, equinos, bovinos, suínos, antílopes, cervídeos, bubalinos (BASTOS 2012, BAIRD & FONTAINE 2007, SPRAKE et al. 2012).

Nos bovinos os sintomas clínicos já descritos incluem: a formação de abscessos, reações piogranulomatosas, linfagite ulcerativa, mastites. Recentemente foram descritas outras formas da doença em bovinos como a dermatite necrótica e ulcerosa no calcanhar do pé, e uma forma rara da doença que é a linfadenite caseosa mesentérica (YERUHAM et al. 2003, SOOD et al. 2012).

Corynebacterium pseudotuberculosis em bubalinos causa a doença denominada edema cutâneo, que se caracteriza por um edema difuso com adelgaçamento da pele (SELIM, 2001). Em equinos, assim como nos bovinos, a doença desenvolvida é a linfangite ulcerativa. Esta é uma das doenças infecciosas mais comuns nesses animais, e afeta potencialmente a economia. A forma mais comum da doença em equinos é o desenvolvimento de abscessos profundos e superficiais, e acomete também os órgãos (CERDEIRA et al. 2011).

Em camelos, a linfadenite caseosa é causada pela *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*, que forma abscessos em linfonodos superficiais e profundos e em vísceras principalmente no fígado e pulmão (HAWARI et al. 2008). Os camelídeos da América do Sul e do Norte como as alpacas também estão sendo relatadas como hospedeiros do patógeno causador da LC, apresentando abscessos nos linfonodos renais e gânglios linfáticos superficiais (SPRAKE & GOLD et 2012). Um caso foi descrito por Filgueira et al. (2010) de infecção por *C. pseudotuberculosis* causando a piodermite profunda em cotia, apresentando sinais como eritema e celulite na face ventral da cabeça e alopecia. No entanto este foi apenas um caso, onde se faz necessário mais estudos e investigação de piodermite profunda e sua associação a este microrganismo.

Foi realizado um estudo utilizando antílopes de uma reserva de caças na África do Sul, onde foram inspecionados para o comércio de carne. Os testes bioquímicos realizados mostraram a redução de nitrato negativa significando que esses animais são infectados por *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. Esses animais apresentaram lesões granulomatosas e necróticas nos pulmões e lesões necróticas no linfonodo bronquial (MÜLLER et al. 2011).

2.3.3 Transmissão

Corynebacterium pseudotuberculosis possui uma alta capacidade de sobrevivência por um longo tempo no ambiente, sendo no animal a sobrevivência por tempo indeterminado, no solo por oito meses, no feno por oito semanas e na madeira um mês, o que facilita a disseminação da doença por todo o rebanho. A transmissão do patógeno pode variar de acordo com o biovar e a espécie hospedeira de *C. pseudotuberculosis*. Para *C. pseudotuberculosis* biovar *equi*, que infecta bovinos, equinos e bubalinos, a transmissão ocorre de forma direta, através do contato com o material purulento dos abscessos e pode ocorrer indiretamente por meio de vetores mecânicos, como por exemplo moscas. Em cavalos foram identificados três espécies de vetores mecânicos: *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans*, *Musca domestica* (YERUHAM, 1996, SPIER et al. 2004).

Para *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* a transmissão ocorre por meio do contato direto ao material purulento dos abscessos, onde se encontra a bactéria, no ambiente em que os animais estão alojados. A descarga ocorre principalmente por meio do rompimento dos abscessos externos, que podem ser perfurados durante manejo dos animais ou pela presença

da vegetação com espinhos que quando em contato com os abscessos podem perfurá-los e contaminar o ambiente onde um animal saudável pode passar e se infectar.

A porta de entrada deste microrganismo se dá por meio de ferimentos na pele que ocorrem durante o manejo dos animais como a castração, o cisalhamento, marcações, colocação de brincos, tosquia de ovinos ou alguma outra forma que possa ferir a pele do animal. Além disso, a transmissão pode ocorrer também pela entrada do agente etiológico pelas mucosas, por infecção via oral e respiratória, ou por aerossol de abscessos pulmonares sobre a pele de animais que sofreram lesões (WILLIAMSON et al. 2001; DORELLA et al. 2006, AUGUSTINE & RENSHAU 1986, MOTTA et al. 2010, ABREU et al. 2007).

Os banhos de imersão, que ocorrem após a tosquia, são considerados um dos principais meios de transmissão e persistência da doença no rebanho de ovinos. A transmissão pode ocorrer também pelo contato com agulhas, aparelhos de tosquia, contaminados com o agente (PATON et al. 1996, ANDRADE et al. 2012).

Além das infecções horizontais, podem ocorrer também as infecções verticais e ocasionar desordens reprodutivas tais como aborto, redução na taxa de crescimento dos cordeiros e mortalidade neonatal (ABREU et al. 2007).

2.4 PATOGENIA

A LC em sua forma externa ou superficial compromete a pele no caso dos caprinos e a lã e pele no caso dos ovinos. Esta doença possui uma alta capacidade de disseminação no organismo do animal, o que leva o desenvolvimento de abscessos em vários lugares. Externamente atingem principalmente os linfonodos parotídeo, retrofaríngeo, mandibular, submandibular, poplíteo, inguinal, pré-escapular, mamário, supramamários e pré-crurais (ALVES et al. 2007, AL-GAABARY et al. 2009).

Na forma interna, as lesões podem acometer o rim, pulmões, fígado, baço, intestino, encéfalo, coração (SANCHES et al. 2008, JESSE et al. 2011). Quando a doença se desenvolve na forma interna, causa emagrecimento progressivo, deficiência reprodutiva e diminuição da produção de leite. Esta é considerada a forma mais grave da doença podendo levar o animal à morte (OLIVEIRA et al. 2011, MOTTA et al. 2010).

As duas formas da doença podem se desenvolver ao mesmo tempo em um mesmo animal. Uma vez que o animal entra em contato com *C. pseudotuberculosis* imediatamente é drenada para o linfonodo mais próximo do local da infecção, e logo o sistema imune começa a

responder à presença do patógeno, imediatamente são recrutados muitos macrófagos e células polimorfonucleares que se acumulam no linfonodo e fagocitam a bactéria. A fagocitose neste caso é ineficiente, pois a bactéria resiste ao compartimento fagolisossoma dos macrófagos e conseqüentemente o microrganismo continuam se multiplicando e ocasiona a morte dos macrófagos. (SOUZA et al. 2011) Esta incapacidade das células imunológicas eliminar a bactéria ocorre devido a alguns fatores tais como: a presença da densa camada lipídica localizada na parede celular da bactéria, a resistência ao óxido nítrico, um potente agente efetor para a eliminação de patógenos intracelulares, produzido pelos macrófagos (GREEN, 1991). Com a morte dessas células o microrganismo é liberado, e em seguida há a formação de lesões necróticas. Sucessivamente este microrganismo se replica, infectam outras células e a partir daí colonizam os linfonodos regionais e pode atingir outras células e também os órgãos. (SANCHES et al. 2008)

Com a morte das células hospedeiras, e na tentativa de eliminar o microrganismo, ocorrem lesões piogranulomatosas resultando no acúmulo de material purulento caseoso que vai sendo envolto por infiltrado inflamatório de linfócitos, células epitelióides, neutrófilos, circundado por uma camada de tecido conjuntivo fibroso e à medida que a lesão progride formam-se regiões de necrose. Estes processos vão se repetindo formando camadas, e em volta dessas camadas se forma uma cápsula fibrosa e rígida, características essa de uma doença crônica (DOMINGUETE et al. 2011).

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os estudos envolvendo os fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis* ainda são muito escassos. Os fatores de virulência são estratégias utilizadas pelas bactérias para a sobrevivência nas células hospedeiras, invasão, colonização, propagação dentro do organismo do animal e mecanismos para driblar o sistema imunológico (SOARES et al. 2013).

Billington et al. (2002), realizaram um estudo com 4 genes, *Fag A, B, C e D*, codificantes de proteínas relacionadas na absorção de ferro pela bactéria. Esses genes são similares a outras bactérias que possuem os genes ABC, também relacionados à captação de ferro. Estes estudos revelaram que os genes *Fag A, B, C e D*, são importantes para a virulência de *C. pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos, permitindo também a sobrevivência em ambientes escassos de ferro.

Corynebacterium pseudotuberculosis é capaz de produzir uma potente exotoxina, descrita primeiramente por Carne (1940), a fosfolipase D (PLD). Esta exotoxina é encontrada no citoplasma e, em menor quantidade, na parede celular bacteriana. Sua massa molecular varia de 14.500 a 31.000 Daltons. A PLD é considerada como o principal fator de virulência dessa bactéria o qual é responsável por catalisar a dissociação de esfingomiéline, fosfato e colina e hidrolisam os glicerofosfolipídeos da membrana celular, facilitando assim a entrada do patógeno nas células hospedeiras. Esses eventos tornam esta bactéria altamente virulenta. A prevalência de *C. pseudotuberculosis* no animal infectado se dá também, pela produção da proteína PLD. Esta teoria ligada a alta virulência e prevalência, é apoiada por evidências experimentais, em que o gene *pld* foi excluído do cromossomo ou inativado por mutação, tornando a bactéria incapaz de causar abscessos nos linfonodos dos animais, característica principal da linfadenite caseosa (BAIRD et al. 2007).

Outro fator de virulência também importante é a presença dos lipídeos encontrados na parede celular bacteriana. Estes lipídios se assemelham ao ácido micólico de *Mycobacterium pseudotuberculosis*. Esses lipídeos dificultam a fagocitose e promovem a toxicidade das células hospedeiras (COSTA et al. 2002), favorece a formação de edemas, formação dos abscessos e disseminação do agente etiológico (SONGER et al. 1997).

2.6 DIAGNÓSTICO

2.6.1 Diagnóstico padrão-ouro

Inicialmente a detecção de *C. pseudotuberculosis*, é feita pela observação de abscessos localizados nos linfonodos superficiais, que exibem características tais como a presença de material caseoso que apresenta uma coloração esverdeada de aparência opaca (BROW, 1987). O diagnóstico padrão-ouro para a LC é a cultura bacteriana, que é realizado a partir de amostras retiradas diretamente dos abscessos externos, para o isolamento da bactéria, seguido de provas bioquímicas, sendo recomendado para este fim, a realização do teste API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France), um teste bem estabelecido para identificar bactérias pertencentes ao gênero *Corynebacterium* (RIBEIRO et al. 2001, WILLIANSO, 2001, OLIVEIRA, 2011).

2.6.2 Diagnóstico Molecular

Os testes moleculares vêm sendo desenvolvidos, buscando novas estratégias, para o diagnóstico da LC. Çetinkaya e colaboradores (2002) elaboram testes baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), visando identificar *C. pseudotuberculosis* por meio da amplificação do gene codificante do RNA ribossômico 16S, o qual é bastante utilizado em estudos taxonômicos microbianos. Mas como um ponto negativo, esse gene mostrou-se incapaz de distinguir *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans*. Pacheco e colaboradores (2006) realizaram um estudo de PCR multiplex envolvendo três genes *16S*, *rpoB* e *PLD*, como proposta de substituição do teste de cultura bacteriológica, e concluiu que trata-se de um método eficiente, preciso e rápido.

2.6.3 Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos vêm sendo elaborados com o intuito de estabelecer um diagnóstico subclínico. Em 1940, Carne desenvolveu um dos primeiros testes, que foi baseado na soroneutralização, para identificar toxinas de *C. pseudotuberculosis*. A partir daí surgiram amplas pesquisas envolvendo os testes sorológicos, entre eles temos: teste de soroaglutinação, hemaglutinação indireta, fixação do complemento, imunodifusão em gel, inibição da hemólise e teste de ELISA em seus vários métodos tais como, ELISAS indireto, direto, ELISA para detectar interferon gama (IFN- γ) como um marcador de imunidade mediada por células contra *C. pseudotuberculosis* e ELISA sanduiche com PLD (MENZIES et al. 2004, DOMINGUETE et al. 2011). Os testes sorológicos apresentam boa sensibilidade, mas com a desvantagem de apresentarem resultados falso-positivos, fato esse devido a similaridade antigênica entre espécies do gênero *Corynebacterium*, além de não diferenciar animais vacinados dos não vacinados (ÇETINKAYA et al. 2002).

2.7 IMUNOLOGIA

O principal mecanismo imunológico para a LC é a imunidade mediada por células. No primeiro momento pós-infecção macrófagos e neutrófilos são recrutados ao local inicial da infecção, na tentativa de combater o microrganismo invasor. A partir daí os macrófagos fagocitam a bactéria, que degeneram e dá início a formação de granulomas, em volta do organismo fagocitado, como mecanismo de defesa (LAN et al. 1999). A proteção contra *C.*

pseudotuberculosis é dependente de linfócitos T, atuante na imunidade mediada por células, sendo esta a mais importante no combate ao patógeno, (DOMINGUETI 2011).

No estágio inicial da doença as células predominantes são as T CD4 +, já na fase crônica as células predominantes são as T CD8 + e T Gama-delta. As citocinas produzidas pelas células T CD4 + estão relacionadas com a persistência do patógeno no hospedeiro, e com o desenvolvimento de piogranulomas (PÉPIN et al. 1994).

Durante a infecção experimental, são produzidas diversas citocinas com destaque para a produção de IL-2 e IL-4 em linfonodos drenantes e a produção de TNF- α e IFN- γ no local da infecção. O IFN- γ participa na ativação de macrófagos, as células atuantes no combate ao patógeno (PÉPIN et al. 1997).

Um estudo realizado demonstrou que a imunização passiva em camundongos com soro de coelhos imunizados contra *C. pseudotuberculosis*, foi capaz de produzir uma proteção mediada por anticorpos (OLIVEIRA 2011). Em um estudo realizado por Muckle et al. (1992) por meio da técnica sorológica de *Western Blotting*, foi possível identificar, utilizando antígenos da parede celular, que anticorpos dos animais infectados com *C. pseudotuberculosis* reconheceram uma grande quantidade de proteínas. Embora diversos estudos demonstrem a ação da resposta humoral contra *C. pseudotuberculosis*, esta não foi capaz de eliminar a infecção, tornando assim a imunidade mediada por células como principal fator na eliminação do patógeno.

2.8 GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

A caracterização genotípica, pode ser realizada para diversos fins, tais como análises sequenciais de plasmídeos como o realizado por Zhang et al. (1994), que visou caracterizar e analisar o plasmídeo pEP 2 gerado para codificar a proteína repA, essencial e limitante para a rápida replicação em *Escherichia coli* e *C. pseudotuberculosis*.

Connor et al. (2000) realizaram um estudo por meio da Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), para estabelecer a diversidade genética e verificar se é possível identificar e distinguir os dois biótipos de *C. pseudotuberculosis*, e foi possível concluir que este método é eficiente para este fim.

No estudo molecular de Kumor et al. (2012), objetivou-se a caracterização de amostras isoladas a partir de cabra no Rajasthan na Índia, as amostras foram previamente analisadas pelo testes bioquímicos feitos com meio de cultura bacteriológica. Em seguida os autores utilizaram a técnica PCR para amplificar o gene *PIP* apresentando um fragmento de 551 pb.

Este gene é específico para *C. pseudotuberculosis* e conclui-se que pode ser utilizado para diagnosticar animais infectados com o patógeno que causa a LC.

Guimarães et al. (2011) propôs o estabelecimento de um protocolo de Consenso Repetitivo Itegrênico de Enterobacterias (ERIC-PCR) para *C. pseudotuberculosis*, para a tipagem molecular dos isolados. O protocolo estabelecido apresentou-se como um método simples, barato e útil para identificar a diversidade genética entre as amostras isoladas deste patógeno.

Métodos comparativos para a tipagem molecular têm sido utilizados, a fim de determinar o grau de parentesco entre as espécies do gênero *Corynebacterium*. O gene *16S* era o mais indicado para determinar as diferenciações genotípicas. No entanto Çetinkaya et al. (2002), demonstrou que esse gene não é capaz de distinguir *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans*, pois essas espécies não diferenciam entre si na filogenia, quanto a este gene.

Khamis et al. (2004) realizou um estudo com o gene *rpoB* e propôs esse gene como melhor marcador para distinguir as espécies, pois este gene é mais polimórfico que o gene *16S*.

A PCR-RFLP (Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição), trata-se de uma técnica associada a PCR, que é empregada para diferenciar indivíduos da mesma espécie, mas de amostras diferentes. Inicialmente amplifica-se um fragmento de um gene específico, após este mesmo fragmento é submetido ao tratamento com enzimas de restrição que cortará o gene em regiões específicas, e produzem vários fragmentos de DNA do gene que será analisado (ABREU et al. 2007). Se ao final as enzimas clivarem em locais diferentes, ou não clivar o gene, significa que as espécies diferenciam entre si, se apresentarem a mesma clivagem, então os organismos não se diferenciam, ou seja, possuem a mesma sequência genotípica.

Abreu et al. (2007) comparou por PCR-RFLP os genes *rpoB* e *pld* utilizando as enzimas *PstI* e *MspI* para o gene *pld*, e para o *rpoB*, *HpyCh4* e *MspI*. Por meio destas avaliações concluiu que *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* não sofreram mutações detectáveis, apresentando um padrão genotípico único. Esta homogeneidade permite que esse método, incluindo esses genes e essas enzimas, possa ser utilizado em métodos diagnósticos.

Pavan et al. (2012) propôs um protocolo simples como o de fervura de colônias, para a obtenção de DNA, o qual foi proposto para substituir o método mais dispendioso da extração de DNA, em seguida foi realizado o teste de PCR-RFLP para o gene *rpoB*, que amplificou um fragmento de 446 pb. Para a clivagem do DNA, as amostras foram tratadas com as enzimas

MseI e *StuI*. Essas enzimas foram previamente analisadas *in silico*, e concluiu-se que as espécies do gênero *Corynebacterium*, espécies diferentes que também conferem patogenicidade em ovinos e caprinos, ou espécies que são capazes de reproduzir doenças semelhantes a LC e não patogênicas para ovinos e caprinos, e que compartilham entre si semelhanças para o gene *rpoB*, não possuem locais de restrição para essas enzimas. Sendo assim essa região de clivagem é identificada apenas em *C. pseudotuberculosis*. Até o presente momento esse método com estas enzimas e esse gene, é o mais indicado para o diagnóstico, e a discriminação entre espécies de *C. pseudotuberculosis*. Esta ferramenta é considerada simples e rápida (PAVAN et al. 2012).

A caracterização genotípica está interligada a genômica, que visa obter toda a informação genética, entender sua organização dentro do genoma e conhecer a função exercida por cada gene. O sequenciamento completo do genoma de *C. pseudotuberculosis*, gera um alto número de dados, que são essenciais para o conhecimento dos genes relacionados à patogenicidade, fatores de virulência, desenvolvimento de diagnóstico mais acurados, e potentes alvos para se desenvolver vacinas mais efetivas (ALMEIDA 2011).

Cerdeira et al. (2011) realizou um trabalho que visou o sequenciamento do genoma completo de *C. pseudotuberculosis*, amostra PAT10 que foi isolada a partir de um abscesso pulmonar de ovino na Patagônia Argentina. Com base na sequência genômica é possível que se compreenda a base molecular e genética de virulência da bactéria.

As bibliotecas genômicas construídas em cromossomo artificial de bactéria (BAC) são realizadas a fim de se obter um alto rendimento para o desenvolvimento de clones gênicos. As bibliotecas são essenciais para caracterizar regiões específicas de genes importantes que conferem a virulência do patógeno. Dorella et al. (2006), a fim de identificar alvos que possam ser úteis para sequenciar o genoma, construíram uma biblioteca BAC *C. pseudotuberculosis* no vetor pBeloBAC11, e mostrou que essa biblioteca foi eficiente para a identificação de genes importantes para posterior sequenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis*.

A genômica também é realizada para o estudo de desenvolvimento de métodos de diagnóstico, novas estratégias de prevenção, controle e tratamento, além de melhorar o conhecimento da biologia deste microrganismo. Silva et al. (2012) também realizaram o sequenciamento *C. pseudotuberculosis* CP31, isolado a partir de um búfalo no Egito.

2.9 ANATOMOPATOLOGIA

A anatomopatologia é uma ferramenta importante nos estudos de doenças infecciosas crônicas, onde trará conhecimentos macroscópico e microscópico, tornando-se importante para bem caracterizar os abscessos causados pela bactéria *C. pseudotuberculosis*. A utilização deste método ajuda na identificação da doença, no entanto não é um método diagnóstico conclusivo, trata-se de um complemento a outros métodos tais como cultura bacteriana, análise bioquímica e molecular, mas trata-se de método complementar que auxilia na eficiência de um diagnóstico conclusivo, para este patógeno, visto que o mecanismo de defesa pode impedir o isolamento do organismo. Um sinal patognomônico desta doença é o desenvolvimento de abscessos caseosos, perceptíveis tanto a olho nu quanto microscopicamente, a formação de camadas que lembram um corte transversal de uma cebola (ALVES et al. 2007, BAIRD & FONTAINE 2007).

Logo após a entrada inicial do patógeno no organismo do animal, nota-se a migração de inúmeras células de defesa, tais como os neutrófilos. Após três dias de infecção, este número diminui drasticamente e o número de macrófagos aumenta no sítio de inoculação (PÉPIN et al. 1992). Um estudo histopatológico realizado por Jesse et al. (2011) em camundongos, identificou a presença de células gigantes multinucleadas, neutrófilos, macrófagos, degeneração celular, formação de áreas de necrose e hemorragia, sendo os neutrófilos degenerados as células mais abundante no interior do abscesso, juntamente com restos celulares.

Histologicamente, a organização do abscesso se dá pela formação de uma área de necrose central que é composta por restos celulares, presença de colônias bacteriana, onde esta área é circundada por uma camada de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, células epitelióides, células gigantes, macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Na camada adjacente encontra-se uma região de fibrose composta por tecido conjuntivo fibroso (SOUZA et al. 2011).

Batey (1986) realizou o exame histológico em fígado de três camundongos, os quais foram removidos com 24, 48 e 72 horas após a inoculação, respectivamente. Esse estudo mostrou como resultado o acúmulo de células mononucleares e células polimorfonucleares. Em outro estudo do mesmo autor, onde também realizou o estudo em fígado de camundongos, 10 dias após a infecção, também foram encontradas as mesmas células, em alguns camundongos.

Um estudo realizado por Filgueira et al. (2010), de um caso de piodermite profunda causada por *C. pseudotuberculosis* em cutia, mostrou no exame histopatológico, exsudato inflamatório granulocítico-mononuclear representado por neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos e histiócito, coleções de exsudato purulento e moderado edema.

REFERÊNCIAS

- ABREU, S. R. O.; MOTTA R.A.; ROSINHA, G. M. S.; FORNER, O.; JUNIOR, J. W. P.; PEREIRA, R. R. B.; CASTRO, R. S.; ELISEI, C.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; MADUREIRA, R. C. Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28(10), p. 481-487, 2008.
- AL-GAABARY, M. H.; OSMAN, S. A.; OREIBY, A. F. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Ruminant Research**, v. 87, p. 116–121, 2009.
- ALMEIDA, S. S. Identificação e caracterização de peptídeos bioativos através de *Phage display* usando genoma completo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2011. 198 f. Tese (Doutorado em Genética)- Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, MG, 2011.
- ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite Caseosa: O Estado da Arte. **Embrapa Caprinos**, Doc. 74, Ceará, 2007.
- ANDRADE, J. S. L.; AZEVEDO, S. S.; TELES, J. A. A.; HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, E. O. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32(2), p. 116-120, 2012.
- ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALARNEAU, J. R.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 67-81, 2003.
- AUGUSTINE, J.L.; RENSHAW, H. W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in anoxic purulent exudate on common barnyard fomites. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 1-5, 1986.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v.137, p.179-210, 2007.
- BASTOS, B. L.; PORTELA, D. R. W.; DORELLA, F. A.; RIBEIRO, D.; SEYFFERT, N. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Journal Clinical Cellular Immunology**, v. 4, p. 1-15, 2012.
- BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, p. 269-272, 1986.
- BILLINGTON, S. J.; ESMAY, P. A.; SONGER, G.; JOST, B. H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbioly 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 (1-3), p. 169-179, 2007.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES, S. F. Synergistic Hemolysis-Inhibition Titers Associated with Caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in northeastern Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 46-49, 1987.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; BIBERSTEIN, E. L.; MORENO, D. Serologic response and lesions in goats experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* of caprine and equine origins. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46 (11), p. 2322-2326, 1985.

CERDEIRA, L. T.; PINTO, A. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; ALMEIDA, S. S.; SANTOS, A. R.; BARBOSA, E. G. V.; ALI, A.; BARBOSA, M. S.; CARNEIRO, A. R.; RAMOS, R. T. J.; OLIVEIRA, R. S.; BARH, D.; BARVE, N.; ZAMBARE, V.; BELCHIOR, S. O.; GUIMARÃES, L. C.; SOARES, S. C.; DORELLA, F. A.; ROCHA, F. S.; ABREU, V. A. C.; TAUCH, A.; TROST, E.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; SILVA, A. Whole-Genome Sequence of PAT10 Strain Isolated from Sheep in *Corynebacterium pseudotuberculosis* Patagonia. **Argentina. Journal of bacteriology**, v. 193 p. 6420–6421, 2011.

CONNOR, K. M.; QUIERIE, M. M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, p. 2633–2637, 2000.

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

DOMINGUETTI, C. P. Análise do papel do fator *sigma* C na resposta de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse ambiental. Dissertação (Mestrado em Genética) - Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, MG, 2011.

DORELLA, F. A.; FACHIN, M. S.; BILLAULT, A.; NETO, E. D.; SORAVITO, C.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. **Genetic and Molecular Research**. v. 5 (4), p. 653-663, 2006.

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

DORELLA, F. A. *Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tese (Doutorado em Genética) - Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, MG, 2009.

FILGUEIRA, K. D.; OLIVEIRA, M. F.; BATISTA, J. S.; FRANCISCO, F. M. C.; PAULA, V. V. Piodermite profunda por *corynebacterium pseudotuberculosis* em cutia (*dasyprocta* sp.). **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 461-464, 2010.

GUIMARÃES, A. S.; SEYFFERT, N.; GOUVEIA, A. M. G.; LAGE, A. P.; PORTELA, R. W. P.; MEYER, R.; AZEVEDO, V.; CARMO, F. B.; CRUZ, J. C. M.; HEINEMANN, M. B. linfadenite caseosa em rebanhos ovinos no estado de minas gerais, brasil: prevalência e informações de manejo. **Ciência Animal Brasileira** – Suplemento 1, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.

GUIMARÃES, A. S.; CARMO, F. B.; PAULETTI, R. B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **The IIOAB Journal**, V. 2, p. 33-43, 2011.

GREEN, S. J.; NACY, C. A.; MELTZER, M. S. Cytokine-Induced Synthesis of Nitrogen Oxides in Macrophages: A Protective Host Response to *Leishmania* and Other Intracellular Pathogens Shawn. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 50, p. 93-103, 1991.

HAWARI, A. D. *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection (Caseous Lymphadenitis) in Camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. **American Journal of Animal and Veterinary Science**, v. 3 (2), p. 68-72, 2008.

IBGE 2011. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal. **Produção da Pecuária Municipal**, v.39. 2011.

JESSE, F. F. A.; SANG, S. L.; SAHAREE, A. A.; SHAHIRUDIN, S. Pathological Changes in the Organs of Mice Model Inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* Organism. **Pertanika Journal of Tropical Agriculture Science**, v. 34 (1), p. 145 – 149, 2011.

LAN, D. T. B.; MAKINE, S.; SHIRAHATA, T.; YAMADA, M.; NAKAME, A. Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Journal Veterinary Medical Sciencen**, v. 61(11), p. 1203–1208, 1999.

LANGENEGER, C. H.; LANGENEGER, J.; SHERER, P. Diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos. Anais em Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 21, Anais, 1991.

MENZIES, P. I.; HWANG, Y. T, PRESCOTT, J. F. Comparison of an interferon- γ to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 100 (1-2), p. 129-137, 2004.

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

MÜLLER, B.; KLERK-LORIST, L. M.; HENTON, M. M.; LANE, E.; PARSONS, S.; PITTIUS, N. C. G.; KOTZE, A.; HELDEN, P. D.; TANNER, M. Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. **Veterinary Microbiology**, v. 147, p. 340–345, 2011.

OLIVEIRA, C. A. A. Desenvolvimento de um Teste Intradérmico de Hipersensibilidade com antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico subclínico da Linfadenite Caseosa em pequenos ruminantes. Tese (Doutorado em Genética) - Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, MG, 2011.

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

PANTON, M. W. The epidemiology and control os caseous lymphadenitis in Australian sheep flocks, PhD thesis, (Doctor of Philosophy Of Murdoch University), School of veterinary and biomedical sciences, 2010.

PAVAN, M. E.; ROBLES, C.; CAIRÓ, F. M.; MARCELLINO, R.; PETTINARE, M. J. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase b-subunit gene (rpoB). **Research in Veterinary Science**, v. 92, p. 202–206, 2012.

PÉPIN, M.; CANNELLA, D.; FONTAINE, J. J.; PITTET, J. C.; PAPE, A. L. Ovine mononuclear phagocytes in situ: identification by monoclonal antibodies and involvement in experimental pyogranulomas. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 5, p. 188-198, 1992.

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

SILVA, A.; RAMOS, R. T. J.; CARNEIRO, A. R.; PINTO, A. C.; SOARES, S. C.; SANTOS, A. R.; ALMEIDA, S. S.; GUIMARÃES, L. C.; ABURJAILE, F. F.; BARBOSA, E. G. V. DORELLA, F. A.; ROCHA, F. S.; LOPES, T. S.; KAWASAKI, R.; de Sá, P. G.; COIMBRA, N. A. R.; CERDEIRA, L. T.; BARBOSA, M. S.; SCHENEIDER, M. P. C.; MIYOSHI, A.; SELIM, S. A. K.; MOAWAD, M. S.; AZEVEDO, V. Complete Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Cp31, Isolated from an Egyptian Buffalo. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 6663–6664, 2012.

SOARES, C. S.; SILVA, A.; TROST, E.; BLON, J.; RAMOS, R.; CARNEIRO, A.; ALI, A.; SANTOS, A. R.; PINTO, A. C.; DINIZ, C.; BARBOSA, E. G. V.; DORELLA, F. A.; ABURJAILE, F.; ROCHA, F. S.; NASCIMENTO, K. K. F.; GUIMARÃES, L. C.; ALMEIDA, S.; HASSAN, S. S.; BAKHTIAR, S. M.; PEREIRA, U. P.; ABREU, V. A. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; MIYOSHI, A.; TOUCH, A.; AZEVEDO, V. The Pan-Genome of the Animal Pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* Reveals Differences in Genome Plasticity between the Biovar ovis and equi Strains. **Plos One**, v. 8, p. 1-14, 2013.

SOOD, N. K.; SANDHU, B. S.; GUPTA, K.; NARANG, D.; VASUDEVA, K.; SINGH, N. D. Mesenteric caseous lymphadenitis in a cow calf caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*: a case report. **Veterinary Medicine**, v. 57 (7), p. 371–375, 2012.

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

SOTO, A.; ZAPARDIEL, J.; SORIANO, F. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. *Journal of Clinical Pathology*, v. 47, p. 756-759, 1994.

SOUZA, B. M. Construção de um mutante para o gene *sigH* codificador do fator sigma alternativo σ^H e análise do papel desse fator na resposta de *Corynebacterium Pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse ambiental. Dissertação (Mestrado em Genética) - Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, MG, 2011.

SPRAKE, P.; GOLD, J. R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* liver abscess in a mature alpaca (*Lama pacos*). **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, p. 387-390, 2012.

VOIGT, K.; BAIRD, G. J.; MUNRO, F.; MURRAY, F.; BRÜLISAUER, F. Eradication of caseous lymphadenitis under extensive management conditions on a Scottish hill farm. **Small Ruminant Research**, v. 106, p. 21– 24, 2012.

YERUHAM, I.; ELAD, D.; FRIEDMAN, S.; PERL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli dairy cattle. **Epidemiology and Infection**, v. 131, p. 947–955, 2003.

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

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

Caracterização de amostras de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de ovinos e caprinos

Patrícia Rodrigues de Melo e Grácia Maria Soares Rosinha*

*Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte. Avenida Rádio Maia, 830, CEP 79106-550, Campo Grande, MS; Telefone: +55 (67) 3368-2168; E-mail: gracia.rosinha@embrapa.br

Periódico: Veterinary Research Communications

Caracterização de amostras de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de ovinos e caprinos

**Patrícia Rodrigues de Melo, Simone Camargo Sanches,
Juliana Soares Gomes, Cleber Eduardo Galvão,
Gisele Braziliano de Andrade, Cleber Oliveira Soares,
Grácia Maria Soares Rosinha**

Resumo: O objetivo nesse estudo foi a caracterização bioquímica, genotípica e análise de virulência e patogenicidade de amostras isoladas de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. Foram utilizadas cinco amostras: CBO (*Corynebacterium* Ovino) 2512, CBO 28033, CBC (*Corynebacterium* Caprinos) 70D, CBC 118, CBC NPC e duas amostras controle 1002 (Linfovac) e (00512 Fiocruz). Para a identificação bioquímica, utilizou-se o *kit* APICoryne (Bio Merieux-França), que confirmou todas as amostras como *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. A caracterização genotípica foi realizada pelo teste de PCR-RFLP, para a restrição do gene *rpoB*, com as enzimas *MseI* e *StuI*. Que geraram fragmentos de 98 e 348 pb, e 191 e 255 pb respectivamente, para todas amostras incluindo as duas amostras controle. Indicando que não houve variabilidade genotípica entre as amostras. As amostras foram avaliadas quanto à virulência e patogenicidade, em camundongos BALB/c com inoculação de quatro doses de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL). A análise de virulência revelou que as amostras CBO 2512 e CBO 28033 inoculadas com 1×10^6 UFC/mL nos camundongos, foram mais virulentas, pois causaram 100% de morte. A partir do teste de patogenicidade, foi observado que as amostras CBC 70D, CBC NPC, CBC 118 são patogênicas, e pouco virulentas. A análise anatomopatológica caracterizou macroscopicamente e microscopicamente, os abscessos desenvolvidos pela *C. pseudotuberculosis* em órgãos. Histologicamente estes foram caracterizados por uma área central de necrose, área de infiltrado inflamatório e cápsula do abscesso formado pelo tecido conjuntivo fibroso. Concluindo que este trabalho bem caracterizou as cinco amostras de *C. pseudotuberculosis*, e servirá de base para pesquisas futuras, envolvendo a análise genômica, testes diagnósticos, tratamentos e vacinas para a linfadenite caseosa.

Palavras - chave: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, virulência, patogenicidade, PCR-RFLP, anatomopatologia.

INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente causador da linfadenite caseosa (LC), uma doença infectocontagiosa crônica, considerada também uma zoonose ocupacional. Esta bactéria foi descrita pela primeira vez em 1888, por Edmond Isidore Etienne Nocard, a partir de um caso de linfangite bovina, apresentando-se como bacilos gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos e que não formam esporos (Batey, 1986, Dorella et al. 2005)

Esta doença caracteriza-se pela formação de abscessos em linfonodos superficiais, internos, e também em órgãos. Os animais infectados são reservatórios do patógeno. A transmissão ocorre inicialmente com o rompimento dos abscessos externos, ocasionados no manejo dos animais, como, tosquia, castração e a utilização de agulhas contaminadas, fatores ambientais também influencia na disseminação, pois a vegetação com espinhos perfura os abscessos, e contaminam o ambiente (Binns et al. 2007, Guimarães et al. 2011, Bastos et al. 2012).

O controle da LC é de extrema importância para a economia do Brasil e do mundo, pelos grandes prejuízos econômicos causados na cadeia produtiva da criação de ovinos e caprinos. A erradicação e a disseminação da *C. pseudotuberculosis* tornam-se difíceis, em virtude de não haverem testes de diagnóstico, tratamento e vacinas, que sejam totalmente eficientes para o controle da LC (O'Reilly et al. 2010).

Os métodos de diagnóstico mais comumente utilizados incluem cultura bacteriológica do material retirado por punção aspirativa dos abscessos, sendo esta considerada padrão-ouro, identificação bioquímica e molecular. No entanto esses métodos não são totalmente eficazes, além de demandarem tempo, possuem alto custo e não são capazes de identificar as infecções subclínicas (Williamson 2001, Dorella et al. 2006).

O tratamento da LC é feito com antibióticos, o qual não é recomendável, pois o medicamento não penetra totalmente na cápsula do abscesso, que é composta por várias camadas espessas e rígidas. É recomendado para o controle desta enfermidade, o isolamento dos animais infectados assim como a desinfecção das feridas e o cuidado com a limpeza do local onde os animais são alojados. E as vacinas disponibilizadas no mercado, não são eficientes para oferecer uma proteção totalmente eficaz contra a LC (O'Reilly et al. 2010, Williamson, 2001).

A caracterização genotípica é utilizada para diversos fins, como, análises sequências de plasmídeos, estabelecimento da diversidade genética entre organismos de espécies diferentes, ou de mesma espécie para diferenciação dos biótipos, realização da tipagem molecular de amostras bacterianas, diagnósticos, e caracterização de proteínas importantes e candidatas a novas vacinas (Costa et al. 2011).

A tipagem molecular possui vários métodos, que determina o grau de parentesco entre as espécies pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, incluindo a análise sequencial do gene rRNA *16S*, hibridação de ácidos nucleicos e Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP). Estes métodos auxiliam nos estudos filogenéticos e identificação exata de espécies de *Corynebacterium*, os quais podem ocorrer por meio da comparação sequencial do gene *rpoB*, que codifica a subunidade- β da RNA polimerase (Pascual et al. 1995, Khamis et al. 2004).

Portanto, as investigações sobre as variações genéticas realizadas por meio da caracterização molecular entre amostras da mesma espécie, elucidarão dúvidas sobre o comportamento epidemiológico desse agente infeccioso. A técnica de PCR-RFLP é um método rápido e simples, que identifica as espécies do gênero *Corynebacterium*, e as diferenciam de outras espécies bacterianas patogênicas (Pavan et al. 2012).

Faz-se necessária a realização de novos estudos para o conhecimento mais detalhado e completo de *C. pseudotuberculosis*. O entendimento aprofundado da biologia de *C. pseudotuberculosis*, auxiliará em estudos futuros, contribuindo para o desenvolvimento de novas vacinas e auxílio no controle e erradicação da LC.

Os estudos de patogenicidade e virulência de amostras isoladas do hospedeiro, em camundongos, podem auxiliar na descoberta dos fatores de virulência, no desenvolvimento de novas vacinas e testes diagnósticos. Neste contexto, objetiva-se neste trabalho a caracterização bioquímica, genotípica e análise de virulência e patogenicidade de amostras isoladas de caprinos e ovinos de *C. pseudotuberculosis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas cinco amostras de *C. pseudotuberculosis* isoladas na cidade de Sobral/CE, denominadas CBC (*Corynebacterium* Caprino) 70D, CBC 118, CBC NPC isoladas de caprinos e CBO (*Corynebacterium* Ovino) 2512, CBO 28033 isoladas de ovinos. Estas foram

isoladas a partir de abscessos externos por punção aspirativa de linfonodos fechados. Foi utilizada também a amostra vacinal 1002 (Linfovac) comercializada no Brasil e a amostra 00512 (T1) do banco de dados da FIOCRUZ/ INCQS. Todas as amostras foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) Agar enriquecido com 10% de sangue desfibrinado de ovino, durante 72 horas à 37°C. Após o crescimento bacteriano, selecionaram-se colônias características, as quais foram repicadas para o caldo BHI para crescimento por 72 horas à 37°C, sob agitação constante. Em seguida, as amostras foram criopreservadas em glicerol no ultrafreezer a -80°C. A partir do estoque, as amostras foram cultivadas conforme o padrão de cultivo para a realização dos experimentos.

Identificação Bioquímica

Realizada pelo kit *API Coryne* (APIbioMerieux, Inc., La Balme les Grottes, France), o qual consiste em baterias de testes bioquímicos, e fermentação de carboidratos, seguindo-se as orientações do fabricante.

Caracterização Genotípica

Extração de DNA - Realizada pelo método modificado de Zhang et al. (1994). A extração ocorreu a partir de amostras de *C. pseudotuberculosis* que foram cultivadas em 10 mL de caldo BHI sob agitação, e temperatura de 37°C por 72 horas, posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 3214 RCF (Força Centrífuga Relativa) após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 2 mL de tampão Tris-EDTA pH 8,7. Novamente centrifugadas com as mesmas condições, após o sedimento foi ressuspendido em 800 µL de tampão TE pH 8,0 acrescido de 10,3% (wt/vol) de glicose e 10 mg/mL de lisozima e incubados por 18 horas a 37°C, seguido de tratamento com 100 µL de SDS a 10%, 20 µL de NaCl a 5M e 13 µL de proteinase K a 20% e incubação a 56°C por 12 horas aproximadamente. Em seguida, foi adicionado 0,8 mL de fenol e centrifugação por 10 minutos a 9.900 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado uma solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e adicionado clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Seguido de outra centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foi adicionado 0,6% de isopropanol. A suspensão foi homogeneizada levemente e centrifugada. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de álcool a 70%. Logo após centrifugou-se, e descartou-se o sobrenadante

e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente, sendo ressuspenso em 50 µL de água ultrapura e incubada a 37°C por 12 horas. Após tratou com 1 µL de RNAase e incubação de 30 minutos e estocada a -20°C. A concentração do DNA foi avaliada em Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific) e também por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Syber Gold (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

Amplificação do gene *rpoB* – O fragmento que codifica o gene *rpoB* foi amplificado utilizando os oligonucleótidos C2700F e C3130R anteriormente descrito por Khamis et al, (2004). O gene *rpoB* foi amplificado e adicionado no mix: tampão (1X), MgCl₂ (1,5 mM), oligonucleotídeos iniciadores, *forward e reverse* (20 pmol); dNTP (10 mM); água ultrapura; 0,5 U/ µL de Taq DNA polimerase; e DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*. As amplificações ocorreram em termociclador (Eppendorff Mastercycler® gradient), e após foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *Syber Gold* (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador ultravioleta; utilizou-se 1 kb DNA Plus (Invitrogen®) como marcador de peso molecular.

PCR-RFLP utilizando o gene *rpoB* - As enzimas de restrição foram as utilizadas por Pavan et, al., (2012). Para a enzima *MseI* (Invitrogen®) as amostras foram digeridas com 1,5 U da enzima, tampão (NEBuffer4 BioLabs®) 1X, BSA (Bovine Serum Albumin) 100 µg/mL, 7 µL da PCR e água ultrapura, e para a enzima *StuI* foi utilizado 1,5 U da enzima, tampão (NEBuffer4 BioLabs®) 1X e água ultrapura, com um volume final de 50 µL e incubadas a 37° C *over night*. Após isso as reações foram inativadas conforme as instruções do fabricante. As reações foram feitas separadamente, e as sete amostras de *C. pseudotuberculosis* foram analisadas. Para a leitura das digestões foi realizada a eletroforese em gel de agarose 3%, coradas com *Syber Gold* (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador ultravioleta; utilizou-se 1 kb DNA Plus (Invitrogen®) como marcador de peso molecular. A representação esquemática da restrição do gene *rpoB* está apresentada na Fig. 1.

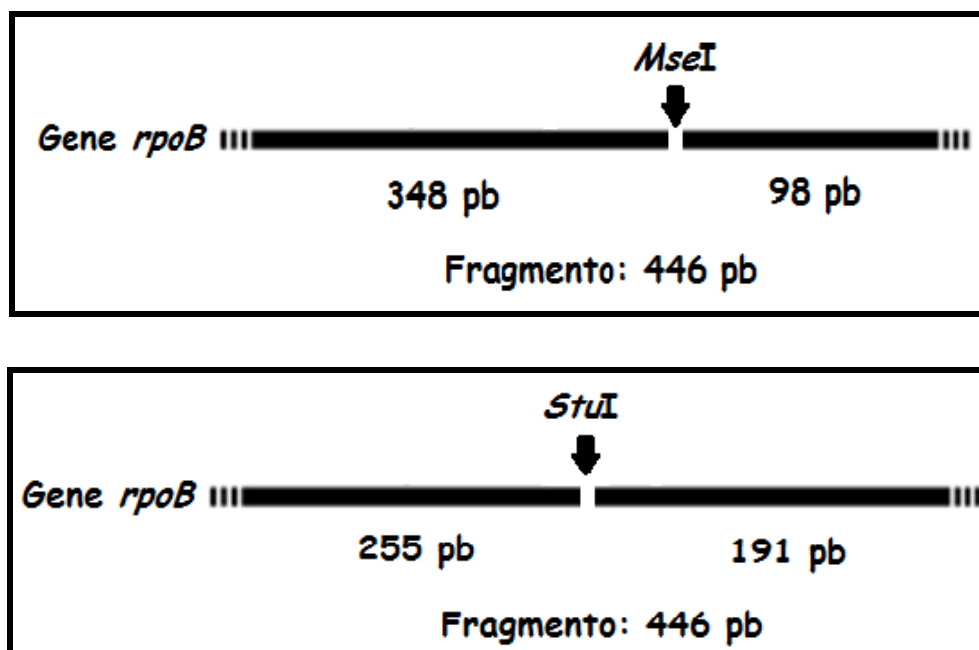


Fig. 1 Representação esquemática dos sítios de restrição, utilizando as enzimas *MseI* e *StuI* para a clivagem do gene *rpoB*, e os tamanhos esperados dos fragmentos pós restrição.

Análise de virulência e patogenicidade

Foram realizadas em camundongos fêmeas BALB/c de 6 a 8 semanas, com um n amostral de 145 indivíduos, divididos em sete grupos de acordo com as amostras: CBC 70D, CBO 2512, CBO 28033, CBC 118, CBC NPC, 1002 (Linfovac) INCQS: 00512 (T1) (FIOCRUZ) e, um grupo controle tampão fosfato-salino (PBS). Cada grupo foi subdividido em quatro grupos correspondente a 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia) contendo cinco animais cada, e no grupo controle os animais foram inoculados com PBS. Para a preparação dos inóculos, inicialmente as amostras foram cultivadas em meio BHI Agar enriquecido com 10% de sangue desfibrinado de ovino, durante 72 horas à 37°C. Após, foi selecionada uma colônia de cada amostra que foram repicadas para meio líquido BHI sob agitação à 37°C por 72 horas. Após o crescimento, as amostras foram centrifugadas a 3214 RCF, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 10 mL de PBS pH 7,2. As concentrações foram ajustadas para 0,1 nm em espectrofotômetro com densidade ótica (D.O) 580 nm, o que corresponde a 1×10^7 UFC/mL, em seguida foi feita a diluição seriada e inoculação intraperitonealmente no volume de 100 μ L em cada camundongo. Durante o período de 30 dias pós-inoculação, os animais foram observados diariamente e os óbitos monitorados. Os animais que apresentaram sinais de debilitação média

e/ou avançada foram eutanasiados por deslocamento cervical e contabilizados como óbito. A taxa de mortalidade se referiu as análises de virulência e a análise de patogenicidade se relacionou à capacidade da amostra de *C. pseudotuberculosis* causar a doença e foi realizada somente nos animais que sobreviveram até o 30º dia, onde foram eutanasiados por deslocamento cervical e necropsiados para verificar a formação de abscessos nos órgãos e linfonodos internos. Foi realizada uma repetição do experimento de Virulência e Patogenicidade, com as mesmas condições do primeiro experimento.

Análise Anatomopatológica

Durante a necropsia, os órgãos dos animais inoculados com amostras de *C. pseudotuberculosis*, que apresentaram abscessos, foram retirados, e foi coletado o abscesso com uma parte do tecido normal para a fixação em formol 10% por 48 horas. Os fragmentos foram rotineiramente processados para lâminas histológicas, coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) (Luna 1968) para a descrição histopatológica, Tricrômio de Masson do kit *EasyPath*® para a evidenciação das fibras de tecido conjuntivo da cápsula do abscesso e coloração de Gram Histológico método de Macallum Goodpasture (Unicamp 2011) para a observação de colônias bacterianas. As lâminas foram observadas com o auxílio de um microscópio óptico de luz e as imagens foram obtidas por um sistema de captura de imagens adequado.

Ética na utilização dos animais experimentais

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética para utilização de animais em experimentos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e protocolado com nº de registro: CEUA nº 490/2013.

RESULTADOS

Identificação Bioquímica

No teste bioquímico *API Coryne* (APIbioMerieux-França) as 5 amostras isoladas de caprinos e ovinos foram confirmados como pertencentes a espécie *C. Pseudotuberculosis* biovar *ovis*. Os resultados obtidos nos testes estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1: Dados obtidos no teste API Coryne (APIbioMerieux-França), realizados com as amostras isoladas de caprinos e ovinos, provenientes de Sobral/CE

	CBC 70D	CBO 2512	CBO 28033	CBC 118	CBC NPC
NIT^a	N	N	N	N	N
PYZ^b	N	N	N	N	N
PyrA^c	N	N	N	N	N
PAL^d	N	N	N	N	N
β-GUS^e	N	N	N	N	N
β-GAL^f	N	N	N	N	N
α-GLU^g	N	N	N	N	N
β-NAG^h	N	N	N	N	N
ESCⁱ	N	N	N	N	N
URE^j	P	P	P	P	P
GEL^k	N	N	N	N	N
O^l	N	N	N	N	N
GLU^m	P	P	P	P	P
RIBⁿ	P	P	P	P	P
XYL^o	N	N	N	N	N
MAN^p	N	N	N	N	N
MAL^q	P	P	N	N	P
LAC^r	N	N	N	N	N

^aRedução de Nitrato, ^bPirazinamidase, ^cPirrolidonil Arilamidase, ^dFosfatase alcalina, ^eBeta-glucoronidase, ^fBeta-Galactosidase, ^gAlfa-glicosidade, ^hBeta-N-acetil- β -glucosaminidase, ⁱEsculina, ^jUrease, ^kGelatina (hidrólise), ^lLiberação de oxigênio, ^mGlucógeno, ⁿRibose, ^oXilose, ^pManitol, ^qMaltose, ^rLactose. **N**: Negativo, **P**: Positivo.

Caracterização Genotípica

O fragmento *rpoB* com 446 pb foi amplificado, utilizando como molde o DNA extraído dos lisados brutos de cada amostra (Fig. 2).

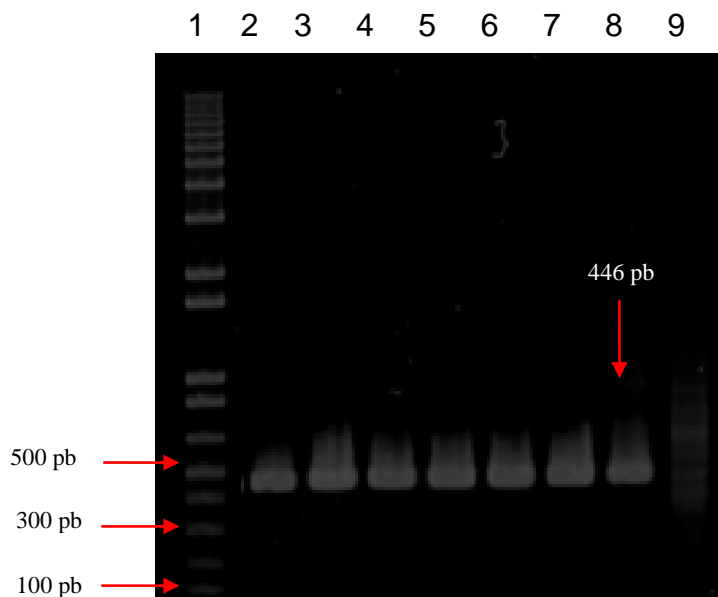


Fig. 2 Análise eletroforética da amplificação pela PCR da sequência completa do gene *rpoB* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com *Syber Gold* (Invitrogen). 1: 1 kb DNA Plus (Invitrogen); 2-8: amplificação do gene *rpoB* apresentando 446 pb nas amostras CBO 2512, CBC 70D, CBC 118, CBO 28033, CBC NPC, 1002 (Linfovac) e 00512 (T1) (Fiocruz); 9: controle negativo.

Com a realização da PCR-RFLP analisou-se o perfil de restrição para o gene *rpoB* das 7 amostras de *C. pseudotuberculosis*, que apresentaram clivagem em um ponto do gene. Todas as amostras digeridas com as enzimas *MseI* e *StuI* geraram fragmentos de 98 e 348 pb e 191 e 255, respectivamente (Fig. 3).

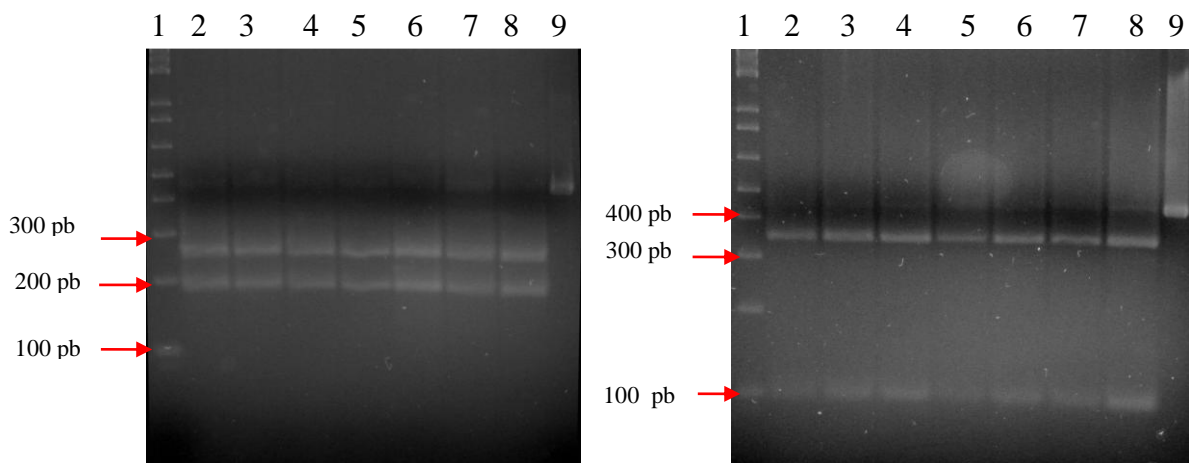


Fig. 3 Identificação das amostras de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por PCR-RFLP. Eletroforese em gel de agarose 3% corado com *Syber Gold* (Invitrogen). 1: 1 kb DNA Plus (Invitrogen); 2 - 8: amostras digeridas de *C. pseudotuberculosis*. **A:** Amostras digeridas com a enzima *StuI* que geraram 191 e 255 pb. **B:** Amostras digeridas com a enzima *MseI* que geraram 98 e 348 pb; 9: produto de PCR do gene *rpoB* não digerido com 924 pb.

Análise de virulência

Os sinais clínicos apresentados pelos camundongos inoculados com as amostras de *C. pseudotuberculosis* para as cinco amostras estudadas, nas concentrações 1×10^5 e 1×10^6 UFC/mL principalmente, foram pelos eriçados, dificuldade de locomoção, aparência apática e mudança na coloração natural (Fig. 4b), quando comparado ao grupo controle que foram inoculados apenas com PBS (Fig. 4a). Os pelos eriçados foram os primeiros sinais apresentados logo no 3º dia da infecção, também apresentaram prurido intenso, e observou-se que os animais passaram a ingerir muita água. Conforme o progresso da doença, os animais dos grupos mais virulentos apresentavam-se ainda mais debilitados ou evoluíram para óbito.

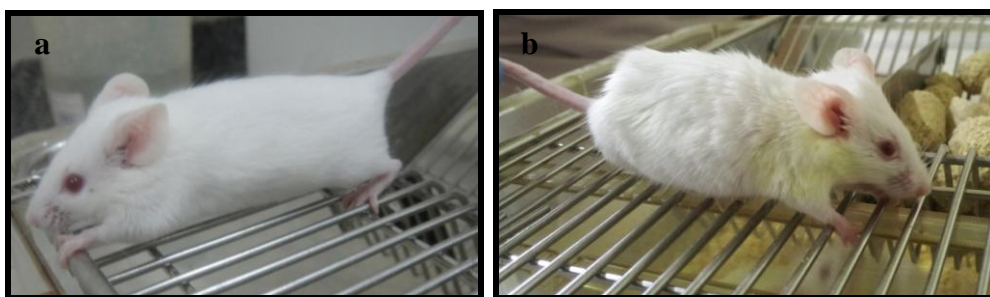


Fig. 4 Camundongos BALB/c fêmeas utilizadas no experimento de análise de virulência: **(a)** grupo controle inoculados com PBS (tampão fosfato-salino), com aspecto sadio e coloração natural; **(b)** Animal inoculado intraperitonealmente com *C. pseudotuberculosis* exemplo da amostra CBO 2512 com 1×10^6 UFC/mL, a imagem evidencia os pelos ericados.

Os animais quando moribundos foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo somados aos que morreram antes da eutanásia e classificados como amostras virulentas. As taxas de sobrevivência estão apresentadas em gráficos de acordo com a porcentagem de mortes e quantidade de UFC/mL (fig. 5).

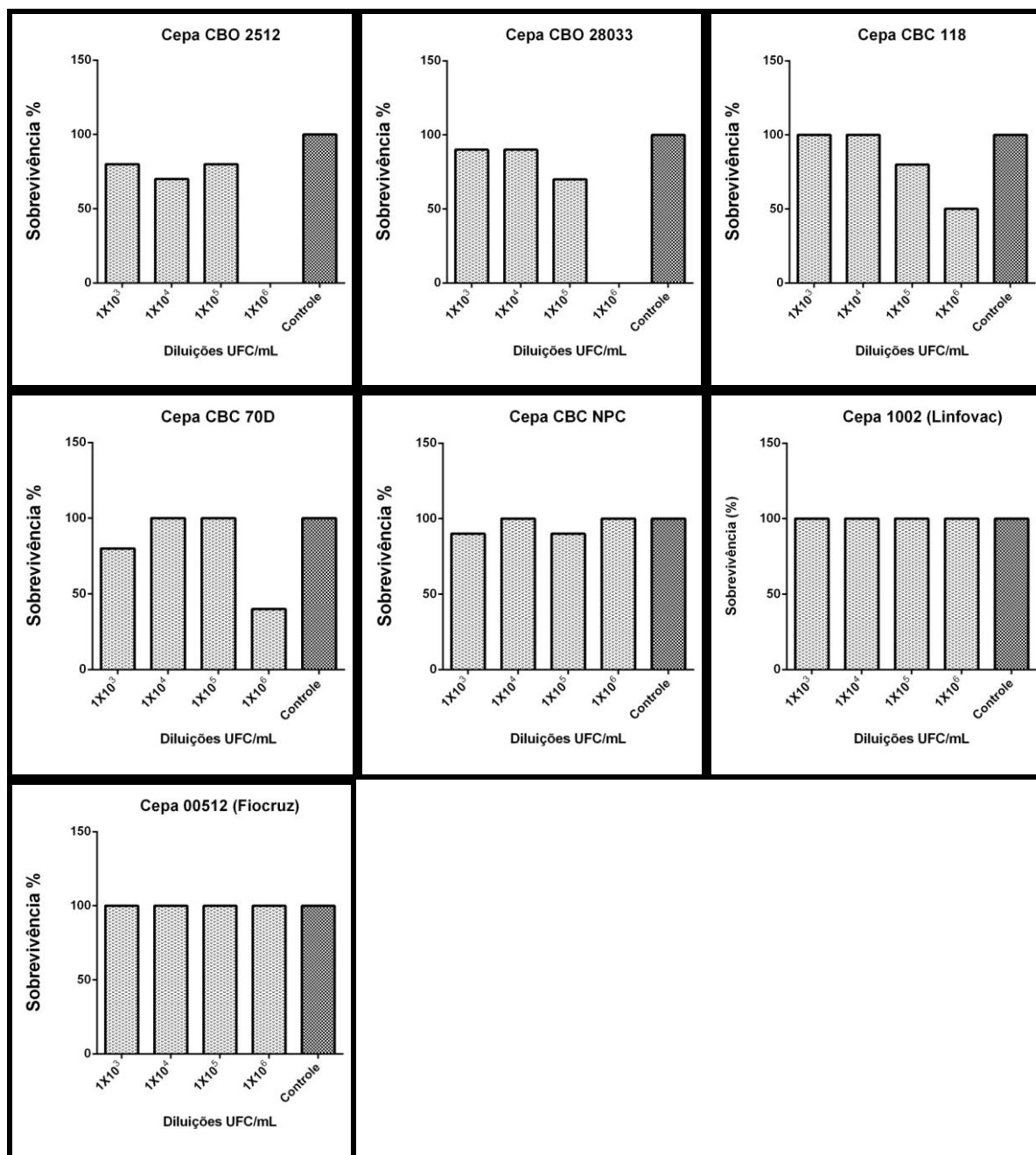


Fig. 5 Representação gráfica da sobrevivência de camundongos inoculados com as amostras de *C. pseudotuberculosis* isoladas a partir de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa. Os dados mostram os resultados obtidos a partir da inoculação de 7 amostras nas concentrações de 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 UFC/mL, no qual a sobrevivência dos camundongos foram acompanhadas por 30 dias. As amostras CBO 2512 e CBO 28033 foram isoladas de ovinos e as amostras CBC 118, CBC 70D E CBC NPC foram isoladas de caprinos, essas amostras foram capazes de induzir os camundongos à morte. As amostras 1002 (Linfovac) e 00512 (T1) (Fiocruz) não induziram mortalidade.

Observando-se os gráficos, notamos que ao longo de 30 dias, após a inoculação com as amostras de *C. pseudotuberculosis*, verificou-se que alguns grupos foram mais virulentos, com base no número de morte dos camundongos. Com destaque para as amostras CBO 2512 e CBO 28033, que apresentaram 100% (5/5) de morte nos grupos inoculados com 1×10^6 UFC/mL, na 3ª semana. A amostra CBO 70D isolada a partir de um abscesso encontrado em

ovino, induziu à morte apenas nos grupos inoculados com 1×10^3 e 1×10^6 UFC/mL com 20% (1/5) e 60% (3/5), respectivamente. Sendo os grupos até aqui citados os mais virulentos, pois obtiveram uma maior porcentagem de morte em tempo inferior a 30 dias.

Os grupos a seguir apresentaram baixa taxa de mortalidade. Sendo a amostra CBO 118, isolada a partir de um abscesso de ovino, apresentou morte apenas nos grupos que receberam 1×10^5 e 1×10^6 UFC/mL com 20% (1/5) e 60% (3/5) de mortalidade respectivamente. A amostra CBC NPC, isolada a partir de um abscesso de um caprino, apresentou 20% (1/5) de morte nos grupos inoculados com 1×10^3 e 1×10^5 . As amostras correspondentes aos grupos 1002 (Linfovac) e 00512 (T1) (Fiocruz) não induziram morte nos subgrupos, bem como no grupo controle (PBS).

Análise de patogenicidade e caracterização anatomopatológica

A análise de patogenicidade avaliou os animais sobreviventes que foram necropsiados para verificar a presença de abscessos. A maioria destes animais apresentaram lesões, sendo que em alguns houve a formação de mais de um abscesso e em diferentes órgãos. Os órgãos acometidos foram: fígado, baço, intestino, rim e estômago. Também houve a formação de abscessos subcutâneos e na cavidade abdominal, sem estar especificamente em algum órgão. Apenas as amostras 1002 (Linfovac) e 00512 (T1) (Fiocruz) não foram capazes de causar a formação de abscessos nos camundongos.

Os abscessos apresentaram uma homogeneidade na morfologia entre as amostras, na análise macroscópica, que revelou um formato arredondado de coloração amarelada, devido ao material purulento localizado no interior da capsula do abscesso (Fig. 6a e b). A análise microscópica evidenciou a cápsula fibrosa, a zona intermediária contendo células inflamatórias tais como neutrófilos, macrófagos e plasmócitos, e a área de necrose (Fig. 6c). Essas características observadas ocorreram independentemente da quantidade de UFC inoculadas.

Para a demonstração das fibras de tecido conjuntivo que compõe a cápsula fibrosa do abscesso, foi realizada a coloração de Tricrômico de Masson, que evidenciou as fibras de colágeno em azul (Fig. 6d). Além dos macroabscessos, houve a formação de microabscessos, evidenciando uma concentração de neutrófilos, que é característica da formação inicial do abscesso (Fig. 6e). A coloração de Gram histológico evidenciou a presença de colônias bacterianas de *C. pseudotuberculosis*, que se apresentaram agrupadas e isoladas. As colônias

foram evidenciadas em azul, característica das bactérias Gram positivas (Fig. 5f). As células inflamatórias mais frequentemente observadas nos abscessos foram os neutrófilos, macrófagos, plasmócitos, células epitelióides e células gigantes.

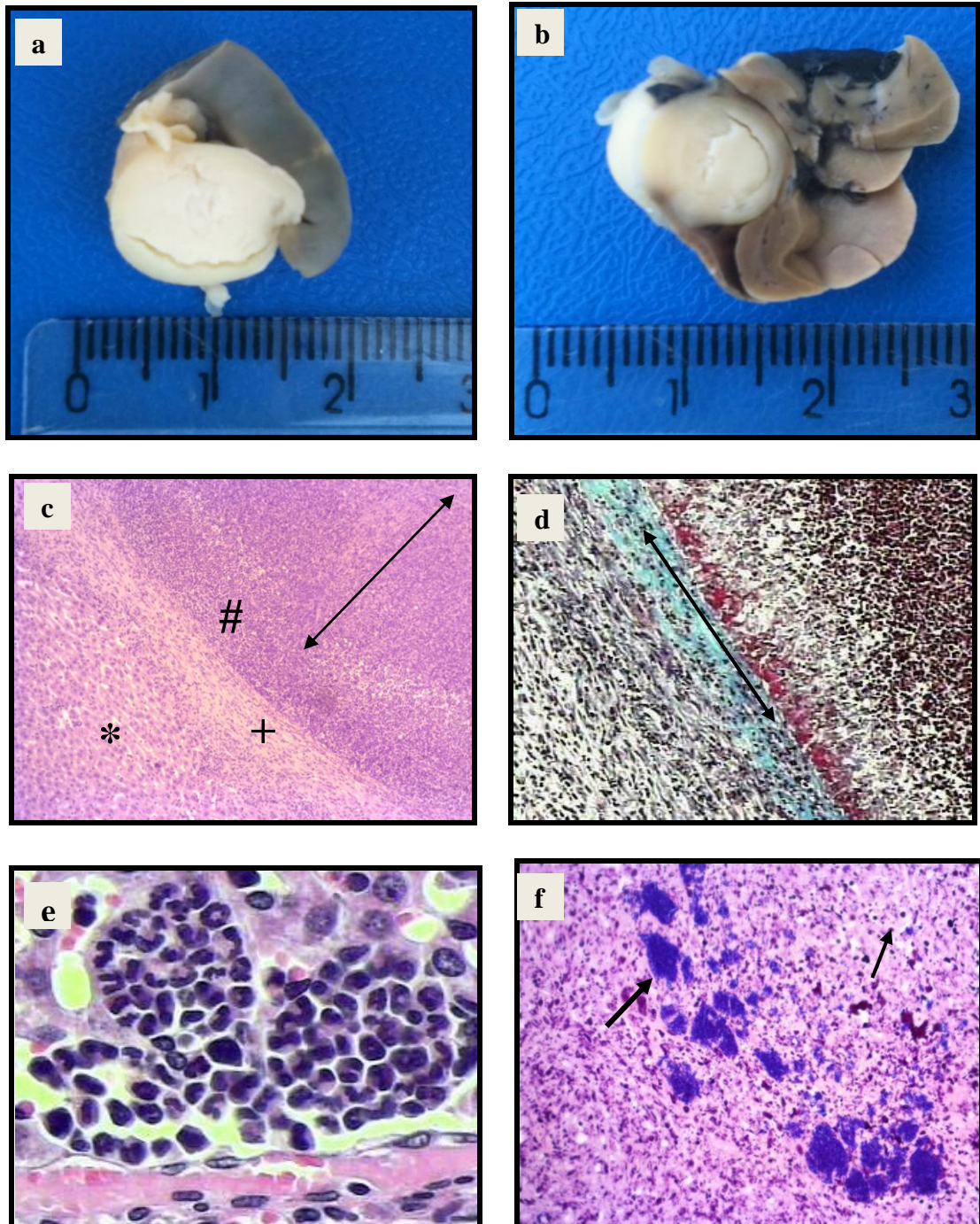


Fig. 6 Fotografias e fotomicrografias de cortes histológicos de fígado e baço representativos de camundongo inoculado com *C. pseudotuberculosis*. **A:** Aspecto macroscópico de um abscesso localizado no baço, **B:** Abscesso localizado no fígado. **C:** Aspecto microscópico de um abscesso no fígado, notar a junção do tecido hepático normal (*) e o abscesso. Destacando-se a cápsula do abscesso formada por tecido conjuntivo fibroso (+), área de infiltrado inflamatório (#) e área necrótica (seta) (H&E, objetiva 10X). **D:** Evidência as fibras de colágeno coradas em azul (Tricrômio de Masson, objetiva 10 X). **E:** Microabscesso, evidenciando o acúmulo de neutrófilos (H&E, objetiva 40 X). **F:** Presença de colônias, agrupadas ou isoladas, coradas em azul (Gram histológico, objetiva 40X).

DISCUSSÃO

Bioquimicamente, as cinco amostras foram caracterizadas pela produção de catalase, uréase, fermentação de carbonos como, frutose, manose, galactose, glicose, sem liberação de gás (Dorella et al., 2006, Bastos et al., 2012). Huerta et.al. (2013) realizaram um estudo com testes bioquímicos que analisou o kit *API Coryne* (Merieux) quanto sua utilidade em laboratório de microbiologia, para identificar *C. pseudotuberculosis*, e concluiu que se trata de um método altamente recomendável.

A realização das provas bioquímicas possui uma importância significativa para que se possa classificar a qual biovar pertence a amostra. Essa diferenciação é dada pela redução de nitrato. Quando o resultado é negativo, a espécie pertence ao biovar *ovis*, que infecta caprinos e ovinos, e se o resultado for redução de nitrato positivo, a amostra pertence ao biovar *equi*, que infecta os equinos e bovinos (Hassan et al. 2012).

As cinco amostras analisadas nesse estudo foram negativas para a redução de nitrato, e de acordo com a literatura consultada, classificam-nas como *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* responsável por infectar preferencialmente ovinos e caprinos (Connor et al 2000).

A introdução de técnicas moleculares tem se mostrado um caminho confiável para a identificação das espécies de *Corynebacterium*. O gene *rpoB*, codifica a subunidade- β da RNA polimerase, e vem sendo utilizado para a identificação de espécie e subespécie de *Corynebacterium* spp. auxiliando nos testes de diagnósticos. Alguns estudos mostram a importância do gene *rpoB*, quanto a variação genotípica entre as espécies em seus respectivos biovars, revelando que as amostras comparadas são bastante homogêneas (Khamis et. al, 2004; Khamis et. al, 2005).

Para a realização da PCR-RFLP, baseou-se no estudo realizado por Pavan et al. (2012), para caracterizar genotipicamente as cinco amostras de *C. pseudotuberculosis*. O trabalho modelo realizou uma avaliação para a diferenciação das espécies *in silico*, para as enzimas *MseI* e *StuI*, por meio de uma triagem de todas as sequências do gene *rpoB* disponíveis no banco de dados GenBank, para verificar os locais de restrição para essas enzimas, e avaliadas pelo programa REBASE. Essas investigações mostraram que para a maioria das espécies do gênero *Corynebacterium* não há locais de restrição para essas enzimas. As análises mostraram que *C. pseudotuberculosis* podem ser facilmente distinguidas de outras espécies do gênero utilizando o método de RFLP-PCR com as enzimas *MseI* e *StuI*, além do alto potencial de identificar variações genéticas entre as diferentes amostras de *C. pseudotuberculosis*.

Os padrões de restrição aqui obtidos foram compatíveis aos encontrados por Pavan et al (2012). Portanto, as amostras isoladas a partir de caprinos e ovinos, não apresentaram variações gênicas intra-espécie, sendo os perfis de bandas homogêneos.

As análises de virulência neste estudo estimaram a capacidade das amostras em induzir a morte nos animais. As amostras CBC 2512 e CBO 28033, nas diluições de 1×10^5 e 1×10^6 , foram as mais virulentas, pois estas ocasionaram maiores número de morte, em menor tempo. Este experimento serviu como base, para a escolha da amostra CBO 28033, para o desafio dos camundongos, o qual foi utilizada no teste de uma vacina de DNA, objeto de estudo do Laboratório de Engenharia Genética.

Quanto a patogenicidade observou-se que independentemente das concentrações de UFC/mL inoculadas, tanto a menor diluição de 1×10^3 UFC/ml quanto a maior diluição 1×10^6 UFC/ml, para as cinco amostras isoladas, foram capazes de induzir a doença nos camundongos.

A virulência e a patogenicidade se dão pela presença de ilhas genômicas (GEIs). As GEIs carregam codificações genéticas para os fatores de virulência, e são coletivamente conhecidas como ilhas de patogenicidade (PAIs). As PAIs caracterizam-se pela alta frequência de genes codificantes dos fatores de virulência, que são responsáveis por permitirem o aumento, e o crescimento do microrganismo no hospedeiro, mediar a adesão da colonização, invasão e evasão do sistema imune, fatores necessários para a infecção (Soares et al. 2012).

Estratégias moleculares são utilizadas, a fim de identificar e caracterizar determinantes gênicos, que podem estar relacionados à virulência e patogenicidade das amostras de *C. pseudotuberculosis*. Um exemplo, é a elaboração de mutantes, como o descrito por MacNamara et al (1994), que construiu mutantes de uma região sítio-específica do gene codificante da Fosfolipase D (PLD), e foi capaz de reduzir a capacidade de estabelecer infecção. A PLD é considerada até o momento o maior fator de virulência desta bactéria (Baird & Fontaine, 2007).

As cinco amostras de *C. pseudotuberculosis*, que foram isoladas de pequenos ruminantes com LC, são provenientes da mesma região. Fato este que pode levar a uma homogeneidade intraespecífica, dada pela análise de restrição do gene *rpoB*. Apesar disso, algumas amostras apresentaram virulência maior, talvez por mecanismos moleculares diferencialmente expressos, que podem ser descobertos pela análise genômica futura destas amostras.

As duas amostras de referência utilizadas neste estudo, 1002 (Linfovac) e 00512 (Fiocruz, T1), mostraram-se não virulentas e não patogênicas. A amostra vacinal 1002 atualmente comercializada no Brasil foi desenvolvida a partir de uma cepa naturalmente de baixa virulência, a qual foi identificada por meio de testes *in vivo*, por Ribeiro et al. (1991).

A amostra INCQS 00512 (Fiocruz, T1), que foi isolada a partir de uma cabra no estado da Bahia, é considerada naturalmente atenuada. Esta cepa vem sendo estudada, no intuito de elaborar uma vacina contra a Linfadenite Caseosa. Portanto este fato confirma a baixa virulência apresentada pelos grupos inoculados com a cepa 00512, do presente estudo (Moura-Costa et AL. 2008).

As análises anatomopatológicas dos órgãos dos camundongos infectados com *C. pseudotuberculosis*, mostraram que os abscessos encontrados neste estudo, se assemelham quanto à estrutura, às alterações desenvolvidas pela infecção natural em caprinos e ovinos, caracterizada por uma estrutura em formato lamelar, com deposição de material caseoso, e torno uma cápsula espessa e rígida (Baird & Fontaine 2008, Jesse et al. 2011).

Estudos anteriores demonstraram por meio da inoculação experimental de *C. pseudotuberculosis* em camundongos, que independentemente do local de infecção da bactéria, a disseminação ocorre por todo o organismo, onde se locomovem em fagócitos, ou até mesmo livres, com predominância nos órgãos do sistema mononuclear fagocitário tanto em linfonodos e baço, quanto em intestinos, fígado, rins e pulmões (Motta et al. 2010). No presente estudo o fígado foi o órgão mais acometido pelos abscessos. Outros órgãos também apresentaram abscessos, como intestino, rim, baço e estômago, também relatado por Jesse et al. (2011).

Jesse et al. (2011) relataram que após 15 horas da inoculação, foi possível observar alterações histológicas nos camundongos. Pépin et al. (1991) indicaram que 24 horas após a inoculação, é possível verificar que há formação de microabscessos próximo ao local de infecção. Em nosso estudo, as análises histopatológicas ocorreram nos camundongos eutanasiados 30 dias após a infecção experimental, os quais também, por meio da análise microscópica, apresentaram a formação de microabscessos.

As células inflamatórias mais encontradas foram os neutrófilos, macrófagos, plasmócitos, linfócitos e células gigantes. Os neutrófilos foram os mais frequentes, notando-se também um alto número de neutrófilos degenerados (piócitos), principalmente no centro necrótico, relatados também por Lan (1998).

A presença de colônias bacterianas foi confirmada pelo método de Gram histológico em cortes de abscessos. Geralmente o método de Gram é realizado em esfregaços bacteriológicos. Em cortes histológicos, esse é o primeiro estudo de *C. pseudotuberculosis*, a utilizar o método de Gram Histológico de Macallum Goodpasture. Souza et al. (2011) mostraram a presença de grandes colônias bacterianas, mas utilizando a coloração de H&E.

As análises histopatológicas não demonstraram diferenças na composição dos abscessos entre as amostras que foram capazes de conferir a lesão, e independentemente da quantidade de UFC/mL inoculadas, as lesões apresentaram uma morfologia padrão.

Baseando-se nos dados apresentados e na literatura disponível podemos concluir que, as análises bioquímicas caracterizaram as amostras como *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*. A caracterização genotípica mostrou que não houve diferenças gênicas intra-espécie, sendo o teste de PCR-RFLP uma ferramenta que pode ser utilizada para o diagnóstico da Linfadenite Caseosa, utilizando as enzimas *MseI* e *StuI* e o gene *rpoB*. As análises de virulência mostraram que as amostras CBC 2512 e CBO 28033 podem ser utilizadas em testes de desafios vacinais em camundongos, pois estas amostras apresentaram-se altamente virulentas e patogênicas. E o estudo anatomopatológico caracterizou os abscessos desenvolvidos pelo *C. pseudotuberculosis ovis*.

Futuras investigações são necessárias, para a descoberta dos fatores de virulência e patogenicidade, utilizando a análise genômica das cinco amostras estudadas.

AGRADECIMENTOS: À Embrapa gado de corte pelo apoio financeiro ao projeto e espaço cedido para a realização do trabalho, à CAPES pela bolsa concebida, à UCDB e UFMS.

REFERÊNCIAS

Baird GJ, FONTAINE, MC. (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J of Comp Pat* 137:179-210.

Bastos BL, Portela DRW, Dorella FA, Ribeiro D, Seyffert N, (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *J Clin Cell Immunol* S4:005. doi: 10.4172/2155-9899.S4-005.

Batey RG (1986). Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust Vet J* 63:269-272.

Binns SH, Green LE, Bailey M (2007). Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet Microbiol* 123 (1-3): 169-179.

Connor KM, Quierie MM, Baird G, Donachie W (2000). Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J clin microbiol* 38:2633–2637.

Costa MP, Mc Culloch, Almeida SS, Dorella FA, Fonseca CT, Oliveira DM, Teixeira MFS, Laskowska E, Lipinska B, Meyer R, Portela WD, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V (2011). Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. *BMC Res Notes* 4:243.

Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SG, Miyoshi A, Azevedo V (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* 37: 201-218.

Guimarães AS, Carmo FB, Pauletti RB, Seyffert N, Ribeiro D, Lage AP, Heinemann MB, A Miyoshi A, Azevedo V, Gouveia AMG (2011). Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. *IIOAB J* 2:33-43.

Hassan SS, Pereira UP, Islam A, Ali A, Bakhtiar SM, Ribeiro D, Santos AR, Soares SC, Dorella F, Pinto AC, Scheneider MPC, Barbosa MS, Almeida S, Abreu V, Aburjaile F, Carneiro AR, Cerdeira LT, Fiaux K, Barbosa E, Diniz C, Rocha FS, Ramos RTJ, Jain N, Tiwari S, Debmalaya B, Miyoshi A, Muller B, Silva A, Azevedo V (2012). Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis strain P54B96 isolated from antelope in South Africa obtained by rapid next generation sequencing technology. *Stand Genomic Sci* 7:189-199.

Huerta B, Gómez-Gascón L, Vela AI, Fernández-Garayzábal JF, Casamayon A, Tanadas C, Maldonado A 2013. Comparison of two biochemical methods for identifying *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep and goats. *The veter Jour* xxx , xxx–xxx.

Jesse, FFA, Sang SL, Saharee AA, Shahirudin S (2011). Pathological Changes in the Organs of Mice Model Inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* Organism. *Pertanika J. Trop Agric Sci* 34 (1):145–149.

Khamis A, Raoult D, Scola BL (2004). *rpoB* Gene Sequencing for Identification of *Corynebacterium* Species. *J of clin microbiol* 42:3925–3931.

Khamis A, Raoult D, Scola BL (2005). Comparison between *rpoB* and 16S rRNA Gene Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of *Corynebacterium*. *J clin microbiol* 43:1934–1936.

Kumar J, Singh F, Tripathi BN, Kumar R, Dixit SK, Sonawane GG (2012). Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in Sirohi goats of Rajasthan, India. *Trop Anim Health Prod* DOI 10.1007/s11250-012-0102-8.

Lan DTB, Taniguchi S, Makino S, Shirahata T, Nakane A. (1998). Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiol. Immunol* 42: 863–870.

Luna LG (1968). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd Ed., mcgraw-Hill Book Co., New York, pp. 32-46.

McNamara PJ, Bradley GA, Songer JG. (1994). Targeted mutagenesis of the phospholipase D results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol*, 12:921–930.

Motta RG, Cremasco ACM, Ribeiro MG (2010). Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. *Vet Zootec* 17(2): 200-213.

Moura-Costa LF, Bahia RC, Carminati R, Vale VLC, Paule BJA, Portela RW, Freire SM, Nascimento I, Schaer R, Barreto LMS, Meyer R. (2008). Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde´ goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Vet Immunol and Immunopathol* 126:131–141.

Muckle CA, Gyles CL (1982). Characterization of Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Can. J comp. Med.* 46: 206-208.

O'Reilly KM, Medley GF, Green LE, (2010). The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. *Prev Vet Med* 95:115–126

Pavan ME, Robles C, Cairó FM, Marcellino R, Pettinare MJ (2012). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase b-subunit gene (rpoB). *Resear in Vet Sci* 92:202–206.

Pascual C, Lawson PA, Farrow JA, GIMENEZ MN, COLLINS MD. (1995). Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 4:724–728.

Pepin M, Pardon P, Lantier F, Marly J, Levieux D, Lamand M. (1991). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: Kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Vet Microbiol*, 26:381-392.

Soares Soares SC, Abreu VAC, Ramos RTJ, Cerdeira L, Silva A, Baumbach J, Trost E, Tauch A, Hirata R, Mattos-Guaraldi AL, Miyoshi A, Azevedo V. (2012). PIPS: Pathogenicity Island Prediction Software. *PLoS One*, 7:1-10.

Souza MF, Carvalho AQ, Garino F, Riet-Correa F (2011). Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 31:224-230

Unicamp (2011). Técnicas histológicas empregadas no departamento de anatomia patológica-FCM UNICAMP.,<http://www.fcm.unicamp.br/deptos/anatomia/tecnicashistologicas.html#t16> Acesso fevereiro 2013.

Williamson LH (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin N Am: Food Anim Prat* 17: 359-371.

Zhang Y, Praszker J, Hodgson A, Pittard A.J (1994). Molecular analysis and characterization of a broad-host-range plasmid, pEP2. *J. Bacteriol* 179(18):5718-5728.