



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



ITALANEY FEHLBERG

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO POR
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS E/OU
MYCOBACTERIUM SPP. EM CAPRINOS COM SUSPEITA
CLÍNICA DE LINFADENITE CASEOSA**

Salvador
2010

ITALANEY FEHLBERG

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO POR
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS E/OU
MYCOBACTERIUM SPP. EM CAPRINOS COM SUSPEITA
CLÍNICA DE LINFADENITE CASEOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Co- orientador: Adriano Costa de Alcântara, MSc.

Salvador
2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA – Salvador - Bahia

F296 Fehlberg, Italaney.

Estudo da ocorrência de infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*
e/ou *Mycobacterium spp.* em caprinos com suspeita clínica de linfadenite caseosa./
Italaney Fehlberg. – Salvador, 2010.

81 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2010.

Orientador: Dr. Roberto José Meyer Nascimento, PhD

Co- orientador: Adriano Costa de Alcântara, MSc

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2. *Mycobacterium spp.* 3. Linfadenite
caseosa. 4. Tuberculose. 5. Cabra. I. Universidade Federal da Bahia II. Instituto de
Ciências da Saúde III. Título.

CDU:577.27: 579.62




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA




ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA ITALANEY FEHLBERG

Aos vinte dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dez, às nove horas, no auditório Professora Ophélia Gaudenzi terceiro andar no Instituto de Ciências da Saúde, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dr. Roberto José Meyer Nascimento, Orientador, Dra. Camila Alexandrina Viana Figueiredo, Dr. Moysés Sadigursky, se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "Estudo da ocorrência de infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e/ou *Mycobacterium* spp. em caprinos com suspeita clínica de linfadenite caseosa" da Mestranda Italaney Fehlberg. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Dissertação APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, vinte de dezembro do ano de 2010.


Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Orientador


Prof. Dr. Camila Alexandrina V. Figueiredo
Banca Examinadora


Prof. Dr. Moysés Sadigursky
Banca Examinadora


Profa. Dra. Songeli Menezes Freire
Coordenadora do PPGIm
ICS/UFBA


Italaney Fehlberg
Mestranda

*Dedico este trabalho, in memoriam, à saudosa co-orientadora professora **Eugênia Márcia de Deus Oliveira** pela confiança em ter me aceito como co-orientanda, apesar de ter me conhecido no início deste estudo. Embora tenhamos convivido pouco, carregarei para sempre em minha mente e em meu coração a lembrança da pessoa admirável e forte que ela era e que em tão pouco tempo me ensinou muito.*

Obrigada Professora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de tudo, pela força concedida para a conclusão deste trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio, força e carinho nos momentos difíceis e pela constante torcida.

De coração, a Pai que apesar de não estar aqui para dividir esta vitória comigo, sinto sua presença constante em minha vida. Obrigada pela admiração e pelo amor que sempre teve por mim. Saudades eternas.

A minha querida irmã Isley, pela ajuda e suporte diário e também pelos conselhos no início do trabalho escrito. Conselhos valiosos que muito me fizeram crescer e aprender. É confortante saber que posso contar contigo em qualquer momento.

Ao meu co-orientador e, também, namorado Adriano Costa de Alcântara que acompanhou de perto desde o início meus momentos de estresse, dor, agonia e crescimento. Saiba que sem você, sua compreensão e orientação tudo ficaria muito mais difícil. Agradeço a Deus por estar em minha vida.

Aos meus colegas de laboratório Sônia, Claudia Valle, Paulo Cirino, Marcos da Costa Silva, Alex Barbosa, Rosa Guedes, Mabel Proence, Patrícia Cisneiros, Bruno Bastos, Inara, Igor Tavares, Geraldo Pedral, Andréia Pacheco, Alan, Mariane, Selma, Letícia, Marivaldo e Tâmara Amorim pelos momentos de descontração, colaboração e apoio.

Aos veterinários e, também, amigos Ricardo Fraga Evangelista e Robson Cerqueira Bahia pela coleta dos materiais biológicos.

A Jaciara Campos e a Lessiandro Lopes Amaral por não medirem esforços para contatarem fazendas para coleta em Campo Formoso e Andorinha.

Aos funcionários, Francisca (Chica), Rafaela, Zilda, Teca, Mariluce, Luciene, Manuel, José e Sr. Mário pela colaboração indireta, porém muito importante.

A minha amiga Rejane pelo companheirismo e verdadeira amizade.

A Andreas Stocker pela oportunidade em fazer treinamento com extrações e PCR no Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) e também por ceder alguns materiais de uso laboratorial. Foi bastante proveitoso para a realização prática do meu trabalho.

Aos professores Ricardo Ribeiro e Milena Botelho Soares por ter cedido espaço no Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) do Hospital São Rafael para que eu pudesse fazer as extrações dos DNAs.

A professora Maria Isabela Guimarães Campos por ceder, sem restrição, seu laboratório experimental de Genética Humana para a realização de alguns ensaios.

Ao professor Renato Delmondez de Castro e seus alunos pelo uso do laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos, especialmente a Alexandre Correia, Cristiane Dantas e Erica Pereira que sempre se mostraram muito solícitos.

Aos professores Ann Sharpe do Central Veterinary Research Laboratory, Irlanda e Nadia Haddad da Ecole Nationale Veterinaire, França pelo suporte em materiais didáticos.

Ao Dr. Flávio Ribeiro de Araújo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Campo Grande, Mato Grosso do Sul por, gentilmente, ceder materiais de fundamental importância para a realização do estudo.

A professora Tereza Cristina Calmon Bittencourt pela assessoria nas análises estatísticas.

A Professora Theolis Costa Barbosa Bessa, a Tônia Azevedo Duarte, Evelin Santos Oliveira, Jaqueline Rodrigues e Elisabete Lopes Conceição do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), unidade Fiocruz de Salvador.

Aos proprietários das fazendas utilizadas por consentirem a coleta dos materiais biológicos e também a seus respectivos funcionários que muito colaboraram para a realização das mesmas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIIm) e a seus funcionários e professores que tanto contribuíram e colaboraram para minha qualificação nesta etapa acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAPEX) pelo apoio financeiro.

Por último, meu especial e sincero agradecimento ao professor ROBERTO MEYER pela orientação tranqüila e muito compreensiva. Muito obrigada.

*“... todas as vezes que se comprometerem a fazer algo na vida, procurem fazer do melhor modo, com honestidade, sinceridade e acima de tudo, com bom senso e sensibilidade.
... não se curvem às críticas insensatas, descomedidas, de pessoas que nem sempre têm
consciência do seu momento.*

*Façam de suas vidas uma eterna conquista, rumo ao conhecimento, à grandeza de ser, à
autenticidade e serão sempre vencedores”.*

M. Gandhi

RESUMO

Manuscrito

Avaliação da ocorrência de infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e/ou *Mycobacterium spp.* em caprinos com hipertrofia de linfonodos superficiais suspeitas de linfadenite caseosa

Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, com alta prevalência na Bahia, e *Mycobacterium spp.*, sem dados oficiais de ocorrência neste estado, podem resultar na formação de lesão granulomatosa, tanto em linfonodos superficiais quanto em órgãos internos. Isto pode gerar confusão no diagnóstico clínico de linfadenite caseosa e tuberculose nestes animais, mas que em decorrência da alta prevalência desta primeira acabam sendo diagnosticados clinicamente como linfadenite caseosa. Para estimar a ocorrência destas infecções como causadoras de hipertrofia nos linfonodos superficiais de caprinos é que o presente estudo foi realizado. Mil seiscientos e trinta e nove caprinos de cinco municípios do semi-árido baiano foram examinados quanto à presença destas lesões externas e dos 59 animais (3,6%) que as apresentavam, amostras de sangue total e do conteúdo dos abscessos foram coletadas. O sangue foi destinado para a realização do ELISA indireto anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* e os materiais de 56 abscessos foram destinados para a cultura de *Corynebacterium* e extração dos DNAs para identificação direta dos patógenos por PCR. A cultura detectou *Corynebacterium pseudotuberculosis* em 40 (71,4%) abscessos, enquanto o mPCR detectou em 41(73,2%). *Mycobacterium spp.* não foi identificado pela técnica molecular em nenhuma das amostras avaliadas. A sorologia para *C. pseudotuberculosis* identificou 42 (71,2%) dos 59 caprinos como positivos para linfadenite caseosa. Assim, a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi responsável pelas hipertrofias superficiais em mais de 71% dos caprinos avaliados pela cultura, sorologia e PCR, confirmando o diagnóstico clínico de linfadenite caseosa nestes animais. Exames adicionais são requeridos para garantir que a tuberculose não ocorre nos caprinos destes municípios da Bahia.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; *Mycobacterium spp.*; Linfadenite caseosa, Tuberculose; Cabra.

ABSTRACT

Manuscript

Evaluation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and/or *Mycobacterium* spp. occurrence on superficial hypertrophic lymph nodes from goats clinically suspicious of caseous lymphadenitis.

Infections caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, which are highly prevalent in Bahia state, and by *Mycobacterium* spp., without official data of its occurrence in the same state, usually form granulomatous lesions, both in superficial lymphonods as in internal organs. This aspect can lead to misdiagnose between both diseases in the animals evaluated which will be clinically considered as CL cases, mainly because of its high prevalence. The present study was done in order to estimate which infection is more often associated as the causative agent of superficial lymphonods hypertrophy in goats. One thousand, six hundred and thirty nine goats from five municipalities of the semi-arid region of Bahia state were evaluated for the presence of external lesions and fifty nine (3.6%) presenting them were selected for this study, from which blood and abscess content were collected. Blood was destined for serological tests (anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* ELISA) and caseous materials for culture and DNA extraction for PCR direct identification of the pathogens. Culture detected *C. pseudotuberculosis* in 40 (71.4%) abscesses, while mPCR detected 41(73.2%). *Mycobacterium* spp. were not identified by this molecular technique in none of the samples evaluated. Serology detected 42 (71.2%) of 59 goats as positives for CL. Thus, *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection was responsible for superficial lymphonods hypertrophy in more than 71% of the evaluated goats by culture, serology and mPCR, confirming the CL clinical diagnostics among these animals. Additional tests are required to guarantee Bahia state herds, in the evaluated municipalities, as tuberculosis free.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; *Mycobacterium* spp.; Caseous lymphadenitis; Tuberculosis; Goat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>C. pseudotuberculosis</i> corada pelo método de Gram	21
Figura 2 - Colônias de <i>C. pseudotuberculosis</i> em Agar-sangue	22
Figura 3 - Crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> em caldo BHI	23
Figura 4 - Lesões externas da LC em linfonodos parotídeo e submandibular de caprino	24
Figura 5 - Lesões pulmonares da LC em caprino	25
Figura 6 - Pus caseoso de um abscesso da LC em caprino	25
Figura 7 - BAAR corado pela técnica de Ziehl- Neelsen	32
Figura 8 - Lesões pulmonares em caprino com tuberculose	35
Figura 9 - Hipertrofia no linfonodo submandibular de caprino com tuberculose	35
Figura 10 - Tubérculos no baço caprino após generalização da infecção	36
Figura 11 - Etapas do procedimento da coleta de material de abscessos em caprinos	47
Figura 12 - Perfil de amplificação de <i>C. pseudotuberculosis</i> pelo mPCR	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de primers com os respectivos comprimentos dos produtos de amplificação para *C. pseudotuberculosis* 50

Quadro 2 - Lista de primers com o tamanho dos produtos de amplificação correspondentes indicando a presença ou ausência da região de diferença em 5 diferentes membros do complexo *Mycobacterium*. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diagnóstico positivo, pela mPCR, de *C. pseudotuberculosis* em diferentes linfonodos hipertrofiados de caprinos suspeitos de LC do semi-árido da Bahia, Brasil 56

Tabela 2 - Resultados do cultivo e mPCR para *C. pseudotuberculosis* de amostras clínicas coletadas de caprinos em 5 diferentes municípios da Bahia 57

Tabela 3 - Resultados do cultivo e ELISA para *C. pseudotuberculosis* de amostras clínicas coletadas de caprinos em 5 diferentes municípios da Bahia 57

Tabela 4 - Resultados do mPCR e ELISA para *C. pseudotuberculosis* de amostras clínicas coletadas de caprinos em 5 diferentes municípios da Bahia 58

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

API	Índice de perfil analítico (“Analytical profile Index”)
BHI	Infusão Cérebro Coração (“Brain Heart Infusion”)
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bp	pares de bases
CAE	Artrite Encefalite Caprina (“Caprine arthritis encephalitis”)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFP-10	10 – Kd “culture filtrate protein”
CR3	Receptor do complemento 3
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	dinucleotídeotrfosfatos
DO	Densidade Ótica
EBDA	Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)
ESAT-6	“Early Secretory Antigenic Target 6-kDa”
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
ISH	Inibição Sinérgica da Hemólise

LC	Linfadenite Caseosa
LIMI	Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação
mPCR	Reação em Cadeia da Polimerase multiplex (“Multiplex Polymerase Chain Reaction”)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (“Major Histocompatibility Complex”)
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Natural Killer
OPD	“o-Phenylenediamine dihydrochloride”
PBS-T20	Salina Tamponada com Fosfato Tween-20 (“Phosphate-Buffered Saline”)
PLD	Fosfolipase D
PPD	“Purified protein derivative”
RD	Região de Diferença
ROC	Receiver Operating Characteristic
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
rpoB	RNA polimerase subunidade β
TBE	Tris Borato EDTA
TCC	Teste Cervical Comparativo
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
UFC/g	Unidade formadora de colônia/grama
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. LINFADENITE CASEOSA	20
2.1.1 O Agente Etiológico.....	20
2.1.2 Aspectos da Patogênese e da Transmissão	24
2.1.3 Epidemiologia.....	26
2.1.4 Diagnóstico	28
2.2. TUBERCULOSE CAPRINA.....	31
2.2.1 O Agente Etiológico.....	31
2.2.2 Aspectos da Patogênese e da Transmissão	35
2.2.3 Epidemiologia.....	37
2.2.4 Diagnóstico	39
2.3. IMUNOLOGIA DAS INFECÇÕES BACTERIANAS INTRACELULARES.....	42
3. OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL.....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 ANIMAIS.....	46
4.2 ESPÉCIMES CLÍNICOS.....	46
4.3 CULTURA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>C. pseudotuberculosis</i>	47
4.4 ELISA INDIRETO ANTI- <i>C. pseudotuberculosis</i>	48
4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) MULTIPLEX.....	49

4.5.1. Extração de DNA dos conteúdos dos abscessos.....	49
4.5.2. Primers.....	49
4.5.3. Condições do mPCR de <i>C. pseudotuberculosis</i>	52
4.5.4. Condições do mPCR de <i>Mycobacterium spp</i>	52
4.6. ELETROFORESE.....	53
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4.8. COMITÊ DE ÉTICA.....	53
5. RESULTADOS.....	54
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICES.....	78
APÊNDICE A.....	78
APÊNDICE B.....	80
ANEXOS.....	81
ANEXOS A.....	81

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura no Brasil apresenta-se em expansão e, nos últimos anos, vem ganhando grande impulso pelo potencial que representa. O Brasil detém um expressivo rebanho caprino, com sua grande maioria localizada principalmente nas zonas semi-áridas da região nordeste, onde são explorados, comumente, para subsistência familiar (QUINTANS, 1995; CORDEIRO, 1998). Em decorrência do importante papel sócio econômico que esta atividade desempenha nesta região brasileira, as doenças que acometem o rebanho caprino tornam-se sérios problemas para os produtores deste pequeno ruminante.

Entre algumas destas doenças, geradoras de muitos prejuízos para os caprinocultores, estão a Linfadenite Caseosa (LC), causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis*, e a tuberculose, causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis* e que representa, adicionalmente, uma séria ameaça para a saúde pública (ALVES & OLANDER, 1999; BOSE, 2008). Ambas são doenças infecciosas tipicamente crônicas caracterizadas pela formação de lesão granulomatosa que pode afetar tanto linfonodos superficiais quanto órgãos internos (BERNABÉ *et al.*, 1991b; DORELLA *et al.*, 2006; CRAWSHAW *et al.*, 2008), e que têm, como principais rotas de transmissão, as feridas superficiais na pele dos animais e a via aerógena, respectivamente (POLLOCK *et al.*, 2006; BAIRD & FONTAINE, 2007).

Enquanto a linfadenite caseosa tem ampla distribuição no mundo, a tuberculose caprina foi, por muito tempo, considerada rara nesta espécie animal, o que levou ao errôneo conceito de que os caprinos fossem naturalmente resistentes à doença. Atualmente, estudos revelam que, além deste pequeno ruminante ser susceptível à tuberculose (BIET *et al.*, 2005), vários países já têm relatos da ocorrência da doença nesta espécie animal (GUTIÉRREZ, 1995; HADDAD *et al.*, 2001; PRODINGER *et al.*, 2005; CADMUS *et al.*, 2009).

No Brasil, a LC apresenta alta prevalência, principalmente na região Nordeste e no estado da Bahia (MOURA-COSTA, 2002), onde representa um sério problema sócio-econômico (BRASIL, 2007). Por outro lado, como nosso país não tem dados oficiais sobre a prevalência da tuberculose nos caprinos, em decorrência da escassez de trabalhos realizados, ela não é vista como um problema pelas autoridades e criadores do Brasil. No entanto, sua ocorrência já foi relatada no território brasileiro (PINHEIRO *et al.*, 2007; BENESI *et al.*,

2008; MELO, *et al.*, 2005), inclusive associada com infecções por *Corynebacterium spp.* (BENESI *et al.*, 2009).

Com as similaridades na formação e no padrão de distribuição das lesões nestas enfermidades, torna-se difícil distinguir entre as duas quando os caprinos, em um rebanho, apresentam linfonodos superficiais hipertrofiados. Ainda, os produtores e técnicos da Bahia tendem a diagnosticar clinicamente esta hipertrofia como característica de linfadenite caseosa em decorrência da sua alta prevalência neste estado. Com a finalidade de evitar diagnóstico clínico equivocado e auxiliar as autoridades sanitárias e os produtores na sanidade dos rebanhos e na qualidade dos produtos comercializados é que este estudo foi realizado. Caprinos com abscessos em linfonodos superficiais foram avaliados para verificar se esta hipertrofia é resultado de infecções por *C. pseudotuberculosis* e/ou *Mycobacterium spp.*

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. LINFADENITE CASEOSA (LC)

2.1.1. O Agente Etiológico

Corynebacterium pseudotuberculosis, agente etiológico da Linfadenite Caseosa (LC) em caprinos e ovinos, pertence ao gênero *Corynebacterium* e ao grupo supragenérico dos *Actinomycetes* que inclui, também, os gêneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Nocardia* (WILLIAMSON, 2001; PAULE *et al.*, 2004; DORELLA *et al.*, 2006; BAIRD & FONTAINE, 2007; D'AFONSECA *et al.*, 2008). Esta bactéria pode infectar e causar doenças também em outras espécies animais tais como cavalos, bovinos, suínos, lhamas, búfalos e, embora não seja muito comum, já foram relatadas infecções em humanos, o que faz da LC uma potencial zoonose (KARIUKI & POULTON, 1982; MILLS, MITCHELL e LIM, 1997; PEEL *et al.*, 1997; FOLEY, *et al.*, 2004; JOIN-LAMBERT *et al.*, 2006).

Esse agente foi isolado pela primeira vez em 1888 por Edward Nocard de uma linfangite bovina e, posteriormente, em 1891 por Hugo von Preisz de um abscesso renal ovino. Sua atual nomenclatura, no entanto, foi adotada somente em 1948 quando foi publicado a 6ª edição do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey. Outros sinônimos para *Corynebacterium pseudotuberculosis* incluíram *Bacillus* “Preizs–Nocard”, *Bacillus pseudotuberculosis*, *Bacillus pseudotuberculosis ovis* e *Corynebacterium ovis* (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA *et al.*, 2006a; BAIRD & FONTAINE, 2007).

O termo “*pseudotuberculosis*”, que deriva do grego *pseudes tuberculosis* e significa “falsa tuberculose”, foi adotado no final do século 19 e faz referência para a similaridade clínica das lesões da LC com os nódulos caseosos da tuberculose (BAIRD & FONTAINE, 2007).

Morfologicamente, as bactérias da espécie *C. pseudotuberculosis* são curtas, com dimensões que variam entre 1,0-3,0 µm de comprimento por 0,5-0,6 µm de diâmetro, sendo coradas positivamente pelo método de Gram (Figura 1). São intracelulares facultativas de

macrófagos desprovidas de motilidade, capsulas e esporos e que exibem variação em suas formas, podendo apresentar aspecto cocóide ou bacilar filamentososo. Podem se apresentar isoladas, em pares ou formando grupamentos irregulares em paliçada como visualizado na figura 1 (BILLINGTON *et al.*, 2002; MOURA-COSTA, 2002; DORELLA *et al.*, 2006a; BAIRD & FONTAINE, 2007).

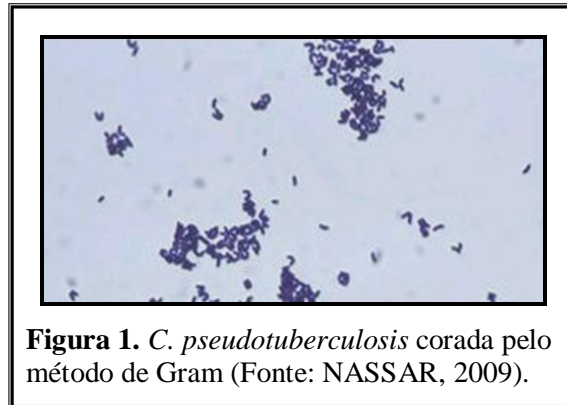


Figura 1. *C. pseudotuberculosis* corada pelo método de Gram (Fonte: NASSAR, 2009).

A parede celular dessa espécie possui uma organização específica, sendo similar, em composição química e ultraestruturalmente, à parede celular das micobactérias, possuindo, no entanto, os ácidos micólicos (ácidos corinomicólicos no gênero *Corynebacterium*) com cadeia carbônica menor (22-36 átomos de carbono) (PUECH, 2001; BAYAN *et al.*, 2003; DORELLA *et al.*, 2006a; ZUBER *et al.*, 2008).

Quanto às reações bioquímicas, *C. pseudotuberculosis* é caracterizada por apresentar uma grande capacidade fermentativa, sendo capaz de utilizar para tal propriedade uma variada fonte de carboidratos como a glicose, frutose, manose, maltose e sacarose, com produção de ácido, porém sem produzir gás. Mostra-se positiva para os testes de catalase, urease e fosfolipase D, porém negativa para os testes de oxidase, esculina, hidrólise de gelatina, digestão da caseína e fermentação da lactose. A redução de nitrato é variável, não sendo geralmente observada em cepas isoladas de pequenos ruminantes (biovar *ovis*) (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA *et al.*, 2006a).

Nutricionalmente trata-se de uma bactéria exigente que requer para seu bom crescimento meios suplementados com soro animal ou enriquecidos, como o ágar-sangue e o ágar ou caldo BHI (“Brain Heart Infusion”), apresentando rendimento aumentado quando, a este último, acrescenta-se extrato de levedura, triptona ou lactoalbumina (MOURA-COSTA, 2002).

É caracterizada, quanto à temperatura de crescimento, como uma bactéria mesófila, possuindo um rendimento de crescimento ideal a 37°C, sob condições aeróbicas ou anaeróbicas e a um pH ideal, variando entre 7,0 e 7,2. Seu período de incubação é de 48 à 72h e, quando o ágar-sangue é utilizado, colônias pequenas, esbranquiçadas ou opacas, secas, convexas e friáveis em consistência são visualizadas na superfície do meio (Figura 2) (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA *et al.*, 2006a).

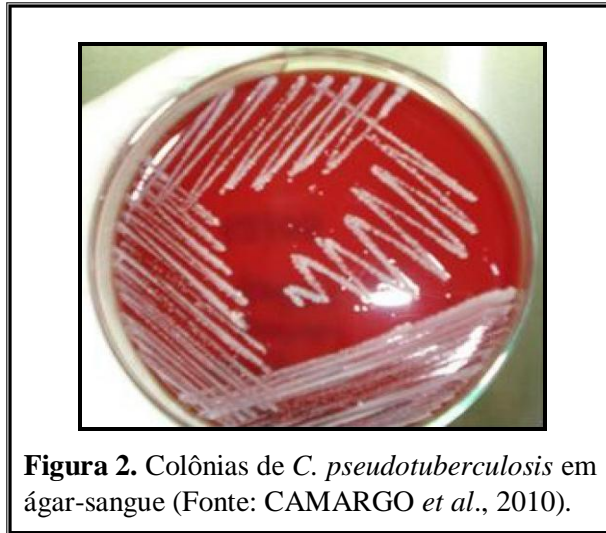


Figura 2. Colônias de *C. pseudotuberculosis* em ágar-sangue (Fonte: CAMARGO *et al.*, 2010).

Embora seja uma bactéria beta-hemolítica, a hemólise ao redor das colônias é variável, podendo não aparecer no período de 48 à 72h. Quando se acrescenta ao meio o detergente Tween 80, a atividade hemolítica das cepas é favorecida, assim como grandes zonas se desenvolvem na presença de *Rhodococcus equi* (DORELLA *et al.*, 2006a; BAIRD & FONTAINE, 2007).

O crescimento em meio líquido é caracterizado pela formação de uma película na superfície do meio sem causar a turvação deste e que, após agitação, é desfeita e se deposita em flocos (figura 3) (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA *et al.*, 2006a). Esse crescimento característico é atribuído à presença dos ácidos corinomicólicos na parede celular desta bactéria e a formação de uma película mais densa que está associada a uma maior virulência (JOLLY, 1966 *apud* MOURA-COSTA, 2002).

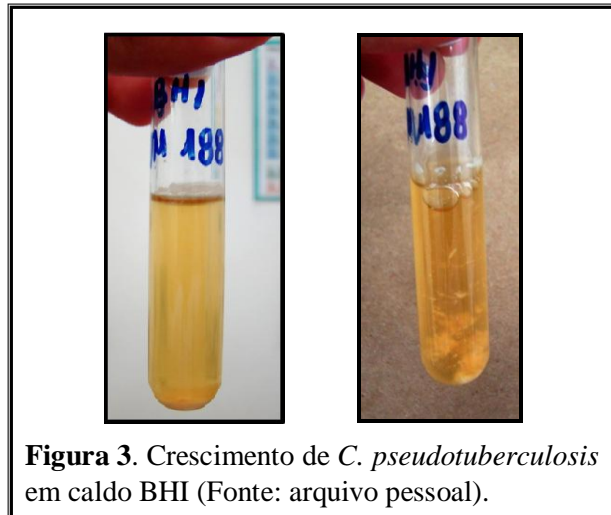


Figura 3. Crescimento de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI (Fonte: arquivo pessoal).

Por não possuir seu genoma completamente seqüenciado, *Corynebacterium pseudotuberculosis* ainda é pouco caracterizada no que diz respeito a seus determinantes genéticos de virulência (DORELLA *et al.*, 2006a). Esta espécie tem somente 19 proteínas identificadas na base de dados do GenPept e em torno de 1230 sequências genômicas investigadas já depositadas no GenBank, sendo que a maioria desses genes codificam fatores diretamente relacionados com a virulência e patogenicidade dessa bactéria (DORELLA *et al.*, 2006b; D'AFONSECA *et al.*, 2008).

Até o momento, somente dois fatores de virulência que conferem características patogênicas à *C. pseudotuberculosis* foram bem descritos e caracterizados, sendo eles a fosfolipase D (PLD) e os ácidos corinomicólicos (BAIRD & FONTAINE, 2007). A PLD é uma potente exotoxina hemolítica importante tanto no desenvolvimento, favorecendo a invasão bacteriana, quanto no diagnóstico sorológico da LC. Os ácidos corinomicólicos, por criarem uma espessa camada cerosa que reveste a parede celular da bactéria, estão envolvidos na proteção contra a digestão pelas enzimas intracelulares, capacitando sua sobrevivência e proliferação no interior dos macrófagos, além de apresentarem propriedades citotóxicas e induzirem a caseificação (WILLIAMSON, 2001; BILLINGTON *et al.*, 2002; PAULE *et al.*, 2004; BAIRD & FONTAINE, 2007).

Sendo uma bactéria bastante resistente, *C. pseudotuberculosis* pode permanecer viável durante meses no solo, cercas, fezes, exudato purulento, carnes congeladas, locais úmidos e escuros, tesouras, pele, entre outros, o que pode tornar sua presença constante no ambiente de criação (RADOSTITS *et al.*, 2002; ANDERSON, RINGS e PUGH, 2005). No entanto, é

sensível ao calor por mais de uma hora, à temperatura superior a 70 °C e a vários desinfetantes comuns como hipoclorito de cálcio, sódio e soluções de formalina e cresol, sendo que na presença de material orgânico é necessário um tempo maior de exposição às soluções (BAIRD & FONTAINE, 2007). Mostra-se sensível também a vários antibióticos a exemplo da ampicilina, do cloranfenicol, da lincomicina, da tetraciclina, da gentamicina, da penicilina, do trimetropim, da ciprofloxacina e do sulfametoxazol, já havendo, no entanto, relatos de cepas multirresistentes a muitas destas drogas (ABREU *et al*, 2008).

2.1.2. Aspectos da Patogênese e Transmissão

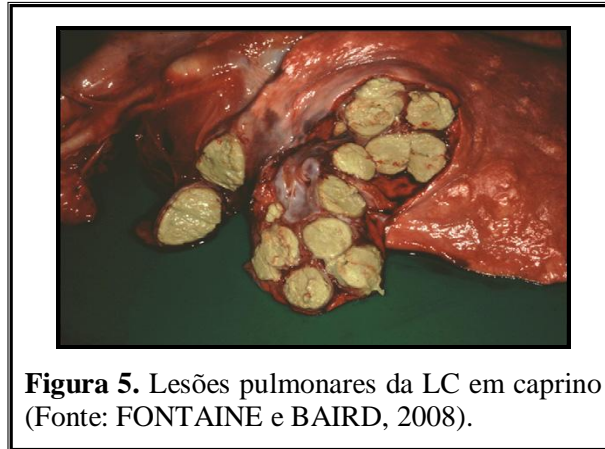
A linfadenite caseosa é uma doença infecto-contagiosa crônica conhecida, popularmente, como “mal do carço” ou “falsa tuberculose” (AYERS, 1977). Em pequenos ruminantes resulta, geralmente, na formação de abscessos ou lesões granulomatosas que podem se manifestar de duas diferentes formas. Na primeira delas, a *externa* (também conhecida como cutânea ou superficial), as lesões se desenvolvem em linfonodos superficiais ou tecidos subcutâneos. Em caprinos, os principais linfonodos superficiais afetados são os parotídeos, os submandibulares (Figura 4), os pré-escapulares e os pré-curais, embora os poplíteos, retrofaríngeos e retromamários sejam também afetados (SMITH & SHERMAN, 1994; KURIA *et al.*, 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007; SOARES, VIANA e LEMOS, 2007).



Figura 4. Lesões externas da LC em linfonodos parotídeo e submandibular de caprino (Fonte: arquivo pessoal).

Na segunda forma, *visceral*, com a disseminação linfática e hematogênica da bactéria, as lesões se desenvolvem em órgãos internos (Figura 5), comumente nos linfonodos mediastínicos ou nos pulmões, entretanto qualquer órgão pode ser acometido. É menos

comum nos caprinos, sendo observada com mais frequência em ovinos (PEKELDER, 2000; BAIRD & FONTAINE, 2007; KURIA *et al.*, 2001).



Essas duas formas de manifestações clínicas podem ou não coexistir em um mesmo animal e o período de incubação para que as lesões apareçam é de aproximadamente 2 a 6 meses, o que torna a doença clinicamente detectável em animais mais velhos (PEKELDER, 2000; WILLIAMSON, 2001).

Geralmente, os abscessos granulomatosos da LC consistem de camadas de macrófagos e linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) distribuídas em torno de um centro necrótico e circundadas por uma cápsula fibrosa. Este centro necrótico contém pus de coloração variando do branco ao amarelado e/ou esverdeado que, inicialmente, é mole e semi-fluido, evoluindo com o tempo, para uma consistência pastosa (figura 6), chegando à caseosa nas lesões mais antigas (PÉPIN *et al.*, 1994; WILLIAMSON, 2001; RADOSTITS *et al.*, 2002; FONTAINE & BAIRD, 2008).



Como essas lesões podem se romper espontaneamente, o seu conteúdo purulento representa uma importante fonte de contaminação horizontal entre os animais, já que a quantidade de bactérias viáveis no pus é muito grande, na ordem de 1×10^6 e 5×10^7 UFC/g

(BROWN & OLANDER, 1987 *apud* FONTAINE & BAIRD, 2008). Uma vez rompida a lesão e o seu conteúdo liberado, ocorre a subsequente contaminação da pele do animal e do meio ambiente em que ele vive, podendo, então, ocorrer a transmissão pelo contato físico direto dos animais sadios com o animal infectado ou, indiretamente, via fômites contaminados. A transmissão por esta última via é atribuída à capacidade da *C. pseudotuberculosis* em sobreviver no solo e no ambiente, o que também contribui para a disseminação da doença em um rebanho, dificultando, conseqüentemente, a sua erradicação (DORELLA *et al.*, 2006a).

Em infecções naturais, a principal porta de entrada da bactéria é através da pele, normalmente como resultado de feridas superficiais ou pequenas abrasões geradas por práticas de manejo (tosquia, castração, brincagem, casqueamento, tatuagem) ou por qualquer outro evento traumático na pele do animal (DORELLA *et al.*, 2006a; BAIRD & FONTAINE, 2007).

A entrada da bactéria pela cavidade oral também pode ocorrer quando os animais ingerem água ou qualquer alimento contaminado e, assim, as lesões se desenvolverão nos linfonodos da cabeça e pescoço (BAIRD & FONTAINE, 2007).

A rota aerógena, postulada por Stoops e colaboradores (1984), é outra via de infecção que tem sido amplamente citada por alguns autores como porta de entrada da bactéria. No entanto, ela é controversa e, embora represente um risco teórico de infecção, pesquisas adicionais para sua comprovação são requeridas (BAIRD & FONTAINE, 2007).

2.1.3. Epidemiologia

A LC é uma doença de distribuição mundial, presente na maioria das áreas em que a caprinocultura é desenvolvida e estando associada a grandes perdas econômicas, pois ela diminui a produtividade do rebanho afetado (SMITH & SHERMAN, 1994; BELCHIOR *et al.*, 2006). Esta infecção acomete os animais de ambas as raças, sexos e idades, contudo, apresenta-se mais prevalente entre o primeiro e o segundo ano de vida do animal e em fêmeas (AL-GAABARY *et al.*, 2009).

No Brasil ela já foi relatada em algumas regiões, a exemplo da região Sudeste (LANGENEGGER & SCHERER, 1991; SEYFFERT *et al.*, 2010) e Sul (CAMARGO, 2010), mas é principalmente na região Nordeste, a qual detém 91,4% do rebanho caprino brasileiro (BRASIL, 2007), que a sua alta prevalência (30 a 50%) é preocupante (COSTA *et al.*, 1973 *apud* ABREU *et al.*, 2008).

A Bahia, por ser a maior produtora de caprinos e a segunda maior de ovinos do país com 33,7% e 19,1%, respectivamente, do efetivo nacional (BRASIL, 2007), é o estado nordestino mais afetado, principalmente nas regiões semi-áridas, onde os animais são criados de forma extensiva na vegetação espinhosa da Caatinga, favorecendo, assim, a contaminação dos animais e a disseminação da doença (EBDA, 2000). Um estudo sorológico realizado no ano de 2003 em 19 municípios do semi-árido baiano demonstrou uma prevalência média de 46,6% da LC em caprinos, comprovando como esta doença continua altamente prevalente neste estado (MEYER, 2003).

Como a caprinocultura representa uma das principais atividades econômicas, principalmente para os pequenos criadores da região Nordeste, onde muitos dos quais a têm como principal fonte de renda e de alimentação, os prejuízos provocados pela LC são muito preocupantes (CORDEIRO, 1998).

Geralmente a doença está associada com uma debilidade geral no animal, afetando o ganho de peso e a eficiência reprodutiva; desvalorização da pele devido às cicatrizes resultantes dos abscessos; elevação dos custos com medicamentos para o tratamento das lesões externas; diminuição da produção de leite e carnes; condenação de carcaças e vísceras e, nos casos mais graves, resultar na morte dos animais (ALVES e OLANDER, 1999; MEYER *et al.*, 2002).

Assim, com os prejuízos provocados pela LC, esta se torna um sério problema econômico e social, uma vez que afeta, além dos pequenos produtores, a indústria local que tem como principal prejuízo a diminuição das exportações dos derivados da caprinocultura.

2.1.4. Diagnóstico

O diagnóstico da LC é baseado, primeiramente, no exame clínico para constatar a presença de abscessos de consistência firme a ligeiramente flutuante em linfonodos superficiais, sendo sugestivo da enfermidade em rebanhos endêmicos para a LC.

Para a confirmação do diagnóstico é requerido o cultivo para o isolamento da *C. pseudotuberculosis* a partir do material purulento com a sua subsequente identificação, a qual pode ser realizada pelo seu perfil enzimático e sua capacidade fermentativa. Para este fim, kits bioquímicos comerciais padronizados estão disponíveis para a identificação das bactérias do gênero *Corynebacterium*, como por exemplo, o sistema de identificação API (“Analytical Profile Index”) *coryne* da bioMérieux (BAIRD & FONTAINE, 2007). Este sistema se mostra confiável e rápido quando comparado com os testes de identificação bioquímicos convencionais (FRENEY *et al.*, 1991).

Embora o cultivo permaneça o padrão ouro no diagnóstico da LC, nem sempre é possível ou vantajosa a sua realização. Primeiro, porque no momento da coleta, ao puncionar o material caseoso, pode ocorrer contaminação da pele do animal e do ambiente com o pus, o que representa um risco na transmissão para outros animais. Além disso, as lesões externas crônicas que já se romperam frequentemente se tornam fibróticas, podendo assim, conter pouco pus e poucos organismos viáveis. Por último, os animais com as formas viscerais permanecem uma potencial fonte de transmissão para os outros animais, já que estes podem não apresentar lesões externas para serem amostradas para a realização dos testes (BAIRD & FONTAINE, 2007).

Uma alternativa para o diagnóstico da LC, sem a necessidade de se recorrer ao cultivo, são os testes sorológicos, a exemplo do ensaio imunoenzimático (ELISA), os quais são baseados na detecção da resposta humoral a diversos antígenos de *C. pseudotuberculosis* (TER LAAK *et al.*, 1992; MENZIES *et al.*, 1994; SCHREUDER, TER LAAK e DERCKSEN, 1994; STING, STENG e SPENGLER, 1998; DERCKSEN *et al.*, 2000; KABA, KUTSCHKE, GERLACH, 2001). Alguns destes testes ELISA utilizam como antígeno a exotoxina PLD bruta (TER LAAK *et al.*, 1992; DERCKSEN, *et al.*, 2000) ou recombinante

(MENZIES *et al.*, 1994; MENZIES, HWANG e PRESCOTT, 2004) para acessar a resposta de anticorpos contra a LC.

Com algumas exceções (SCHREUDER, TER LAAK e DERCKSEN, 1994; DERCKSEN *et al.*, 2000), muitos destes testes apresentam sensibilidade e especificidade inadequadas para serem utilizados de forma confiável em programas de controle baseados na identificação e remoção de animais infectados.

Um estudo realizado por Carminati e colaboradores (2003), na Universidade Federal da Bahia, determinou a sensibilidade e a especificidade de um teste ELISA indireto para o diagnóstico da LC em caprinos utilizando, como antígeno, a fração secretada em caldo BHI. A sensibilidade e especificidade encontradas no estudo foram de 93,5% e 100% respectivamente, valores que permitem sua utilização em programas de controle da LC em caprinos.

Outros testes sorológicos incluem a fixação do complemento (SHIGIDI, 1979), imunodifusão (BURRELL, 1980), microaglutinação (MENZIES & MUCKLE, 1989) e inibição sinérgica da hemólise (ISH) (KURIA & HOLSTAD, 1989). Este último pode diagnosticar infecções precoces e também pode auxiliar nos casos de abscessos internos, porém, ele não é suficientemente específico para justificar sua utilização em práticas de descarte (LOFSTED, 2002).

Além da resposta humoral, aquela mediada por células também pode ser acessada para o diagnóstico da LC, utilizando-se um teste ELISA para a dosagem do interferon-gama (IFN- γ) em cultura de sangue total, sob estímulo de antígenos deste patógeno (PRESCOTT, MENZIES e HWANG, 2002; MENZIES, HWANG e PRESCOTT, 2004; SUNIL *et al.*, 2008). No estudo de Menzies, Hwang e Prescott (2004), o teste ELISA para IFN- γ foi comparado ao ELISA com a PLD recombinante para o diagnóstico da LC em caprinos infectados experimentalmente. O primeiro ELISA diferenciou, de maneira precisa, pelo período de um ano, cabras infectadas e não-infectadas com uma confiabilidade de 89,2% e 97,1%, respectivamente, ao passo que no segundo ELISA a diferenciação foi de 81% e 97%, respectivamente. No entanto, o ELISA com a PLD foi mais preditivo da presença das lesões observadas na necropsia. Outro estudo de produção de IFN- γ em cultura de sangue total comparou cabras infectadas após estimulação com ambos os antígenos secretados e somáticos

da *C. pseudotuberculosis*. Os resultados indicaram produção significativamente mais alta de IFN- γ em resposta aos antígenos secretados que aos antígenos somáticos (MEYER, *et al.*, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é outro teste diagnóstico que vem ganhando cada vez mais credibilidade. Cetinkaya e colaboradores (2002) desenvolveram um PCR utilizando o gene *16S rRNA* para estimar a prevalência da LC em abatedouros da Turquia e, embora os autores tenham considerado o PCR bem sucedido para ser aplicado como teste alternativo para os métodos convencionais, foi observado reatividade cruzada com *Corynebacterium ulcerans*, um importante patógeno de pequenos ruminantes, que também pode acometer o homem. Um PCR multiplex, baseado na amplificação de três genes, *16S rRNA*, *rpoB* e *pld*, desenvolvido em 2007, além de diferenciar *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans*, apresentou uma sensibilidade de 94,6%, podendo também ser realizado diretamente de amostras de pus. Como se mostrou um método rápido e sensível, os autores propõem sua utilização, ao invés da cultura, como teste confirmatório da LC (PACHECO *et al.*, 2007).

Como existem outras doenças geradoras de abscessos como, por exemplo, a tuberculose que também acomete os caprinos e cursa com perda de peso e formação de lesões tanto superficiais quanto viscerais, deve-se fazer o diagnóstico diferencial da LC com esta doença, para que o tratamento adequado seja aplicado (BENESI *et al.*, 2009; SHARPE *et al.*, 2010). Embora outros patógenos bacterianos a exemplo do *Actinobacillus licheniformis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella multocida* e, em alguns países, o *Staphylococcus aureus* sejam capazes de produzir linfadenopatia supurativa, o diagnóstico diferencial com estes agentes não se faz necessário, pois estas infecções são esporádicas e raramente vistas como problema em um rebanho (PEKELDER, 2000; BAIRD & FONTAINE, 2007).

2.2. TUBERCULOSE CAPRINA

2.2.1. O Agente Etiológico

O agente etiológico mais comum da tuberculose caprina é o *Mycobacterium bovis*, embora *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* tenham sido isolados ocasionalmente (LESSLIE *et al.*, 1960; BERNABÉ *et al.*, 1991a; GARCÍA-MARÍN, PALAU e BADIOLA, 1992; GUTIÉRREZ, 1995; CRAWSHAW *et al.*, 2008).

Este agente pertence à família *Mycobacteriaceae*, ao gênero *Mycobacterium* e está inserido em um grupo de bactérias filogeneticamente relacionadas denominado Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que inclui também as espécies *M. africanum*, *M. bovis* BCG, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedi*, *M. tuberculosis* e *M. caprae* (AYELE *et al.*, 2004; PRODINGER *et al.*, 2005; SKORIC *et al.*, 2007). Este último, assim denominado por ter sido isolado primeiro em cabras com lesões tuberculosas disseminadas, é o mais novo membro do grupo e é caracterizado por sua sensibilidade à pirazinamida e por sua patogenicidade a várias espécies de animais, incluindo o homem. No entanto, ele ainda não foi isolado no Brasil e os casos descritos até o momento são restritos ao continente europeu (GUTIÉRREZ *et al.*, 1997; ARANAZ *et al.*, 1999, 2003; KUBICA, RUSCH-GERDES e NIEMANN, 2003; PRODINGER *et al.*, 2005).

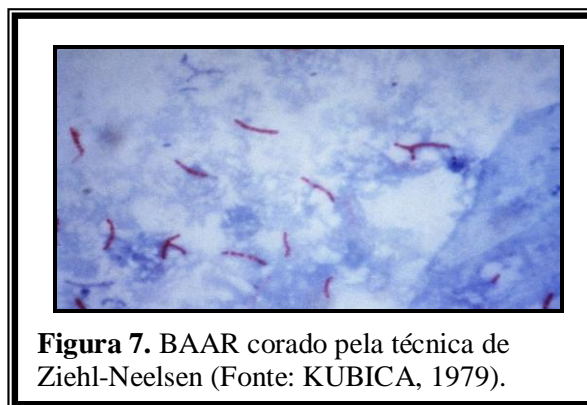
O *M. bovis* é a espécie do complexo MTB que possui um dos mais amplos espectros de hospedeiros, podendo infectar diversas espécies de mamíferos selvagens, silvestres e domésticos, incluindo, neste último caso, além dos bovinos, os caninos, felinos, suínos, eqüinos, ovinos e caprinos. Embora seja primariamente um patógeno animal, ele também pode infectar e causar doença ao homem e, assim, torna-se uma importante ameaça zoonótica para a saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (O'REILLY & DABORN, 1995; COSIVI *et al.*, 1998; PRODINGER *et al.*, 2002; WEDLOCK *et al.*, 2002; KUBICA, RUSCH-GERDE e NIEMANN, 2003; HADDAD, MASSELOT e DURAND, 2004; BIET *et al.*, 2005; BOSE, 2008).

Entre os animais domésticos suscetíveis à tuberculose, os bovinos e as cabras são considerados os reservatórios do *M. bovis*, podendo transmitir a infecção para outros

hospedeiros, perpetuando, assim, a doença em um rebanho (ARANAZ *et al.*, 1999; PARRA *et al.*, 2003). Os reservatórios selvagens e silvestres são importantes nos países onde a tuberculose está erradicada ou em fase final de erradicação, pois representam uma ameaça de reintrodução da doença para os rebanhos livres, uma vez que não podem ser controlados (BIET *et al.*, 2005).

Morfologicamente, o agente da tuberculose nos caprinos é um bacilo curto, medindo entre 1-10 μm de comprimento por 0.2-0.5 μm de largura, apresentando-se em formato de bastonete reto, levemente curvado ou ramificado. É um aeróbio estrito, desprovido de motilidade, cápsula, flagelos e esporos, além de ser um organismo intracelular facultativo, geralmente, de macrófagos (EISENSTADT & HALL, 1995; SKORIC *et al.*, 2007).

É, tintorialmente, caracterizado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois uma vez corado pela fucsina aquecida, mostra-se resistente à descoloração com uma mistura de álcool-ácido clorídrico (coloração de Ziehl-Neelsen – ZN). Tal propriedade tintorial é atribuída ao grande conteúdo de ácidos micólicos presente em sua parede celular sendo, ao final da coloração, o BAAR visualizado com uma tonalidade rosada em um fundo azul gerado pelo contra corante azul de metileno (figura 7) (LÉVY-FRÉBAUL & PORTAELS, 1992; EISENSTADT & HALL, 1995; ABRAHÃO, 1999; SKORIC *et al.*, 2007; HETT & RUBIN, 2008).



Os ácidos micólicos que revestem a parede celular do bacilo são moléculas lipídicas hidrofóbicas com longas cadeias de carbono (60-90) que, além de afetarem as propriedades de permeabilidade, também são considerados um importante determinante de virulência do *M. bovis*. Eles protegem o bacilo da digestão pelas enzimas intracelulares, favorecendo sua sobrevivência dentro dos macrófagos, além de estarem associados com a resistência a muitos antibióticos (RASTOGI, LEGRAND e SOLA 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007).

Por ser um organismo de crescimento lento, com um tempo médio de divisão entre 12-24 horas, *M. bovis* requer, para seu isolamento inicial, um longo período de incubação que varia geralmente entre 3 e 12 semanas. Requer ainda, para tal finalidade, uma temperatura ideal de 37° C e meios ricos em nutrientes que contenham o piruvato de sódio como fonte de carbono, uma vez que o glicerol possui atividade inibitória para esta espécie. Os meios sólidos utilizados são tanto aqueles à base de ovo (Stonebrink e Lowenstein-Jensen) como à base de ágar enriquecidos com soro ou sangue (Middlebrook 7H10 e 7H11). O meio líquido (Middlebrook 7H9) é comumente utilizado para preparação de inóculos para os ensaios antimicrobianos, testes bioquímicos e manutenção de cepas estoque (CORNER & NICOLACOPOULOS, 1988; EISENSTADT & HALL, 1995; AYELE *et al.*, 2004).

No meio Stonebrink, o mais recomendado para o isolamento desta espécie, as colônias se apresentam brancas e pequenas, com bordas irregulares e superfície granular, sendo observadas a partir do 28° dia de incubação (MOTA *et al.*, 2002).

Bioquimicamente, *M. bovis* é caracterizado por apresentar sensibilidade à hidrazida, ser positivo para atividade de urease, hidrolisar moderadamente o Tween 80, ser negativo para atividade de catalase, pirazinamidase e arilsulfatase, além de não reduzir nitrato e não produzir niacina (LÉVY-FRÉBAUL & PORTAELS, 1992; EISENSTADT & HALL, 1995; AYELE *et al.*, 2004).

Quanto à constituição gênica, este bacilo possui, no seu genoma completamente sequenciado, 4.345.492 pares de base de comprimento e um conteúdo médio de G+C de 65,63%. Apresenta 99,95% de identidade com o genoma do *M. tuberculosis* e contém 3952 genes codificando proteínas (GARNIER *et al.*, 2003).

Uma região em particular no genoma das bactérias do complexo MTB é de grande interesse nas pesquisas, sendo considerada crucial na patogênese da tuberculose. Esta parte do genoma, denominada Região de Diferença 1 (RD1), é um fragmento de 9,5 quilobase (Kb) que compreende nove genes e que está ausente em todas as cepas vacinais de *M. bovis*. Fortes evidências experimentais indicam que genes presentes nesta região são essenciais para a virulência dos membros deste complexo e que sua deleção na cepa vacinal BCG (Bacillus Calmette-Guérin) pode ter sido o evento primário responsável pela atenuação do *M. bovis*.

virulento (ERNST, TREVEJO-NUÑEZ e BANAIIEE, 2007; GANGULY, SIDDIQUI e SHARMA, 2008).

Dois genes em especial do *locus* RD1 são bastante estudados, pois codificam duas proteínas secretadas de baixo peso molecular, a CFP-10 (10-kDa “culture filtrate protein”) e a ESAT-6 (6-kDa “early-secreted antigen target”), importantes, tanto na virulência, por subregular as funções dos macrófagos, quanto no diagnóstico sorológico da tuberculose, além de serem fortes candidatas vacinais (MUSTAFA *et al.*, 2002; WATERS *et al.*, 2004; e GANGULY, SIDDIQUI e SHARMA, 2008).

Dois outros genes de *M. bovis* que não se localizam no *locus* RD1 e que também são muito importantes e estudados são os que codificam duas proteínas antigênicas altamente homólogas e de elevada expressão, conhecidas como MPB70 e MPB83. A primeira é uma proteína secretada solúvel, abundantemente presente nos filtrados de cultura deste bacilo, enquanto a segunda é uma proteína glicosilada, associada à sua parede celular. Respostas imunológicas mediadas por células T e humorais, contra estas proteínas, têm sido extensivamente exploradas para o diagnóstico sensível e específico, tanto da tuberculose caprina quanto da bovina (ACOSTA *et al.*, 2000; HEWINSON *et al.*, 2006; WATERS *et al.*, 2006; MARASSI *et al.*, 2009; WIKER, 2009).

Quanto à resistência, esta micobactéria é caracterizada por conseguir sobreviver no ambiente por longos períodos, principalmente em lugares úmidos e ao abrigo da luz solar, permanecendo viável em pastos, estábulos e no esterco por até 2 anos; na água por até 1 ano; e 10 meses nos produtos de origem animal contaminados. Ela também se mostra moderadamente resistente ao calor, à dessecação, a vários agentes químicos e a uma das mais importantes drogas antituberculosas, a pirazinamida (ABRAHÃO, 1999).

Por outro lado, mostra-se sensível aos desinfetantes à base de formol, fenol, etanol e ao hipoclorito de sódio e cálcio a 5%, devendo-se levar em consideração que a ação destes agentes pode ser afetada pela concentração do produto, tempo de exposição e a presença de matéria orgânica. O bacilo também é destruído rapidamente pela luz solar direta em ambiente seco, assim como pelo calor úmido a 60°C (ROXO, 1996; ABRAHÃO, 1999).

2.2.2. Aspectos da patogênese e Transmissão

A tuberculose nos caprinos ocorre de forma semelhante à observada nos bovinos em todos os aspectos da doença. Trata-se de uma enfermidade infecto-contagiosa crônica e debilitante que pode assumir, em alguns casos, caráter agudo e progressivo. É caracterizada pela formação de lesão granulomatosa nodular, denominada tubérculo, que pode se apresentar de variados tamanhos (BERNABÉ *et al.*, 1991a).

Estas lesões granulomatosas ocorrem mais frequentemente nos pulmões (figura 8) e nos linfonodos broncomediastínicos, submandibulares (figura 9) e retrofaríngeos, porém qualquer órgão ou tecido pode ser acometido (BERNABÉ *et al.*, 1991b; WHIPPLE, BOLIN e MILLER, 1996; NEILL, BRYSON e POLLOCK, 2001; WEDLOCK *et al.*, 2002; AYELE *et al.*, 2004; AMANFU, 2006).



Figura 8. Lesões pulmonares em caprino com tuberculose (Fonte: BENESI *et al.*, 2008).



Figura 9. Hipertrofia no linfonodo submandibular de caprino com tuberculose (Fonte: BENESI *et al.*, 2008).

O granuloma tuberculoso é uma estrutura complexa e de composição principalmente celular, consistindo geralmente de um centro necrótico, circundado por densas camadas de células, como os linfócitos (T e B), neutrófilos e fagócitos mononucleares em diversos estágios de desenvolvimento, sendo, por último, circundado por uma firme cápsula de tecido fibroso. Este centro necrótico contém material purulento de aspecto caseoso e coloração branca ou branco-amarelada que, em estágios mais avançados, pode apresentar calcificação e, algumas vezes, mineralização (COSMA, SHERMAN e RAMAKRISHNAN, 2003; AYELE *et al.*, 2004; HOPE, 2008).

A formação das lesões calcificadas, no local de entrada e nos linfonodos regionais, constituem o complexo primário que pode, por sua vez, regredir, permanecer estabilizado por vários anos (latência) ou progredir para a doença. Se ocorrer a generalização da infecção, através da disseminação do bacilo pela via linfática ou hematogênica, as lesões podem se desenvolver em qualquer órgão (figura 10), como já mencionado anteriormente, inclusive no coração. Este processo pode ocorrer na fase inicial da doença ou numa fase mais tardia, provavelmente como conseqüência de uma queda na imunidade do animal (BERNABÉ *et al.*, 1991b; AYELE *et al.*, 2004).



Figura 10. Tubérculos no baço caprino após generalização da infecção (Fonte: BERNABÉ *et al.*, 1991b).

Por ser de evolução lenta, os sinais clínicos da tuberculose são pouco freqüentes e inespecíficos, contudo, os animais podem apresentar, em estágios avançados e a depender da localização das lesões, perda de peso crônica e progressiva, hiperplasia de linfonodos superficiais e/ou profundos, dispnéia, tosse, mastite, infertilidade, entre outros sintomas (BERNABÉ *et al.* 1991b; ROXO, 1996).

Como os animais infectados podem eliminar o bacilo nos mais variados fluidos corpóreos, antes mesmo das manifestações clínicas, eles representam uma importante fonte de contaminação para o ambiente e para os demais animais do rebanho. Assim, a transmissão pode ocorrer diretamente, pelo contato de animais sadios com os animais doentes, ou indiretamente, via água ou fômites contaminados. Esta via indireta de transmissão é menos comum, podendo ocorrer principalmente nos países em desenvolvimento, onde os programas de controle e erradicação da doença não são eficazes (NEILL, BRYSON e POLLOCK, 2001; WEDLOCK *et al.*, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2003).

Alguns fatores, como o confinamento e o aglomeramento dos animais em estábulos, facilitam a transmissão e a disseminação da doença, tornando-a mais freqüente em rebanhos leiteiros do que em rebanhos de corte. Porém, todos os animais, independente do tipo de exploração, raça, sexo e idade, quando submetido às condições aglomerantes, sejam elas naturais ou não, ficam expostos aos mesmos fatores de risco (ABRAHÃO, 1999; BRASIL, 2006).

Quanto à porta de entrada do bacilo, a rota aerógena é a via mais comum nos caprinos infectados naturalmente, ocorrendo através da inalação de aerossóis contaminados ao pastarem juntos com bovinos ou outros animais doentes (BERNABÉ *et al.*, 1991a; BIET *et al.*, 2005; POLLOCK *et al.*, 2006). Como a prática de compartilhamento de pasto é comum em nosso estado, principalmente nas pequenas criações, se a fazenda apresentar casos de tuberculose bovina, os caprinos também desenvolverão a doença.

A via pelo trato alimentar é outra porta de entrada do bacilo, ocorrendo através da ingestão de qualquer alimento contaminado. É mais comum, no entanto, em animais jovens quando, na fazenda, o leite de vaca é dado para cabritos rejeitados ou como forma de prevenção da CAE (Artrite Encefalite Caprina) (NEILL, BRYSON e POLLOCK, 2001; MELLO *et al.*, 2005).

A infecção congênita e a transmissão vertical raramente ocorrem onde atuam os intensivos programas de controle e erradicação da tuberculose (AYELE *et al.*, 2004).

2.2.3. Epidemiologia

A tuberculose tem sido considerada uma doença rara nos caprinos, o que levou ao errôneo conceito de que esta espécie fosse naturalmente resistente à infecção por *M. bovis*. Pesquisas revelam que, além dos caprinos serem suscetíveis à tuberculose, já existem relatos da ocorrência desta doença em vários países, a exemplo da Austrália, Alemanha, Argentina, Índia, Espanha, França, Itália, Estados Unidos, entre outros (BERNABÉ *et al.*, 1991a; GARCÍA-MARÍN, PALAU e BADIOLA, 1992; ANDERSON & KING, 1993; COUSINS,

CASEY e MAYBERRY, 1993; GUTIÉRREZ, 1995; HADDAD *et al.*, 2001; SEVA *et al.*, 2002; TRIBULO *et al.*, 2002; BIET *et al.*, 2005; PRODINGER *et al.*, 2005).

O Brasil não tem dados oficiais sobre a prevalência da tuberculose caprina devido à escassez de trabalhos realizados, mas os poucos dados obtidos relatam sua ocorrência em nosso país (MELO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2007; BENESI *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2008; BENESI *et al.*, 2009; PIGNATA *et al.*, 2009).

O estudo de Melo e colaboradores (2005) relata a ocorrência da doença no estado pernambucano com uma positividade de 16,2% (11/68) utilizando o Teste Cervical Comparativo (TCC). Este mesmo grupo, em outro estudo, relata também a intercorrência da tuberculose bovina e caprina em rebanhos leiteiros do estado, com positividade de 13,6% e 12,2% respectivamente.

Pinheiro e colaboradores (2007) relatam um surto de tuberculose caprina em rebanhos leiteiros no estado de Minas Gerais com uma frequência de 17,7% (89/500) de animais positivos ao teste tuberculínico.

No semi-árido paraibano foi encontrada uma prevalência de tuberculose caprina de 0,47% (9/1866), com 10,71% das fazendas positivas para a doença utilizando o TCC (PIGNATA *et al.*, 2009).

Benesi e colaboradores (2008) relatam um caso de tuberculose em uma cabra atendida no hospital veterinário da Universidade de São Paulo (USP), sendo isolado *M. bovis* das lesões sugestivas de tuberculose presentes no animal. Em 2009, este mesmo grupo relata uma infecção mista por *Corynebacterium spp* e *Mycobacterium spp*. em outro caprino atendido no mesmo hospital, mostrando que as duas infecções podem ocorrer em um mesmo animal e alertando sobre a necessidade de se realizar diagnóstico diferencial de tuberculose em rebanhos que apresentam linfadenite.

Ainda na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, França e colaboradores (2008) relataram a ocorrência de caprinos com tuberculose apresentando as lesões na glândula mamária, sendo esta localização de baixa frequência.

A falta de mais relatos sobre a tuberculose caprina no Brasil pode estar ocorrendo devido às falhas de diagnóstico, pois a linfadenite caseosa apresenta lesões macroscópicas semelhantes às da tuberculose e tem ampla distribuição nas criações brasileiras, contexto este que coloca estas duas doenças no mesmo plano de investigação clínico-epidemiológica (PINHEIRO, 2010).

2.2.4. Diagnóstico

Para diagnosticar a tuberculose podem ser utilizados tanto métodos diretos quanto indiretos. Os primeiros detectam a presença do agente etiológico direto no material biológico, sendo a bacteriologia e os ensaios moleculares exemplos deste tipo. Os métodos indiretos pesquisam uma resposta imunológica humoral ou celular do hospedeiro ao agente infeccioso, sendo representado, por exemplo, pelos testes imunoenzimáticos e pela tuberculinização, respectivamente.

O diagnóstico clínico pode ser utilizado, mas possui valor relativo, uma vez que na fase inicial da doença os animais aparentam estar sadios, podendo apresentar somente lesões localizadas (subclínicas). O exame clínico detalhado é de grande valor nos animais em estágios avançados da doença, onde a sintomatologia é alarmante e/ou em rebanhos que se localizam em áreas que apresentem casos de tuberculose bovina comprovada (ROXO, 1997; AYELE *et al.*, 2004).

Um diagnóstico preliminar da infecção pode ser realizado com a utilização do exame microscópico direto do esfregaço de amostras frescas suspeitas após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen. Este método é um dos mais utilizados para este propósito e tem a finalidade de pesquisar a presença de bacilos álcool-ácidos resistentes no material biológico. É considerada uma técnica barata, prática, rápida e útil, mas que se apresenta inespecífica e pouco sensível (20-70%), uma vez que é necessário um grande número de organismos na amostra para a positividade do esfregaço (EISENSTADT & HALL, 1995; LISLE *et al.*, 2002; AYELE *et al.*, 2004).

A cultura, para o isolamento do agente em amostras clínicas, ainda é o principal método para o diagnóstico definitivo da infecção. A completa identificação da micobactéria é realizada por testes bioquímicos, os quais requerem um tempo adicional para sua total realização, em paralelo com diversos procedimentos de análises das colônias (COLLINS *et al.*, 1994; LISLE *et al.*, 2002).

Assim, embora seja o padrão-ouro de diagnóstico da tuberculose, a cultura tem a desvantagem de ser muito demorada, em decorrência do longo período de incubação do *M. bovis*, e também muito laboriosa, inviabilizando seu uso em programas de controle da doença. Além disso, as técnicas de descontaminação das amostras antes dos cultivos se mostram muito agressivas, resultando na morte de muitos bacilos, podendo gerar resultados falso-negativos (LÉVY-FRÉBAUL & PORTAELS, 1992; EISENSTADT & HALL, 1995; COUSINS & FLORISSON, 2005).

Outros testes *ante-mortem* podem ser realizados para o diagnóstico da tuberculose e embora a grande maioria deles, nas mais diversas doenças infecciosas de animais, sejam baseados na detecção da resposta humoral, na infecção micobacteriana, a resposta imunológica predominante é a celular, baseada na resposta de células T (mediada por células). Somente nos estágios mais avançados da doença é que a resposta humoral desempenhará papel importante em testes diagnósticos, em decorrência dos altos níveis de produção de anticorpos específicos contra o agente, pelos animais acometidos (LISLE *et al.*, 2002; PALMER & WATERS, 2006; POLLOCK *et al.*, 2006; MARASSI *et al.*, 2009).

Os dois principais testes que acessam a resposta celular do animal contra o bacilo da tuberculose são os testes tuberculínicos e os ensaios de Interferon-gama (IFN- γ) em sangue total (RUA-DOMENECH *et al.*, 2006).

O teste tuberculínico é baseado na detecção de uma reação de hipersensibilidade tardia, mediada por linfócitos T sensibilizados do animal aos antígenos tuberculínicos (PPD) injetados intradermicamente, sendo esta reação caracterizada por uma resposta inflamatória no local da aplicação (RUA-DOMENECH *et al.*, 2006). O teste pode ser de dois tipos: teste simples caudal, com apenas uma aplicação de tuberculina bovina, e Teste Cervical Comparativo (TCC), com aplicação de tuberculina bovina e aviária. O primeiro possui sensibilidade entre 32 e 99% e especificidade entre 75,5 e 99,9%, enquanto o segundo

apresenta uma especificidade semelhante ao do teste simples caudal, porém uma baixa sensibilidade (ROXO, 1996). Embora o teste tuberculínico seja padronizado e amplamente utilizado em bovinos, sua aplicação em caprinos experimentalmente sensibilizados já foi relatada (SILVA *et al.*, 2006). Neste estudo os autores estabelecem parâmetros de interpretação do teste nesta espécie animal, já que no Brasil não existem padrões estabelecidos para a interpretação do teste em caprinos. No entanto, a reatividade cruzada com antígenos similares em outras micobacterias e microrganismos dos gêneros *Nocardia* e *Corynebacterium* é um dos problemas enfrentados ao usar o teste tuberculínico (LILENBAUM, 2000).

Já o ensaio do Interferon gama (IFN- γ) detecta e quantifica a liberação desta citocina em culturas de sangue total estimuladas com antígenos do bacilo através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Trata-se de uma ferramenta robusta e sensível que pode detectar a infecção em várias espécies de animais e mais precocemente que os testes tuberculínicos, possuindo sensibilidade e especificidade de 85% e 93%, respectivamente (LIÉBANA *et al.*, 1998; WEDLOCK *et al.*, 2002; RUA-DOMENECH *et al.*, 2006). O teste para a detecção da infecção em bovinos já é disponível comercialmente com a denominação BOVIGAN, sendo em muitos países utilizado também para avaliação de caprinos, ovinos e búfalos. Ele utiliza como antígenos o PPD bovino e o aviário, embora outros antígenos, a exemplo da ESAT-6 e do CFP-10, já tenham sido usados resultando em aumento da especificidade sem comprometer muito a sensibilidade do ensaio (BUDDLE *et al.*, 2001; WOOD & JONES, 2001).

Com os avanços na tecnologia molecular, os diagnósticos baseados na amplificação de sequências alvos de DNAs, a exemplo da Reação em Cadeia da polimerase (PCR), oferecem vantagens em relação ao método convencional por serem mais rápidos e sensíveis. Protocolos para confirmação e diferenciação de espécies do complexo MTB a partir de cultivo de diversas amostras como leite, aspirados de linfonodos, tecidos frescos, fixados em formol ou embebidos com parafina já são bem descritos (MILLER *et al.*, 1997; LEITE *et al.*, 2003; BAKSHI *et al.*, 2005; WARREN *et al.*, 2006). Alguns destes testes, como o de Warren e colaboradores (2006) se tornam aceitáveis para serem usados em propostas de inspeção e laboratórios de rotina. A amplificação de DNA direto de material clínico também já foi descrita (ROMERO *et al.*, 1999; ZANINI, *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2007). No estudo de Taylor e colaboradores (2007), as sequências alvos foram o elemento de inserção multi-cópias

IS1081 e a Região de diferença 4 (RD4), em dois protocolos distintos. As sensibilidades finais dos ensaios foram de 91% e 59%, respectivamente. Zanine e colaboradores (2001) compararam os resultados do PCR direto de 54 amostras de linfonodos bovinos e o cultivo destas mesmas amostras para *M. bovis*. O PCR, que utilizava como gene alvo a sequência de inserção IS6110, apresentou positividade em 70,3% das amostras, enquanto o cultivo apresentou positividade de 42,6%, indicando a superioridade do PCR, neste estudo, em relação ao método convencional.

A detecção molecular direto de amostras clínicas apresenta como desvantagem a limitada recuperação de DNA micobacteriano dos homogeneizados teciduais, mas que pode ser melhorado com protocolos de extração que atuem, principalmente, nas paredes micobacterianas, aumentando a chance de recuperação deste ácido nucléico. Honoré-Bouakline e colaboradores (2003) trazem uma boa discussão sobre o impacto da preparação de amostras e da extração de DNA para realizar PCR direto de espécimes clínicos, incluindo material de abscessos.

2.3. IMUNOLOGIA DAS INFECÇÕES BACTERIANAS INTRACELULARES

Existe uma complexa interação parasito-hospedeiro nas infecções por bactérias intracelulares como *C. pseudotuberculosis* e *Mycobacterium spp.* e a resposta destas interações é que determinará se o resultado final será a imunidade ou a doença. Fatores como a virulência bacteriana, a carga infectante e a resistência do hospedeiro influenciam o resultado final desta interação (AYELE *et al.*, 2004).

No início do processo infeccioso predominam células fagocíticas, como os neutrófilos, que eliminam os primeiros organismos invasores, seguidos pelos macrófagos, recrutados na tentativa de conter o foco da infecção, ainda na fase inicial (PEPIN *et al.*, 1994). Estas células fagocíticas têm, como principal função, a eliminação dos microrganismos ingeridos por fagocitose, liberando moléculas microbicidas nos fagolisossomos, como as enzimas proteolíticas e os intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio. A resposta é acentuada pela ação da citocina IFN- γ que ativa os macrófagos, aumentando sua capacidade microbicida (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Neste contexto, as células Natural Killer (NK) e as $T\gamma\delta$ (que em ruminantes expressam o marcador de perfil infamatório WC1) desempenham um importante papel na resposta, fornecendo o IFN- γ inicial que promove o controle do crescimento bacteriano e a estimulação da resposta imune protetora (PEPIN *et al.*, 1994; CASSIDY *et al.*, 2001; MCNAIR, WELSH e POLLOCK, 2007; HOPE, 2008). As células NK, adicionalmente, contribuem destruindo as células infectadas, antes que a imunidade adquirida se desenvolva.

Embora a fagocitose seja o principal mecanismo efetor contra as bactérias intracelulares, tanto o bacilo da tuberculose quanto o da linfadenite caseosa conseguem, geralmente, escapar deste mecanismo e manter um nicho de sobrevivência dentro dos macrófagos. Na infecção micobacteriana, por exemplo, onde as pesquisas estão mais avançadas, estudos apontam que o uso de alguns receptores utilizados na fagocitose, como o CR3 (receptor do complemento 3) e o receptor de manose, podem ser uma rota de entrada segura para a micobactéria, facilitando sua sobrevivência intracelular (HOPE, 2008). No interior dos macrófagos, estes organismos podem viver de forma quiescente por longos períodos (latência) ou podem, ainda, ativá-los cronicamente, promovendo, assim, o desenvolvimento da lesão granulomatosa pelo hospedeiro, na tentativa de conter a disseminação da infecção, embora nem sempre consiga erradicá-la (VOLKMAN *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da resposta imune adquirida é essencial para o controle e/ou resolução da infecção causada por estes microrganismos. De particular importância é o desenvolvimento do perfil Th1 produtor de IFN- γ estimulado pela apresentação de antígenos bacterianos às células T $CD4^+$ e $CD8^+$ no contexto de moléculas MHC II e I, respectivamente. A presença das células $CD4^+$ no granuloma se faz requerida para regular sua formação e sua função protetora que é restringir a disseminação do patógeno do sítio inflamatório e proteger o tecido vizinho saudável da imunopatologia associada com a ativação crônica dos macrófagos (HOGAN *et al.*, 2007). Estas células são a população produtora de IFN- γ predominante no granuloma, agindo no controle do crescimento bacteriano intracelular, enquanto os linfócitos T $CD8^+$ agem, principalmente, na lise dos macrófagos infectados (PEPIN *et al.*, 1994; POLLOCK & NEILL, 2002).

Além do IFN- γ , outras citocinas estão envolvidas na resposta imune a estas bactérias intracelulares. A interleucina 12 (IL-12), por exemplo, secretada por células dendríticas na interação com os linfócitos T, pode potencializar a produção de IFN- γ , tanto estimulando as

células NK, quanto induzindo a polarização Th1 que eleva a produção desta citocina. De suma importância também é a produção de outras citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (LAN *et al.*, 1998; HOPE *et al.*, 2008).

Na regulação do processo infeccioso, a IL-10 aparece como importante componente, capaz de inibir a resposta celular através da subregulação da produção de IL-12. Ela pode limitar a excessiva ativação de macrófagos e células dendríticas e, assim, regular a danosa resposta imune que ocorre nos tecidos durante as infecções, tanto por *C. pseudotuberculosis* quanto por *Mycobacterium spp.* (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; HOPE *et al.*, 2008).

Em decorrência da natureza intracelular destes organismos, a resposta de células B não está relacionada com a imunidade protetora, sendo, na tuberculose bovina, por exemplo, um indicador da severidade e progressão da doença (POLLOCK & NEILL, 2002; WELSH *et al.*, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e/ou *Mycobacterium spp.* em caprinos de cinco municípios do semi-árido baiano, com suspeita clínica de linfadenite caseosa.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ocorrência de *Mycobacterium spp.* em material coletado de linfonodos superficiais hipertrofiados, associada ou não à presença de *C. pseudotuberculosis*.
- Avaliar a resposta humoral anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* nos caprinos pelo teste ELISA indireto.
- Isolar *Corynebacterium pseudotuberculosis* por cultura, a partir de material de abscessos superficiais em caprinos.
- Identificar os dois patógenos a partir de materiais dos abscessos superficiais caprinos, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase multiplex (mPCR).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Entre janeiro e novembro de 2010 um total de 1639 caprinos mestiços, de ambos os sexos e com idades entre 5 meses e 8 anos foram examinados clinicamente quanto a presença de abscessos nos linfonodos superficiais suspeitos de linfadenite caseosa. Os animais avaliados pertenciam a 13 propriedades localizadas nos municípios de Capim Grosso (1), Queimadas (1), SantaLuz (1), Campo Formoso (6) e Andorinha (4) – Bahia, Brasil e eram mantidos nas condições típicas de criação extensiva, juntamente com criações de bovinos. Os caprinos que apresentavam os abscessos foram selecionados para fazerem parte do estudo.

Foi aplicado um inquérito epidemiológico aos donos das propriedades para obtenção de informações relevantes ao estudo (APÊNDICE A). Foi também assinado por eles, após as explicações acerca dos procedimentos, um termo de consentimento livre e esclarecido para a coleta dos materiais biológicos dos animais (APÊNDICE B).

4.2 ESPÉCIMES CLÍNICOS

Foram coletadas, assepticamente, amostras de sangue total (utilizando o sistema convencional de seringa) e do conteúdo dos abscessos dos caprinos selecionados para o estudo. Para a coleta deste último, como ilustrado na figura 11, inicialmente fez-se a tricotomia do caroço e, a seguir, a desinfecção do mesmo com álcool iodado. Com um bisturi, foi feita uma incisão para a retirada do pus que foi aparado em um coletor estéril. Pressionou-se cuidadosamente o caroço para a completa retirada do material caseoso, e, logo após, foi realizado o tratamento interno do mesmo com solução de iodo 10%. Todo material utilizado como luvas, gazes e papel toalha foram queimados e os instrumentos cirúrgicos devidamente esterilizados, além da autoclavação dos perfuro-cortantes. Os veterinários utilizaram equipamento de proteção individual (jaleco, luvas, óculos de proteção e máscara) em todas as coletas realizadas.

Após a coleta, os materiais foram apropriadamente armazenados até a chegada ao laboratório, onde foram processados para a realização dos testes diagnósticos a seguir: cultura de *Corynebacterium*, ELISA para *Corynebacterium pseudotuberculosis* e mPCR direto dos abscessos para identificação de *C. pseudotuberculosis* e *Mycobacterium spp.*

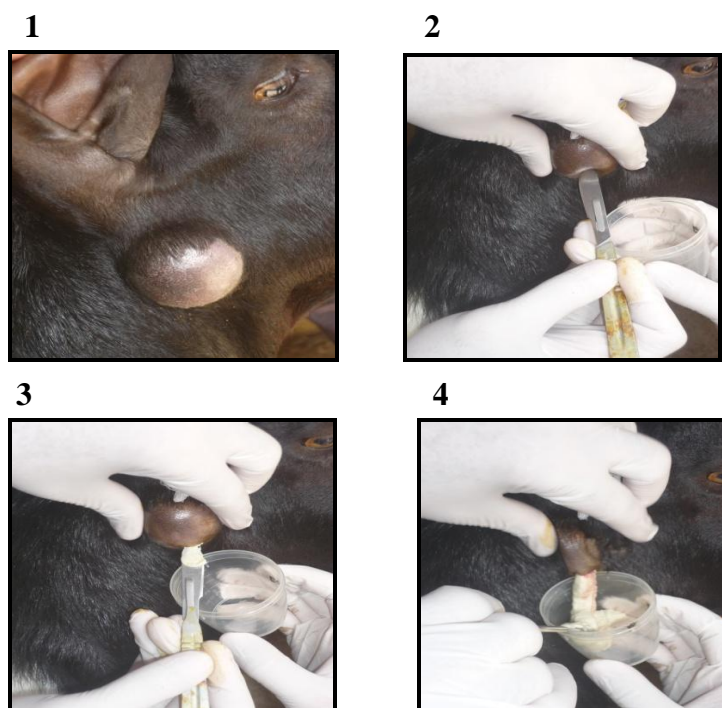


Figura 11. Etapas do procedimento da coleta de material de abscessos em caprinos. 1. Tricotomia e higienização do abscesso. 2. Incisão do abscesso. 3 e 4. Retirada do material (Fonte: Arquivo pessoal).

4.3 CULTURA E IDENTIFICAÇÃO DE *C. pseudotuberculosis*

Os materiais dos abscessos foram semeados em ágar base, suplementado com 10% de sangue de carneiro, e incubados, em aerobiose, a 37 °C por 48 horas. Após este período, colônias pequenas, brancas e secas foram pesquisadas pela coloração de Gram. Culturas puras foram preparadas das colônias que foram Gram-positivas e que apresentavam morfologia de cocos ou bacilos ao exame microscópico. Estas colônias foram também repicadas em caldo BHI e igualmente incubadas pelo mesmo período e condições. Testes bioquímicos, tais como, atividade enzimática (catalase e urease), metabolismo de açúcares (glicose, sacarose, maltose e lactose), hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* e antagonismo com *Staphylococcus aureus* foram realizados para identificar os isolados. Amostras em que os isolados foram catalase, urease e glicose positivas, aumentaram a hemólise com *R. equi*, e inibiram a beta

hemolisina de *S. aureus* foram consideradas *C. pseudotuberculosis*. O crescimento característico desta bactéria em caldo BHI, formando uma película na superfície do meio sem turvá-lo e que, após agitação, precipita-se em flocos, reforçou a identificação dos isolados.

4.4 ELISA INDIRETO ANTI - *C. pseudotuberculosis*

Teste realizado segundo Carminati e colaboradores (2003) com sensibilidade e especificidade de 93,5% e 100%, respectivamente e que utilizou como antígeno o sobrenadante da cultura de 48h de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caldo BHI. Brevemente, placas de 96 poços (PerkinElmer, EUA) foram sensibilizadas com 100 µl/poço do sobrenadante da cultura diluído 1:100 em tampão carbonato bicarbonato 0,05M, (pH 9.6) overnight a 4°C. As placas foram bloqueadas por duas horas à temperatura ambiente com 200 µl/poço de salina tamponada com fosfato Tween-20 (PBS-T20) contendo 5% de leite desnatado. A seguir, 100 µl/poço dos soros testes diluídos 1:100 em PBS-T20 contendo 1% de leite desnatado foram adicionados e incubados por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se às placas 100 µl/poço de Imunoglobulina G (IgG) anti-cabra conjugada à peroxidase (Rheabiotech- Brasil) diluída 1:4000 seguida por uma incubação de uma hora à temperatura ambiente. Foram adicionados 100 µl/poço da solução reveladora contendo 0,4mg/mL de OPD (Sigma-Aldrich-Alemanha), como cromógeno, e 0,03% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), como substrato. As placas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e a reação foi interrompida com 25 µl/poço de uma solução 4N de ácido sulfúrico. Cada etapa foi precedida por 5 lavagens com PBS-T20. As leituras de densidade ótica (DO) foram realizadas em Leitor automático de ELISA (Modelo 550 BIO-RAD) a 490 nm. Foram considerados reativos soros com resultados de DO maior que 0.212 (ponto de corte), como definido pela curva ROC.

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE MULTIPLEX

4.5.1 Extração de DNA dos conteúdos dos abscessos

Foi utilizado o protocolo de extração de DNA para bactérias gram-positivas (QIAGEN, Alemanha) com modificações no tempo de ação da lisozima e da proteinase K. De forma breve, 25mg dos conteúdos dos abscessos, ou o precipitado de 1,5mL da amostra líquida, foram ressuspensos em 180 µl de solução de lisozima (20 mg/mL de lisozima; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1.2% triton X-100) e incubadas por 2h a 37 °C; posteriormente, 20 µl de proteinase K (QIAGEN, Alemanha) e 200 µl de tampão de lise AL (QIAGEN, Alemanha) foram adicionados, seguidos por uma incubação de 1h a 56 °C e, logo após, 15 minutos a 95 °C para inativação da proteinase K.

Os DNAs foram purificados utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha) conforme instruções do fabricante e eluídos em 100 µl de tampão AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0). As concentrações e o grau de pureza dos DNAs foram determinados por espectrofotometria (mensuração a 260 e 280 nm) e, logo após, foram armazenados a -20 °C até a realização dos mPCRs.

4.5.2 Primers

Os primers utilizados neste estudo foram obtidos de trabalhos publicados anteriormente por Pacheco e colaboradores (2007) para *C. pseudotuberculosis* e Warren e colaboradores (2006) para *Mycobacterium spp.*, e estão listados nos quadros 1 e 2, respectivamente.

Gene alvo	“Primers”	Seqüência (5’- 3’)	Comprimento dos produtos (pb)
16S rRNA	16S-F 16S-R	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG TCTCTACGCCGATCTTGTAT	816
<i>rpoB</i>	C2700F C3130R	CGTATGAACATCGGCCAGGT TCCATTTCCGCCGAAGCGCTG	446
<i>pld</i>	PLD-F PLD-R2	ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG	203
12S rRNA*	12S-F 12S-R	CCAGCCACCGCGGTCATACG TGAGTTTCGGGCTGTTGCCG	274

Quadro 1 - Lista de primers com os respectivos comprimentos dos produtos de amplificação para *C. pseudotuberculosis*

*RNA ribossômico mitocondrial de *Capra hircus* e *Ovis aries*, controle interno de amplificação da reação.

Sequência primer	RD	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis BCG</i>	<i>M. canetti</i>
AAGCGTTGCCCGCCGACCGACC CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG GAGCGATCTGGCGGTTTGGGG	1	RD1 presente (146 pb)	RD1 presente (146 pb)	RD1 presente (146 pb)	RD1 ausente (196 pb)	RD1 presente (146 pb)
ATGTGCGAGCTGAGCGATG TGTAATACTGCTGACCCCATGCG AAAGGAGCACCAATCGTCCAC	4	RD4 presente (172 pb)	RD4 presente (172 pb)	RD4 ausente (268 pb)	RD4 ausente (268 pb)	RD4 presente (172 pb)
CAAGTTGCCCGTTTCGAGCC CAATGTTTGTGGCTGC GCTACCCCTCGACCAAGTGTT	9	RD9 presente (235 pb)	RD9 ausente (108 pb)	RD9 ausente (108 pb)	RD9 ausente (108 pb)	RD9 presente (235 pb)
GGGAGCCCCAGCAATTTACCTC GTGTTCGGGAATTACTCGG AGCAGGAGCCGTTGATATTC	12	RD12 presente (369 pb)	RD12 ausente (306 pb)	RD12 ausente (306 pb)	RD12 ausente (306 pb)	RD12 ausente

Quadro 2 - Lista de primers com o tamanho dos produtos de amplificação correspondentes indicando a presença ou ausência da região de diferença (RD) em 5 diferentes membros do complexo *Mycobacterium*.

4.5.3 Condições do mPCR de *C. pseudotuberculosis*

As reações foram realizadas em um volume final de 10 µl e continham 1,5 Unidades da enzima Accuprime Taq DNA Polymerase System (Invitrogen, USA), PCR tampão II 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, “Thermostable AccuPrime protein”, 1% glicerol], 2 µM de cada um dos primers 16S-F/16S-R, C2700-F/C3130-R e PLD-F/PLD-R₂ e 0,2 µM de cada primer 12S-F/12S-R. A concentração de DNA utilizada para o controle positivo (cepa de *C. pseudotuberculosis* obtida do laboratório de Microbiologia da UFBA) foi de 10ng e das amostras dos abscessos de 50 ng. As reações foram realizadas no termociclador (Bio-Rad iCycler iQ5) sob as seguintes condições: incubação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 58 °C por 40 segundos e 68 °C por 1 minuto e 30 segundos e, por último, uma extensão final a 68 °C por 7 minutos.

Pré-PCR, PCR e Pós-PCR foram realizados em áreas fisicamente separadas para minimizar o risco de contaminação cruzada e um controle negativo contendo água foi incluído em todas as reações para avaliar possíveis surgimentos de contaminação nos reagentes.

4.5.4 Condições do mPCR de *Mycobacterium spp.*

Cada reação continha, em um volume final de 25 µl, 0,625 Unidades da enzima HotStarTaq plus DNA polymerase (QIAGEN), tampão de PCR 1X, tampão Q 1X, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 1 µM de cada primer e 100 ng de DNA, tanto dos controles positivos e negativos quanto das amostras dos abscessos. As reações foram realizadas no termociclador (Bio-Rad iCycler iQ5) sob as seguintes condições: incubação inicial a 95 °C por 5 minutos (para ativação da enzima); seguidos por 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Pré-PCR, PCR e Pós-PCR foram realizados em áreas fisicamente separadas para minimizar o risco de contaminação cruzada e um controle negativo contendo água foi incluído em todas as reações para avaliar o surgimento de contaminação nos reagentes. DNA de *M. avium* e *M. kansasii* (Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Embrapa, Mato Grosso

do Sul, Brasil) foram usados como adicionais controles negativos e DNA de *M. tuberculosis* (H37Rv) e *M. bovis* (Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação (LIMI), CPqGM, Bahia, Brasil) foram usados como controles positivos.

4.6 ELETROFORESE

Os produtos amplificados pelo mPCR de *C. pseudotuberculosis* foram separados por eletroforese (6 V/cm) em gel de agarose 1,5% (w/v) em tampão TBE 1X e visualizados por coloração com SYBR Safe 10.000 vezes diluído. Produtos de PCR com peso molecular de 815, 446 e 203 pb são característicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Produto com peso molecular de 274 pb corresponde ao controle interno de amplificação da reação e, quando não amplificado, indica presença de componentes inibitórios na amostra.

Os produtos amplificados pelo mPCR de *Mycobacterium spp.* foram fracionados por eletroforese (6 V/cm) em gel de agarose 3% (w/v) em tampão TBE 1X e visualizados por coloração com SYBR Safe 10.000 vezes diluído. A tabela 2 contém o tamanho dos produtos de PCR (em pb) esperados para 5 diferentes membros do complexo MTB, incluindo *M. bovis*.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O índice Kappa e o Qui-quadrado (χ^2) foram utilizados para avaliar os resultados dos diferentes testes aplicados para a detecção de *C. pseudotuberculosis*. O programa estatístico SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”) versão 17, foi utilizado para a realização dos cálculos, com valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

4.8 COMITÊ DE ÉTICA

Estudo realizado com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia sob protocolo n° 005/2010 (ANEXO A).

5. RESULTADOS

Dos 1639 caprinos examinados clinicamente, 59 (3,6%) apresentaram hipertrofia de linfonodos superficiais que foram suspeitas de linfadenite caseosa. Deste total, 34 (57,6%) pertenciam ao município de Capim Grosso, 19 (32,2%) ao município de Campo Formoso, 3 (5,1%) ao município de Queimadas, 2 (3,4%) ao município de SantaLuz e 1 (1,7%) ao município de Andorinha. As lesões foram localizadas em diferentes linfonodos e os mais afetados foram os pré-escapulares (47,4%), os parotídeos (16,9%) e os pré-curais (11,9%), seguidos pelos submandibulares (6,8%) e poplíteos (6,8%), retrofaríngeos (5,1%) e retromamários (3,4%). Em 1 dos caprinos (1,7%), a lesão foi observada na orelha, local incomum para seu desenvolvimento. Deste total de linfonodos hipertrofiados, três (2 de Capim Grosso e 1 de Santa Luz) foram excluídos porque os coletores contendo os conteúdos dos abscessos foram danificados no armazenamento. Assim, os cálculos estatísticos foram realizados com um total de 56 caprinos que foram avaliados pelas três técnicas diagnósticas.

A coleta dos abscessos evidenciou conteúdo de coloração branco-amarelada, de aspecto purulento e consistência pastosa à caseosa na maioria dos caprinos (43). Um abscesso evidenciou um conteúdo completamente líquido, de coloração esbranquiçada e aspecto semi-turvo, enquanto em outro, o material era escasso de coloração branco-amarelada e aspecto endurecido. Nos demais caprinos, os abscessos continham material translúcido e de consistência elástica.

Pelo cultivo, *C. pseudotuberculosis* foi identificada em 40 (71,4%) das 56 amostras de abscessos avaliadas. Das 16 amostras restantes (28,6%), duas apresentaram crescimento, porém as colônias, de aspecto transparente e puntiforme, foram catalase e urease negativas. As colônias foram suspeitas de *Arcanobacterium pyogenis*, mas as provas bioquímicas disponíveis não permitiram a caracterização conclusiva dos isolados. Catorze amostras não apresentaram crescimento no cultivo.

Nas leituras espectrofotométricas, as concentrações dos DNAs extraídos diretamente dos materiais dos abscessos variaram entre 216 ng/μL e 2.284 ng/μL, excetuando-se uma amostra que apresentou concentração de 15 ng/μL. O grau de pureza dos DNAs variou entre 1,7 e 2,0. Não foi verificada presença de fatores inibitórios para o ensaio molecular de *C.*

pseudotuberculosis em nenhuma das amostras avaliadas, uma vez que todas amplificaram o gene do controle interno da reação (figura 12). Pela mPCR, *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi identificada em 41(73,2%) dos 56 abscessos avaliados, os quais apresentaram amplificação dos três genes que caracterizam esta espécie, 16S, *rpoB* e *pld* (figura 12). Quinze abscessos (26,8%) foram negativos e destes, 13 amplificaram somente os genes do controle interno e da *rpoB*, enquanto os outros 2 somente amplificaram o gene 12S mitocondrial do animal. Este ensaio identificou a bactéria em uma das amostras que não apresentou crescimento no cultivo. A tabela 1 sumariza o diagnóstico positivo de LC por tecido e linfonodos afetados pelos abscessos.

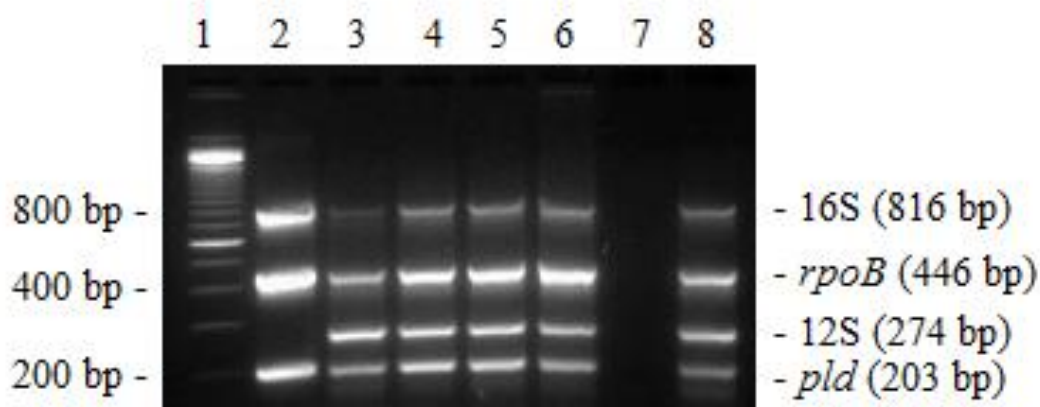


Figura 12. Perfil de amplificação de *C. pseudotuberculosis* por mPCR direto de material de abscessos. Linha 1, marcador de peso molecular 100bp; linha 2, controle positivo; linhas 3-6 e 8, caprinos positivos; linha 7, controle negativo (água).

O mPCR para *Mycobacterium* spp. não detectou nenhuma das 5 diferentes espécies micobacterianas pesquisadas nas amostras de abscessos externos avaliadas, uma vez que não foi evidenciado perfil de amplificação característico destas espécies após eletroforese das amostras.

No ELISA anti - *C. pseudotuberculosis* 41 caprinos (73,2%) apresentaram leituras de DO maior que 0,212 sendo considerados positivos e 15 (26,8%) apresentaram valores menores e foram considerados negativos. Este ELISA diagnosticou a LC em 35 caprinos também positivos pelo mPCR, porém não detectou em 6 que foram positivos pela técnica molecular. Por outro lado, seis caprinos, sem detecção na mPCR, reagiram positivamente neste ELISA.

Tabela 1- Diagnóstico positivo, pela mPCR, de *C. pseudotuberculosis* em diferentes linfonodos hipertrofiados de caprinos suspeitos de LC do semi-árido da Bahia, Brasil

TIPOS DE LINFONODOS COM ABSCESSOS	TOTAL n (%)	POSITIVO PARA <i>C. pseudotuberculosis</i> n (%)	LC POR LINFONODO n (%)
Pré-escapular	26 (46,4 %)	16 (39 %)	16/26 (57,1 %)
Parotídeo	10 (17,8 %)	9 (21,9 %)	9/10 (90 %)
Pré-cural	7 (12,5 %)	7 (17,1 %)	7/7 (100 %)
Submandibular	3 (5,4 %)	3 (7,3 %)	3/3 (100 %)
Poplíteo	^a 4 (7,1 %)	2 (4,9 %)	2/4 (50 %)
Retrofaríngeo	3 (5,4 %)	1 (2,4 %)	1/3 (33,3 %)
Retromamário	2 (3,6 %)	2 (4,9 %)	2/2 (100 %)
^b Orelha	1 (1,8 %)	1 (2,4 %)	1/1 (100 %)
Total	56 (100 %)	41 (73,2 %)	---

^aDois suspeitos de *Arcanobacterium pyogenis*. ^bAbscesso em tecido subcutâneo não associado com linfonodos.

Os resultados do cultivo (padrão-ouro) foram comparados com os resultados da mPCR e do ELISA para *C. pseudotuberculosis* (tabela 2 e 3, respectivamente). O índice Kappa de 0,955 indicou uma excelente concordância entre os resultados do cultivo e da mPCR. Houve diferença, portanto, entre os resultados do cultivo e do ELISA, sendo esta diferença estatisticamente significativa com $p=0,005$.

Tabela 2 - Resultados do cultivo e mPCR para detecção de *C. pseudotuberculosis* em amostras clínicas coletadas de caprinos em 5 diferentes municípios da Bahia

LOCALIDADE	cultivo + mPCR+	cultivo + mPCR -	cultivo – mPCR+	cultivo – mPCR –	TOTAL ANIMAIS
Capim Grosso	21	-	1	10	32
Campo Formoso	14	-	-	5	19
Queimadas	3	-	-	-	3
SantaLuz	1	-	-	-	1
Andorinha	1	-	-	-	1
Total	40	-	1	15	56

Tabela 3 - Resultados do cultivo e ELISA para *C. pseudotuberculosis* de amostras clínicas coletadas de caprinos em 5 diferentes municípios da Bahia

LOCALIDADE	Cultivo+ ELISA +	Cultivo + ELISA –	Cultivo– ELISA+	Cultivo – ELISA –	TOTAL ANIMAIS
Capim Grosso	17	4	7	4	32
Campo Formoso	12	2	-	5	19
Queimadas	3	-	-	-	3
SantaLuz	1	-	-	-	1
Andorinha	1	-	-	-	1
Total	34	6	7	9	56

Os resultados do mPCR e ELISA destes mesmos animais foram também comparados (tabela 4), havendo diferença estatisticamente significante entre eles, com valor de qui-quadrado de 9.328 (Yates corrigido) e $p=0,002$.

Tabela 4 - Resultados do mPCR e ELISA para *C. pseudotuberculosis* de amostras clínicas coletadas de caprinos em 5 diferentes municípios da Bahia

LOCALIDADE	mPCR+ ELISA +	mPCR + ELISA -	mPCR- ELISA+	mPCR - ELISA -	TOTAL ANIMAIS
Capim Grosso	18	4	6	4	32
Campo Formoso	12	2	-	5	19
Queimadas	3	-	-	-	3
SantaLuz	1	-	-	-	1
Andorinha	1	-	-	-	1
Total	35	6	6	9	56

6. DISCUSSÃO

A linfadenite caseosa em populações de caprinos continua sendo um problema que acomete a região nordeste do Brasil. A alta prevalência desta doença, principalmente na Bahia (MEYER, 2003), acarreta muitos prejuízos, principalmente para os pequenos criadores que exploram os animais para subsistência familiar. No presente estudo, ela foi responsável pela maioria das hipertrofias dos linfonodos superficiais nos caprinos avaliados em cinco municípios do Semi-árido baiano, acometendo, principalmente, os linfonodos pré-escapulares, parotídeos, pré-curais e submandibulares. Este achado está de acordo com a literatura que aponta estes linfonodos como os mais afetados pela LC em caprinos (WILLIAMSON, 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007). Um aspecto interessante foi a constatação da presença de *C. pseudotuberculosis* como causadora de hipertrofia na parte superior da orelha de um caprino, local incomum e não associado com linfonodos superficiais. Este caprino foi positivo para linfadenite caseosa no cultivo, mPCR e no ELISA e, provavelmente, a lesão neste local seja resultado de infecção em tecido subcutâneo, uma forma menos comum de infecção, mas que também pode ocorrer (RADOSTITS *et al.*, 2000).

Embora a LC tenha a cultura como método padrão-ouro de diagnóstico, sua realização nem sempre é possível para todas as amostras. Neste estudo, o cultivo e o mPCR direto do material do abscesso apresentaram alta correlação, mas o ensaio molecular conseguiu detectar a *C. pseudotuberculosis* em uma das amostras que não apresentou crescimento no cultivo. É possível isolar, geralmente, esta bactéria de lesões de todas as idades, no entanto, lesões crônicas ou que já romperam podem conter poucos organismos viáveis e, assim, estarem ocasionalmente estéreis (BAIRD & FONTAINE, 2007). Nestes casos, não há crescimento e o animal será considerado negativo (falso-negativo). Como a PCR não precisa do organismo viável para sua detecção, ele se torna uma técnica alternativa de diagnóstico superior ao cultivo.

O PCR direto do material do abscesso foi realizado com sucesso, como conseguido por Pacheco e colaboradores (2007). Entretanto, estes autores enfrentaram problemas com fatores inibitórios, necessitando de diluições seriadas do DNA (1:2, 1:4 e 1:8) para amplificação das amostras, o que não foi observado neste estudo, indicando a ausência de fatores inibitórios. Esta diferença pode estar relacionada com a metodologia utilizada por eles

para extração do DNA, onde a presença de alguns remanescentes de reagentes (fenol, clorofórmio, etc) podem ter inibido a PCR. As amostras extraídas aqui com o DNA Mini KIT (Qiagen) apresentaram ácidos nucleicos de alta qualidade e com ótima razão de pureza. O sucesso de detecção alcançado indica que este método de extração, seguido desta mPCR poderia substituir o cultivo na detecção de LC em caprinos com lesões aparentes e internas.

O teste sorológico é também de grande importância no diagnóstico desta doença e, aqui, a grande maioria dos caprinos identificados pelo cultivo (34) e pelo mPCR (35) apresentaram resposta de anticorpos contra a *C. pseudotuberculosis*. Aqueles animais sem detecção do patógeno, mas que reagiram positivamente na sorologia podem ser resultados de reação cruzada com organismos filogeneticamente relacionados – como outras espécies de *Corynebacterium* – em decorrência da alta similaridade antigênica entre elas, ou da memória a um encontro anterior com o patógeno. Animais positivos no cultivo e mPCR, mas sem resposta de anticorpos também foram encontrados. Esta discordância pode ter algumas justificativas como a ausência de soroconversão, estando os animais ainda na janela imunológica como relatado por Kuria e colaboradores (2001) que detectaram que caprinos infectados soroconvertem após 15 dias do desenvolvimento da lesão. Outra possibilidade é a persistência da irresponsividade humoral na infecção como relatado para o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva porcina (HORTER *et al.*, 2002; KLEIBOECKER *et al.*, 2002).

Infecções por *Mycobacterium spp.* não foram encontradas neste estudo como causadoras das hipertrofias superficiais nos caprinos avaliados. Um dos principais problemas da PCR para a detecção de bactérias deste gênero é conseguir a lise celular ótima para recuperação do DNA, em decorrência da espessa camada de ácidos micólicos que reveste a parede celular micobacteriana. No entanto, isto não foi um problema neste estudo porque o protocolo de extração aqui utilizado, com algumas modificações, já foi relatado com sucesso por Honoré-Bouakline (2003) que discute o impacto da preparação das amostras e extração de DNA no diagnóstico molecular da tuberculose. Fatores inibitórios nas amostras é outro problema que pode dificultar a amplificação. Porém, isto também não nos parece ter ocorrido porque, em primeiro lugar, o grau de pureza das amostras foi alto; segundo, houve amplificação de produtos no PCR, porém o padrão de bandas observado não correspondia ao padrão esperado para cinco diferentes espécies do complexo MTB pesquisadas; e, terceiro, todas as amostras foram testadas em diferentes diluições para diminuir estes fatores, caso eles estivessem presentes. Assim, a PCR foi bem realizada e a não detecção parece estar

relacionada com a ausência destas bactérias nas lesões analisadas e não com problemas na extração ou má qualidade das amostras.

Embora lesões externas sejam descritas na tuberculose caprina pelo *M. bovis* (CRAWSHAE *et al.*, 2008), a frequência maior destas lesões é nos pulmões e linfonodos torácicos (BERNABÉ *et al* 1991), ao contrário da LC que acomete, com mais frequência, os linfonodos superficiais. Em casos de infecção mista por *M. bovis* e *C. pseudotuberculosis* esta mesma distribuição pode ser encontrada, ou seja, *Corynebacterium*, causando lesões externas, e *M. bovis*, as internas, como observado no estudo de Sharpe e colaboradores (2010). Assim, embora as lesões externas dos caprinos aqui avaliados não tivessem espécies de *Mycobacterium* presentes, não podemos descartar a possibilidade dos animais estarem infectados e apresentarem ainda lesões internas, compondo, adicionalmente, um quadro de infecção mista.

7. CONCLUSÕES

- 7.1 A hipertrofia de linfonodos superficiais nos caprinos provenientes de municípios do semi-árido baiano teve uma ocorrência média de 3,6% com mais de 71% deste total ocasionada por infecções por *C. pseudotuberculosis*, confirmando, assim, o diagnóstico clínico de linfadenite caseosa nestes animais.
- 7.2 A mPCR para *C. pseudotuberculosis* realizada direto do material de abscessos de linfonodos superficiais foi bem sucedida, com alto índice de correlação com o cultivo, indicando que esta técnica diagnóstica pode substituir os métodos convencionais para confirmação da LC caprina.
- 7.3 O resultado molecular não detectou *Mycobacterium spp.* em nenhuma das 56 amostras de abscessos avaliadas, indicando ausência de infecções por este gênero como causa de formação de granulomas em linfonodos superficiais nestes caprinos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. L.; PILLAI, S. *Imunologia celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Archives of Veterinary Science**. v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999.

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

ACOSTA, B. R. F. *et al.* ELISA for anti- MPB70 : an option for the diagnosis of goat tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. **Australian Veterinary Journal**. v. 78, n. 63, p. 423-424, 2000.

ALVES, F. S. F. e OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Veterinária Notícia**. n. 75, p. 5-69, 1999.

AL-GAABARY, M. H., Osman, S. A., Oreiby, A. F. Caseous Lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventives studies. **Small Ruminant Research**. v. 87, p. 116-121, 2009.

AMANFU, W. The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. **Tuberculosis**. v. 86, p. 330-335, 2006.

ANDERSON, D. E.; RINGS, D. M.; PUGH, D. G. Enfermidades do Sistema Tegumentar. In: PUGH, D. G. Clínica de ovinos e caprinos. p. 232-233, 2005.

ANDERSON, W. & KING, J. M. *Mycobacterium avium* infection a pygmy goat. **The Veterinary Record**. v. 133, n. 20, p. 502, 1993.

ARANAZ, A. *et al.* Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 1785-1789, 2003.

ARANAZ, A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, p. 1263–1273, 1999.

AYELE, W. Y. *et al.* Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 8, n. 8, p. 924–937, 2004.

AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 171, n.12, p. 1251-1254, 1977.

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.

BAYAN, N. *et al.* Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. **Journal of Biotechnology**. v. 104, p. 55-67, 2003.

BELCHIOR, S. E.; GALLARDO, A.; ABALOS, A.; NADIA JODOR, N.; JENSEN, O. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Rev Vet Argent**. v. 23, p. 258-78, 2006.

BENESI, F. J. *et al.* COINFECÇÃO *Corynebacterium spp* E *Mycobacterium spp* EM CAPRINO - RELATO DE CASO. **6ª Feira Internacional caprinos e ovinos** 10-14 de março, 2009.

BENESI, E. J. *et al.* RELATO DE CASO: TUBERCULOSE EM CAPRINO (*CAPRA HIRCUS*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v. 75, n. 2, p. 217-220, 2008.

BERNABÉ, A. *et al.* Morphopathology of caprine tuberculosis. I. Pulmonary Tuberculosis. **Annales de Veterinária de Murcia**. 1991a.

BERNABÉ, A. *et al.* Morphopathology of caprine tuberculosis. II. Generalization of tuberculosis. **Annales de Veterinária de Murcia**. 1991b.

BIET, F. *et al.* Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). **Veterinary Research**. v. 36, p. 411–436, 2005.

- BILLINGTON S. J. *et al.* Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letter**. v. 208, p. 41-45, 2002.
- BOSE, M. Natural reservoir, zoonotic tuberculosis & interface with human tuberculosis: An unsolved question. Commentary. **Indian Journal of Medical Research**. v. 128, p. 4-6, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) / organizadores, Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vítor Salvador Picão Gonçalves. - Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. p.188.
- BRASIL. Ministério do planejamento, orçamento e gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas - IBGE. Produção da Pecuária Municipal. v. 35, p.25-26, 2007.
- BURRELL, D. H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. **Research in Veterinary Science**. v. 28, n. 2, p. 34-237, 1980.
- CADMUS, S. I. *et al.* *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in Goats, Nigeria. **Emerging Infectious Diseases**. 15 (12), 2009.
- CAMARGO, E.V.; BARBOZA, C.S.; KREWER, C.; VARGAS, A.P.C.; CECIM, M.; LEAL, M.L.R. Isolamento de *corynebacterium pseudotuberculosis* no sêmen de um carneiro na região central do rio grande do sul. **Arquivo Instituto Biológico, São Paulo**. v.77, n.1, p.139-142, 2010.
- CARMINATI, R. *et al.* Determinação da sensibilidade e especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 2, n. 1, p. 88-93, 2003.
- CASSIDY, J. P; BRYSON, D. G.; CANCELA, M. M. G.; FOSTER, F.; POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. **J. Comp. Pathol**. v. 124, p.46-51, 2001.
- CASSIDY, J. P. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. **Veterinary Microbiology**. v. 112, p. 151-161, 2006.

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

COCKLE, P. J. Field Evaluation of a Novel Differential Diagnostic Reagent for Detection of *Mycobacterium bovis* in Cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 13, n. 10, p. 1119–1124, 2006.

COLLINS, D. M. *et al.* Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**. v. 40, p. 83-94, 1994.

CORDEIRO, P. R. C. O desenvolvimento econômico da caprinocultura leiteira. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. v. 4, n. 13, 1998.

CORNER, L. A & NICOLACOPOULOS, C. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. **Australian Veterinary Journal**. v. 65, n. 7, p. 202-205, 1988.

COSIVI, O. *et al.* Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. **Emerging Infectious Diseases**. v. 4, n. 1, 1998.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**. v. 57, p. 641-676, 2003.

COSTA, M. D. M. *et al.* Linfadenite caseosa dos caprinos no estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador. V. 12, n. 1, p. 1-7, 1973.

COUSINS, D. V.; CASEY, R.; MAYBERRY, C. *Mycobacterium bovis* infection in a goat. **Australian Veterinary Journal**. v. 70, n. 7, p. 262-263, 1993.

COUSINS, D. V. & FLORISSON, N. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**. v. 24 n.3, p.1039-1059, 2005.

CRAWSHAW, T. *et al.* TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. **The Veterinary Record**. v. 163, n. 4, p. 127, 2008.

- D'AFONSECA, V. *et al.* A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genetics and Molecular Research**. v. 7, n.1. p. 252-260, 2008.
- DERCKSEN, D. P. *et al.* A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**. v. 75, p. 167–175, 2000.
- DORELA, F. A. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**. v. 37, p. 201-218, 2006a.
- DORELA, F. A. *et al.* Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. **Genetics and Molecular Research**. v. 5, n. 4, p. 653-663, 2006b.
- EISENSTADT, J.; HALL, G. S. Microbiology and Classification of Mycobacteria. **Clinics in Dermatology**. v. 13, p. 197-206, 1995.
- EMPRESA BAIANA DE DESENVOLVIMENTO AGRÍCOLA (EBDA), 2000. Disponível em <http://www.seagri.ba.gov.br/ebda/abril-maio00mat-7.htm>. Acessado em 14/09/2009.
- ERNST, J. D.; TREVEJO-NUÑEZ, G.; BANAIIEE, N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n. 7, 2007.
- FOLEY, J. E. *et al.* Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. **American Journal of Veterinary Research**. v. 65, n. 12, p. 1734-1737, 2004.
- FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research**. v. 76, p. 42-48, 2008.
- FRANÇA, A. P. *et al.* Isolamento de *Mycobacterium bovis* na glândula mamária de caprinos tuberculina positiva. **Biológico**. v. 70, n. 2, p. 107-206, 2008.
- FRENEY, J. *et al.* Evaluation of API Coryne in Comparison with Conventional Methods for Identifying Coryneform Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 38-41, 1991.

GANGULY, N.; SIDDIQUI, I; SHARMA, P. Role of M. tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. **Tuberculosis**. v. 88, p. 510-517, 2008.

GARCÍA MARÍN, J. F. B.; PALAU, P.; BADIOLA, J. J. Tuberculosis caprina: descripción de casos clínicos, distribución geográfica y formas de presentación en rebaños altamente infectados. **Cienc. Vet.** n. 5, p. 63–66, 1992.

GARNIER, T. *et al.* The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **PNAS**. v. 100, n. 13, p. 7877–7882, 2003.

GUTIÉRREZ, M. *et al.* Differentiation by Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Strains Causing Tuberculosis in Cattle and Goats. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 2953–2956, 1995.

GUTIÉRREZ, M. *et al.* Identification by Spoligotyping of a Caprine Genotype in *Mycobacterium bovis* Strains Causing Human Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 3328–3330, 1997.

HADDAD, N. *et al.* Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 3623–3632, 2001.

HADDAD, N.; MASSELOT, M.; DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. **Research in Veterinary science**. v. 76, p. 1-18, 2004.

HETT, E. C.; RUBIN, E. J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. p. 126–156, 2008.

HEWINSON, R. G. *et al.* Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: A feeling for the organism. **Veterinary Microbiology**. v. 112, p. 127-139, 2006.

HOGAN *et al.* Requirements for CD4 T cell levels in acute *Mycobacterium bovis* strain bacille Calmette Guérin (BCG)-induced granulomas differ for optimal mycobacterial control versus granuloma formation. **International Immunology**. p. 1-7, 2007.

HONORÉ-BOUAKLINE, S. *et al.* Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of Sample Preparation and DNA Extraction. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 2323–2329, 2003.

- HOPE, J. C.; VILLARREAL-RAMOS, B. Bovine TB and the development of new vaccines. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. v. 31, p. 77–100, 2008.
- HOU X. G. *et al.* Genetic identification of members of the genus *Corynebacterium* at genus and species levels with 16S rDNA-targeted probes. **Microbiology and Immunology**. v. 41, p. 453-460, 1997.
- IBGE – FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS – Sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?z=t&o=20&i=P/>. Acessado em: 30/05/2009.
- JOIN-LAMBERT, O. F. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient Pediatric. **Infectious Diseases Journal**. v. 25, p. 848–851, 2006.
- JOLLY, R. D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 29, n. 1, p. 189-196, 1966.
- KABA, J.; KUTSCHKE, L.; GERLACH, G-F. Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. **Veterinary Microbiology**. v. 78, p. 155-163, 2001.
- KARIUKI, D. P.; POULTON, J. *Corynebacterium* infection of cattle in Kenya. **Tropical Animal Health and Production**. v. 14, p. 33-36, 1982.
- KHAMIS, A.; RAOULT, D. L.; SCOLA, B. L. *rpoB* Gene Sequencing for Identification of *Corynebacterium* Species. **Journal of clinical microbiology**. p. 3925–3931, 2004.
- KUBICA, G. P. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. **ID# 5789**. Disponível em: <<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>> Acesso em: 20 de Dezembro de 2010.
- KUBICA, T.; RUSCH-GERDES, S.; NIEMANN, S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 3070–3077, 2003.
- KURIA, J. K. N. *et al.* Caseous Lymphadenitis in Goats: The Pathogenesis, Incubation Period and Serological Response after Experimental Infection. **Veterinary Research Communications**. v. 25, p. 89-97, 2001.

KURIA, J. K.; HOLSTAD, G. A seroepidemiological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks in southern Norway. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 30, p. 107–108, 1989.

LAN, D. T. B. *et al.* Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology and Immunology**. v. 42, n. 12, p., 863–870, 1998.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; SCHERER, P. O. Prevalência e diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos do estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.11, p.31-34, 1991.

LEITE, C. Q. F. *et al.* Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LESSLIE, I. W.; FORD, E. J. H.; LINZELL, J. L. Tuberculosis in goats caused by the avian type *tubercule bacillus*. **Veterinary Record**. v. 72, n. 2, p. 25-27, 1960.

LÉVY-FRÉBAUL, V. V.; PORTAELS, F. Proposed Minimal Standards for the Genus *Mycobacterium* and for Description of New Slowly Growing *Mycobacterium* Species. **International Journal Of Systematic Bacteriology**. p. 315-323, 1992.

LIÉBANA, E.; A ARANAZ, A.; URQUÍA, J. J.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. **Australian Veterinary Journal**. v. 76, n. 1, 1998.

LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. **Revista Brasileira de Medicina veterinária**. v. 22, n.4, p. 145-151, 2000.

LISLE, G. W.; BENGIS, R. G.; SCHMITT, S. M.; O'BRIEN, D. J. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**. v. 21, n. 2, p. 317-334, 2002.

LOFSTED, J. Distúrbios dos Sistemas Orgânicos. In: SMITH, B. P. **Medicina Interna de Grandes Animais**. p. 583-584, 2002.

LUBISCO, N. M. L.; VIEIRA, S. C. Manual de Estilo Acadêmico: Monografias, Teses e Dissertações. 2ª ed. Salvador: EDUFBA. p. 145, 2003.

MARASSI, C. *et al.* The use of MPB70-ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in Brazil. **Veterinary Research Communications**. v. 33, p. 937-943, 2009.

MCNAIR, J.; WELSH, M. D.; POLLOCK, J. M. The immunology of tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. **Vaccine**. v. 25, p. 5504-5511, 2007.

MELO, L. E. H. *et al.* Intercorrência entre tuberculose bovina e caprina: um fator de risco da tuberculose zoonótica no Estado de Pernambuco. In: Congresso Brasileiro de Saúde pública veterinária, 1, 2005, Guarapari. **Anais...** Guarapari: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2005.

MELO, M. T. *et al.* Ocorrência da tuberculose caprina no Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v. 72, n. 2, p. 1-64, 2005.

MENZIES, P. I. *et al.* Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an Escherichia coli recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Small Ruminant Research**. v. 13, p. 193-198, 1994.

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, p. 129-137, 2004.

MENZIES, P. I.; MUCKLE, C. A. The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 10, p. 313-318, 1989.

MEYER, R. *et al.* Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.

MEYER, Roberto. *Corynebacterium pseudotuberculosis* e seu hospedeiro caprino: Aspectos da Prevalência, do Diagnóstico e da Vacinação. **Tese de Doutorado em Imunologia**. Universidade Federal da Bahia, Brasil, Salvador. p. 83, 2003.

MEYER, R. *et al.* In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 107, p. 249-254, 2005.

MILLER, J. *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 9, p. 244-249, 1997.

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

MOLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular Microbiology**. v. 26, p. 1005-1011, 1997.

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

MOURA-COSTA, L. F. *et al.* Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 3, n. 1, p. 1-9, 2002.

NASSAR, A. F. C. **Linfadenite caseosa ou “mal do caroço”**. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/linfadenite/index.htm>. Acesso em:  10/11/2010.

NEILL, S. D.; BRYSON, D. G; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in Cattle. **Tuberculosis**. v. 81, n. 1/2, p. 79-86, 2001.

O` REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animal and man: a review. **Tubercle and Lung Disease: Supplement 1**. v. 76, p. 1-46, 1995.

PACHECO, L. G. C. *et al.* Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 480-486, 2007.

PARRA, A. *et al.* Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. **Veterinary Microbiology**. v. 97, p. 123-33, 2003.

PATON, M. W. *et al.* The effects of caseous lymphadenitis on wool production and body weight in young sheep. **Australian Veterinary Journal**. v. 65, p. 117-119, 1988.

- PAULE, B. J. A. *et al.* SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 3, n. 1, p. 44-52, 2004.
- PEEL, M. M. *et al.* Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clinical Infectious Diseases**. v. 24, p.185–191, 1997.
- PEKELDER, J. J. Caseous lymphadenitis. In: MARTIN, W. B.; AITEKEN, I. D. **Diseases of Sheep**. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing. p. 270-274, 2000.
- PEPIN, M. *et al.* Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 56, p. 666-670, 1994.
- PHILLIPS, C. J. C. *et al.* The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. **Research in Veterinary science**. v. 74, p. 1-15, 2003.
- PIGNATA, W. A. *et al.* Prevalência para tuberculose caprina no semi-árido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 7, p. 526-532, 2009.
- PINHEIRO, S. R. *et al.* Surto de tuberculose em caprinos (*Capra hircus*): relato de caso. **Anais... XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, de 14 a 19/07/2007**, p. 34, 2007.
- PINHEIRO, S. R. **Tuberculose em caprinos e ovinos**. Disponível em:<<http://www.sheepembryo.com.br/files/artigos/184.pdf>>. Acessado em: 05 de abril de 2010.
- POLLOCK, J. M & NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. **The veterinary Journal**. v. 163, p.115-127, 2002.
- POLLOCK, J. M. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. **Veterinary Microbiology**. v. 112, p. 141–150, 2006.
- PRESCOTT, J. F.; MENZIES, P. I.; HWANG, Y.-T. An interferon- γ assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Veterinary Microbiology**. v. 88, p. 287–297, 2002.

PRODINGER, W. M. *et al.* Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 4984–4992, 2005.

PRODINGER, W. M. *et al.* Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 2270–2272, 2002.

PUECH, V. *et al.* Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. **Microbiology**. v. 147, p. 1365-1382, 2001.

QUINTANS, L. J. Estudo de mercado e de localização-Usina de desidratção de leite de cabras. Microrregião homogenia do Cariri ocidental. Plano de Desenvolvimento Local Integrado. p. 104, 1995.

RADOSTITS O. M. *et al.* . Doenças causadas por Bactérias. **Clínica veterinária – Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. p. 653-656. 2002.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Caseous lymphadenitis in sheep and goats. In: **Veterinary Medicine**. p. 727-730, 2000.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E. & SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Rev Sci Tech Off Int Epiz**. v. 20, p. 21-54, 2001.

ROMERO, R. E.; GARZON, D. L.; MEJIA, G. A.; MONROY, W.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. **Canadian Journal of veterinary Research**. v. 63, p. 101-106, 1999.

ROXO, E. M. *M. bovis* como causa de zoonose. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. v.18, n.1, p.101-108, 1997.

RUA-DOMENECH, R. *et al.* Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**. v. 81, p. 190–210, 2006.

SCHREUDER, B. E. C.; TER LAAK, E.A.; DERCKSEN, D.P. Eradication of caseous lymphadenitis in sheep with the help of a newly developed ELISA technique. **Veterinary Record**. v. 135, p. 174–176, 1994.

SEVA, J. *et al.* Caprine tuberculosis eradication program : an immunohistochemical study. **Small Ruminant Research**. v. 46, p. 107-114, 2002.

SEYFFERT, N. *et al.* High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**. v. 88, n. 1, p. 50-5, 2010.

SHIGIDI, M. T. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. **British Veterinary Journal**. v. 135, p. 172–177, 1979.

SILVA, R. R. Agribusiness do leite de cabra. Salvador: SEBRAE. p. 63, 1998.

SILVA, P. E. G. *et al.* Teste de tuberculinização em caprinos (*Capra hircus*) experimentalmente sensibilizados. **Ciência Rural**. v. 36, n. 3, p. 880-886, 2006.

SKORIC, M. *et al.* Tuberculous and tuberculoid lesions in free living small terrestrial mammals and the risk of infection to humans and animals: a review. **Veterinarni Medicina**. v. 52, n. 4, p. 144–161, 2007.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. Caseous Lymphadenitis. **In Goat Medicine**. Lea & Febier, p. 47-61, 1994.

SOARES, A. T.; VIANA, J. A.; LEMOS, P. F. B. A. Recomendações Técnicas para Produção de Caprinos e Ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v.1., n.2, p.45-51, 2007.

STING, R.; STENG, G.; SPENGLER, D. Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. **Zentralbl Veterinarmed B**. v. 45, n. 45, p. 209-216, 1998.

SUNIL *et al.* Performance of a whole blood interferon-gamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Microbiology**. v. 128, p. 288–297, 2008.

TAYLOR, G. M. *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**. v. 3. n. 12, 2007.

TER LAAK, E. A., *et al.* Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **American Journal of Veterinary Research**. v. 53, p. 1125-1132, 1992.

TRIBULO, H. *et al.* Estudio de la prevalência de brucelosis y tuberculosis em hatos caprinos de la region centro y norte de la provincia de córdoba. XIV Reunion Científica Técnica de la Asociacion de Veterinarios de Laborarórios de Diagnóstico, Córdoba, Argentina, 2002.

VOLKMAN, H. E. *et al.* Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. **PLoS Biology**. v. 2, n. 11, 2004.

WARREN, R. M. *et al.* Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 10 n. 7, p: 818–822, 2006.

WATERS, W. R. *et al.* Use of Recombinant ESAT-6:CFP-10 Fusion Protein for Differentiation of Infections of Cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *Paratuberculosis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 11, n. 4, p. 729–735, 2004.

WEDLOCK, N. D. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. **Microbes and Infection**. v. 4 p. 471–480, 2002.

WELSH, M. D. *et al.* Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Immunology**. v. 114, p.101–111, 2005.

WHIPPLE, D. L.; BOLIN, C. A.; MILLER, J. M. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 8, p. 351–354, 1996.

WIKER, H. G. MPB70 and MPB83 – Major Antigens of *Mycobacterium bovis*. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 69, p. 492–499, 2009.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 2, p. 359–371, 2001.

WOOD, P. R.; JONES, S. L. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis**. v. 81, n. 1/2, p. 147–155, 2001.

ZANINI, M. S. *et al.* Mycobacterium bovis: Polymerase Chain Reaction Identification in Bovine Lymphnode Biopsies and Genotyping in Isolates from Southeast Brazil by Spolypotyping and Restriction Fragment Length Polymorphism. **Memória Instituto Oswaldo Cruz.** v. 96: 000-000, 2001.

ZUBER, B. *et al.* Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State. **Journal of Bacteriology.** v. 190, n. 16, p. 5672-5680, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Inquérito epidemiológico das propriedades de caprinos

Data do inquérito: -----/-----2010.

Nome da fazenda: -----

Nome do proprietário: -----

Endereço: -----

Telefone: -----Email -----

Município: -----

Tipo de pastagem nativa: -----

Número total de caprinos: -----cabeças

Número total de bovinos: -----cabeças

Número de animais coletados: -----

SISTEMA DE PRODUÇÃO:

extensivo intensivo semi-intensivo

TIPO DE EXPLORAÇÃO:

corte leite misto

RAÇA PREDOMINANTE:

anglo-nubiana pardo-alpina mestiço Sanen outras. Qual? -----

ALIMENTAÇÃO:

pastagem nativa sal grosso forragem feno sal mineral capim picado restos de culturas outros. Qual? -----

Do animal recém nascido:

leite de cabra leite de vaca outro. Qual? -----

DOENÇAS DE CAPRINOS MAIS IMPORTANTES NA: Região -----

Propriedade -----

TEM ALGUM CASO DE:

Caeve: sim não. Quando? -----Linfadenite: sim não. Quando? -----Tuberculose: sim não. Quando? -----

VACINAS EFETUADAS:

Raiva Quando? -----Linfadenite caseosa Quando? -----Outras Quais? -----

Quando?-----

Intervalo de vacinação:

 mensal trimestral semestral anual

ANIMAIS QUE CONVIVEM COM CAPRINOS:

 gatos cães bovinos ovinos suínos eqüinos galinhas aves
outros. Quais?-----

A FAZENDA TEM ASSISTÊNCIA DE:

 veterinário agrônomo técnico agrícola outros. Qual? -----

Quantas vezes:

 uma por semana diariamente quinzenal mensal somente quando tem
problemas clínicos somente para vacinação somente para colheita de exames
outros. Quais?-----

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Estudo da ocorrência de infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e/ou *Mycobacterium spp.* em caprinos com suspeita clínica de Linfadenite Caseosa.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Italaney Fehlberg

INSTITUIÇÃO A QUE PERTENCE O PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

TELEFONES PARA CONTATO: 3235-9682 – ramal 225

NOME DO ORIENTADOR: Roberto Meyer

Eu,.....RG.....
proprietário/responsável pela fazenda..... declaro que concordo
participar da pesquisa acima intitulada, autorizando a coleta de sangue e pus de caroços dos
animais e que fui devidamente informado(a) pelo pesquisador(a), Italaney Fehlberg, dos
procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios e confidencialidade da
pesquisa. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Local e data:

....., /...../ 2010.

(Nome do proprietário por extenso)

(Assinatura)

ANEXOS

ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais.

	<p>Universidade Federal da Bahia Instituto de Ciências da Saúde (ICS) Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)</p>	
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>Certificamos que o protocolo número 005/2010, intitulado “Estudo da ocorrência de infecção por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e/ou <i>Mycobacterium spp.</i> em caprinos com suspeita clínica de Linfadenite Caseosa”, sob a responsabilidade do Professor Roberto José Meyer do Nascimento, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em 12 de agosto de 2010.</p>		
<p>CERTIFICATE</p>		
<p>We certify that the protocol number 005/2010, entitled “Evaluation of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> and/or <i>Mycobacterium spp.</i> Infection in caseous lymphadenitis clinically suspicious goats”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). This project was APPROVED by the Ethics Committee on Animal Use from the Institute of Health Sciences (CEUA-ICS, Federal University of Bahia - UFBA) on August 12, 2010.</p>		
<p>Salvador, 12 de agosto de 2010</p>		
<p> Profª Dra. Songeli Menezes Freire Presidente da CEUA-ICS</p>		
<p>CEUA-ICS Av. Reitor Miguel Calmon, s/n Vale do Canela – Salvador-BA CEP: 40.110-902</p>	<p>Telefone: (71) 3283-8958 Telefax: (71) 3245-0917 E-mail: ceuaics@ufba.br</p>	<p>http://www.moodle.ufba.br/course/view.php?id=10332</p>