

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE**  
**DIAGNÓSTICO PARA LINFADENITE CASEOSA EM**  
**OVINOS SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS**

**Dayana Ribeiro**  
Médica Veterinária

**Araçatuba – SP**  
**2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE  
DIAGNÓSTICO PARA LINFADENITE CASEOSA EM  
OVINOS SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS**

**Dayana Ribeiro**

**Orientadora: Profa. Assist. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto**

**Co-orientador: Prof. Titular Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Curso de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Araçatuba – SP

2009

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R484a Ribeiro, Dayana  
Análise comparativa de métodos de diagnóstico para  
Linfadenite Caseosa em ovinos sintomáticos e assintomáticos /  
Dayana Ribeiro. - Araçatuba : [s.n.], 2009  
65 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2009  
Orientador: Profa. Maria Cecília Rui Luvizotto  
Coorientador: Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* 2. Biopsia por punção  
3. ELISA 4. Citologia 5. Técnicas bacteriológicas 6. Reação em  
cadeia da polimerase 7. Linfadenite Caseosa 8. Ovinos

CDD 636.0896

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: Análise comparativa de métodos de diagnóstico para linfadenite caseosa em ovinos sintomáticos e assintomáticos.

AUTOR: DAYANA RIBEIRO

ORIENTADOR: Dr.ª MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

  
Dr. MARCIO GARCIA RIBEIRO

  
Dr.ª TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

  
Dr.ª MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 22 de maio de 2009.

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr.ª MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO  
- Orientadora -

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**DAYANA RIBEIRO** – nascida em 07 de agosto de 1982, na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, formada em Medicina Veterinária em 2004 pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), residência em Patologia Veterinária pela Faculdade de Odontologia (FOA) e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba e aluna do curso de Pós Graduação em Ciência Animal da mesma instituição na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica.

## EPÍGRAFE

“Quem quer fazer alguma coisa, encontra um meio. Quem não quer  
fazer nada, encontra uma desculpa.”

(Roberto Shinyashiki)

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha amada mãe Maria Ozoria Ribeiro, quem me dá duas certezas na minha vida: amor e apoio incondicionais. Mãezinha esta obra é sua.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, meu obrigada, obrigada, muito obrigada.

A minha amada mãe, Maria Ozoria Ribeiro, minha “estagiária” durante as coletas em 7 fazendas, ajudante de cozinha no LGCM e sempre amiga, confiante nas horas em que nem eu não era.

A Profa Maria Cecília Rui Luvizotto, minha querida orientadora, amiga, que sempre me apoiou desde a época da residência, me aceitando, estimulando e sempre me ajudando. Sem a senhora, nada disso seria possível. Obrigada por me ajudar a concretizar este sonho.

Ao Prof. Vasco Azevedo, quem me acolheu com todo carinho e apoio, disponibilizando todos os recursos necessários do seu laboratório. Obrigada Prof. Vasco pela oportunidade. Serei eternamente grata.

Ao Prof. Anderson Miyoshi, pelos conselhos, carinho e amizade.

Ao Prof. Raphael Hirata Junior, grande microbiologista, obrigada pelo seu conhecimento, pela sua infindável ajuda e amizade.

A Profa. Silvia Perri, brilhante professora de estatística, que sempre mantém as portas abertas aos seus alunos. Muito obrigada pela ajuda.

Aos futuros doutores Luis Pacheco, meu Chefinho, e Fernanda Dorella, minha conselheira e amiga. Vocês foram fundamentais na minha formação e na realização deste projeto.

Ao Thiago Luiz de Paula Castro, pela ajuda durante estes anos com o processamento das amostras, ajuda na bancada e nas dúvidas. Thi, muito obrigada.

Aos queridos amigos do LGCM: Núbia e Daniel, colegas do núcleo de diagnóstico, Sintia, Anne, Siomar, Pablo, Vivian, e as lactococas: Tessália, Sarah, Fernanda Lima e Marcela, meu muito obrigada. Vocês fazem parte da minha história.

A Bianca Dias Paludeto, minha sincera amiga, companheira de república, colega de residência e “iniciação científica” durante as coletas. Bi sou muito grata a você.

Aos colegas de Patologia: Heitor, Vinícius, Arieli, Zé, Pedro, Magna, Profa. Gisele Machado e Profa. Daniela Rozza. Obrigada pela atenção, estímulo e companheirismo.

Ao meus queridos irmãos Alexandre e Junior; meus amados avós Dirceu e Sidica, tia Floriza e Kerson, enfim, a todos da minha família, meu agradecimento pela força e palavras de confiança.

Aos proprietários e seus funcionários, obrigada pela oportunidade de conhecê-los, por cederem seus animais, por terem me ajudado nas coletas e confiado no meu trabalho. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos meus queridos “pais” financiadores deste projeto: mãezinha, Profa. Maria Cecília e Prof. Vasco. Vocês foram a minha fonte de amor, perseverança e conhecimento.

Aos amigos e colegas que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir mais um sonho, o meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| RESUMO .....   | xi     |
| SUMMARY .....  | xii    |
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....  | 1      |
| Referências .....  | 14     |
| CAPÍTULO 2 – TÍTULO DO TRABALHO .....  | 22     |
| ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA<br>LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS SINTOMÁTICOS E<br>ASSINTOMÁTICOS |        |
| Resumo .....   | 22     |
| Palavras-Chave .....   | 22     |
| I.INTRODUÇÃO .....   | 23     |
| II.MATERIAL E MÉTODOS .....  | 26     |
| 1 Animais .....  | 26     |
| 2 ELISA .....  | 30     |
| 3 Citologia Aspirativa por Agulha Fina (CAAF) .....  | 31     |
| 4 Cultivo e Isolamento Bioquímico .....  | 33     |
| 5 PCR (gene alvo <i>pld</i> ) .....  | 35     |
| 6 Análise Estatística .....  | 37     |
| III.RESULTADOS .....   | 39     |
| IV.DISSCUSSÃO .....  | 45     |
| V.CONCLUSÃO .....  | 48     |
| VI.REFERÊNCIAS .....   | 49     |

## ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS

**RESUMO** – A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença crônica contagiosa, causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis* que acomete ovinos e caprinos acarretando perdas econômicas importantes. O diagnóstico é baseado no cultivo e identificação bioquímica, no entanto a fase subclínica e/ou visceral requerem métodos alternativos para sua detecção. Apesar dos métodos de diagnóstico já existentes, raramente pesquisas investigaram a utilização de material proveniente de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodo de ovinos aplicadas a outras técnicas de diagnóstico. O presente trabalho objetivou avaliar a sensibilidade e especificidade de métodos de diagnóstico para LC em ovinos sintomáticos (n=26) e assintomáticos (n=129), utilizando material colhido através de PAAF de linfonodo. As técnicas basearam-se na amplificação por PCR do gene alvo *pld* (fosfolipase D), no cultivo bacteriano associado a identificação bioquímica, no citodiagnóstico, bem como na pesquisa do agente etiológico. O teste sorológico por ELISA indireto foi adaptado para a espécie ovina. As amostras clínicas recuperadas da PAAF forneceram material adequado e suficiente para realização dos testes propostos, implementando a rotina do diagnóstico para LC. Dentre os métodos testados, o ELISA e a PCR foram os que apresentaram maior sensibilidade (92%). A maior especificidade foi verificada no cultivo bacteriano (98%), seguido do exame citológico (94%).

**Palavras-Chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, biopsia por punção, ELISA, citologia, técnicas bacteriológicas, reação em cadeia da polimerase.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF DIAGNOSTIC METHODS FOR CASEOUS LYMPHADENITIS IN SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC SHEEPS

**SUMMARY** – Caseous Lymphadenitis (CL) is considered a chronic contagious disease caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* affecting sheep and goats causing economical losses. The diagnostic is based on microorganism culture and respective identification. However no clinical and/ or visceral cases need alternative methods for detection. In spite of a range of diagnostic methods, few studies demonstrate the usefulness of fine-needle aspiration biopsy (FNAB) method. The aim of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of diagnostic methods for CL in symptomatic (n=26) and asymptomatic (n=129) sheeps, using specimens collected from lymph nodes by FNAB assay. These techniques were performed using PCR targeting the *pld* gene (phospholipase D), on biochemical identification and culture, cytodagnostic searching the aetiological agent. The serologic test of ELISA method was also applied in all ovine sera. Clinical samples recovered in FNAB given suitable and enough samples to perform the identification of *C. pseudotuberculosis*, implementing CL diagnostics. Among all techniques used here, ELISA and PCR demonstrated higher sensitivity (92%), whereas microorganism culture (98%) and cytodagnostic (94%) presented higher specificity.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, biopsy, ELISA, cytology, bacteriological techniques, polymerase chain reaction.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Evoluindo de criações voltadas para a subsistência, hoje a expansão da ovinocultura está transformando o cenário produtivo no Brasil. Nos últimos anos houve crescente interesse na criação de ovinos para a produção de carne, principalmente na região Noroeste do estado de São Paulo, notadamente na região de Araçatuba. Conhecida como a “terra do boi gordo” por produção agropecuária intensa, a região de Araçatuba, se destaca no mercado econômico nacional pela criação de ovinos. O rebanho de ovinos na região possui cerca de 20 mil cabeças, distribuídas em 62 propriedades, cadastradas no Núcleo de Criadores de Ovinos de Araçatuba (NOGUEIRA et al., 2007). O mercado de ovinos vem crescendo rapidamente a cada ano, exigindo grande preocupação com os aspectos sanitários.

Entre as doenças bacterianas de maior preocupação está a Linfadenite Caseosa (LC), por causar sérios prejuízos a espécie ovina, constituindo limitação zootológica às explorações comerciais (MEYER et al., 2002; RIBEIRO et al., 1988).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) caracteriza-se como bacilo Gram positivo, curto, irregular e muito pleomórfico (0,5 a 0,6  $\mu\text{m}$  por 1 a 3  $\mu\text{m}$ ), podendo apresentar aspecto cocóide, isolado ou formando grupamentos irregulares ou em paliçada. São organismos imóveis, aeróbicos tolerantes e anaeróbicos facultativos; metabolizam e fermentam carboidratos; não formam esporos, produzem  $\beta$ -hemólise e multiplicação lenta em meios enriquecidos, como ágar sangue, ágar BHI (Brain Heart Infusion) ou caldo BHI. (BATEY, 1986; DORELLA, et al., 2006; QUINN et al., 2005).

O agente etiológico da LC foi isolado pela primeira vez pelo bacteriologista francês Edmond Nocard em 1888, de caso de linfangite em uma vaca. Hugo von Preisz (1891) observou bacteriologicamente o microrganismo em culturas de abscessos renais de ovelha em 1894. Como resultado destas descobertas, o organismo em questão tornou-se conhecido como bacilo de

Preisz-Nocard. No final do século 19, Lehmann e Neumann (1896) ao publicarem sua primeira edição do atlas bacteriológico, renomearam o agente para *Bacillus pseudotuberculosis*. A nomenclatura atual foi adotada em 1948 na sexta edição do Bergey's Manual (BAIRD; FONTAINE, 2007).

Esta bactéria forma colônias pequenas esbranquiçadas e opacas em 24 a 48 horas a 37 °C que apresentam superfície “trançada” ou enrugada. Devido ao elevado conteúdo de lipídios na parede celular bacteriana, particularmente o ácido corinomicólico, as colônias “borrifam sob uma chama”, e podem ser empurradas pela superfície do ágar, como se fosse um “disco de hóquei” (DAVIS, 1993). A presença destes lipídios é atribuído a multiplicação em meio líquido, formando flocos característicos (JOLLY, 1966), além de conferir semelhança com os lipídeos de superfície de *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Mycobacterium* (BROWN et al., 1987).

Em esfregaços corados possuem aspecto “perolado”, aparecem isoladas, em paliçadas de células paralelas e em grupos angulares semelhantes a “letras chinesas” (QUINN et al., 2005). Essas bactérias compartilham características com *Mycobacterium* e *Nocardia*, mas são facilmente diferenciadas (JONES et al., 2000).

A LC possui como sinonímias “mal do caroço”, “caroço”, ou “falsa tuberculose”, “síndrome da ovelha magra”. É um patógeno primariamente de ungulados. Eventualmente, tem sido encontrada em bovinos e eqüinos (DOHERR et al., 1998; HOMMEZ et al., 1999; YEURHAM et al., 2004), porém é em ovinos e caprinos que assume importância econômica e sanitária (BROWN et al., 1987).

A LC é caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de abscessos encapsulados em linfonodos superficiais e viscerais de ovinos e caprinos (BROWN et al., 1987; PATON et al., 2003; WALKER, 1996; WILLIAMSON, 2001). Estas duas manifestações da doença podem ocorrer concomitantemente (O'REILLY et al., 2008).

Os abscessos são constituídos por paredes espessas, com conteúdo purulento amarelo-esverdeado a branco-amarelado no estágio inicial, que se

torna de consistência densa, tipo queijo coalho ou caseoso (PATON, 1997). Medem 4-5 cm e aumentam lentamente podendo assumir grande diâmetro (até 15 cm).

Os principais linfonodos superficiais acometidos são os que se localizam na região da cabeça, ao longo do pescoço e nos ombros, incluindo o parotídeo e submandibular (MOURA COSTA et al., 1973). Há também o comprometimento dos linfonodos cervical, pré-escapulares, pré-curais, pré-femoral, embora a região pré-escapular seja mais afetada (ALVES; PINHEIRO, 2002; KIMBERLING, 2002; PATON et al., 2003).

Na forma interna, os abscessos localizam-se nos linfonodos viscerais, principalmente o mediastínico, retrofaríngeos e linfonodo hepático, bem como em órgãos como pulmão (FONTAINE; BAIRD, 2008), fígado, rins, útero, baço, epidídimo e úbere (DORELLA et al., 2006; PATON et al., 2003; WALKER, 1996; WILLIAMSON, 2001).

O envolvimento de órgãos internos pode ser subclínico, comumente manifestado pela perda de peso de evolução debilitante, podendo levar a denominada “síndrome da ovelha magra” (MENZIES, 1998).

A LC é uma doença que compromete principalmente a pele do animal e as membranas mucosas, principais portas de entrada do microrganismo (MENZIES, 1998). Entre caprinos e ovinos, a porta de entrada provavelmente difere, já que sofrem soluções de continuidade na pele por ocasiões diferentes, devido aos seus hábitos e comportamentos, resultando em diferente distribuição dos abscessos entre as duas espécies (NAIRN; ROBERTSON, 1974; PATON, 1997).

A partir da lesão inicial ou da porta de entrada, a bactéria é seqüestrada aos linfonodos regionais, sofrendo ingestão pelas células fagocitárias e fusão lisossomal. O organismo pode sobreviver e multiplicar, levando a destruição do fagócito (BATEY, 1986; BROWN et al., 1987; JOLLY, 1966; SMITH; SHERMAN, 1994). *C. pseudotuberculosis* se dissemina pela via linfática para os linfonodos regionais e órgãos, como o pulmão, nos quais são formados

abscessos secundários. O período entre incubação e abscedação são de 2 a 6 meses (SMITH; SHERMAN, 1994).

A disseminação da bactéria no organismo hospedeiro depende, principalmente, da exotoxina fosfolipase D. Esta exotoxina favorece a viabilidade de *C. pseudotuberculosis* nas células, e possui propriedades hemolítica, vasodilatadora (BENHAM et al., 1962; BURREL, 1981; JOLLY, 1966) e atividade fosfolipásica (BATEY, 1986; SONGER, 1997).

A infecção, nos linfonodos e em outros órgãos, progride com a multiplicação intracelular de *C. pseudotuberculosis* e a morte das células hospedeiras. Na infecção experimental, a lesão se caracteriza por segregação de microrganismos e células degeneradas por camadas de macrófagos e tecido fibroso (BATEY, 1986). O tamanho da lesão parece ser determinado pelo número de microrganismos e pela presença de maior quantidade de lipídio citotóxico. Variações na evolução da doença ocorrem tanto em infecções experimentais quanto em naturais. Em animais ou rebanhos infectados pode-se observar anticorpos antitoxina sem manifestações clínicas nos animais (NAIRN; ROBERTSON, 1974).

Jolly (1966) observou a evolução das lesões e notou que, quando havia predominância de macrófagos, elas se resolviam. Ao contrário, quando predominavam polimorfonucleares, as lesões cronificavam. Isto sugere que a resposta do hospedeiro é mais importante para a evolução da doença do que a virulência da bactéria. Em infecções experimentais em camundongos, a bactéria é eliminada em 14 dias ou surge a lesão caseosa (BATEY, 1986). Esta lesão é uma forma de conter a bactéria e evitar que ela se dissemine no organismo hospedeiro.

*C. pseudotuberculosis* é reconhecido como um microrganismo de ocorrência mundial e altamente prevalente em países que possuem grandes criações de ovinos e caprinos como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá, Brasil, Argentina, Chile, Uruguai, França, Itália, Grã-Bretanha, União Soviética, Sudão e Israel (BURREL, 1981; PATON et al., 2003; STANFORD et al., 1998). No Brasil a doença tem sido diagnosticada

cl clinicamente em todas as regiões onde se pratica a ovino e caprinocultura, como por exemplo, em estados do Nordeste, Sudeste (NOGUEIRA et al., 2007) e Sul (RIET-CORREA et al., 2001).

No estado do Rio de Janeiro, Langenegger et al. (1991) encontraram incidência clínica de 29,4% da Linfadenite Caseosa Caprina em 13 rebanhos de caprinos leiteiros e de 33% na região Sudeste (MAGALHÃES et al., 1985). Outros trabalhos também confirmam sua prevalência nos estados da região Nordeste: Bahia (TINOCO, 1983), Rio Grande do Norte, Pernambuco (SOUZA NETO, 1987), Ceará (PINHEIRO et al., 2000) e região Sudeste: Rio de Janeiro e Minas Gerais (MAGALHÃES et al., 1985). A prevalência clínica da LC foi descrita entre 25%, chegando a 82,4% no estado da Bahia.

Para a caprino e ovinocultura nacional trata-se de um sério problema, com perdas econômicas evidenciadas através da diminuição da produção de leite, desvalorização da pele devido às cicatrizes, ao custo dos fármacos para fins terapêuticos e da mão de obra especializada para o tratamento dos abscessos superficiais, além de emagrecimento, óbito e condenação de carcaça (ARSENAULT et al., 2003; PAULE, 2003).

As perdas na produção são observadas quando o linfonodo afetado está localizado em áreas específicas (mandíbula, região crural, úbere), diminuindo as atividades normais do animal, como a mastigação, a locomoção no pasto, a procura por alimentos e a lactação. Na forma visceral a doença atinge órgãos, o que resulta no emagrecimento, na condenação de carcaça e na morte do animal.

Em ovinos do Rio Grande do Sul é, principalmente, uma doença subclínica, encontrada freqüentemente em frigoríficos, razão pela qual causa perdas econômicas por condenação de carcaças ou parte dessas e pode significar condição limitante para a exportação de carne ovina (RIET-CORREA, 2001).

A LC determina perdas para os ovinocultores e para a indústria de carne ovina. As perdas dependem dos preços da carne e da lã. Entre 1991 a 1992 os prejuízos foram estimados em 30 a 35 milhões de dólares na Austrália

(PATON, 1997). Para os abatedouros deste país, o custo anual da doença é de aproximadamente 1 milhão de dólares, por perdas por condenação de carcaça (PATON, 1997). Estima-se que 75% do tempo dos inspetores de carne ovina sejam gastos conferindo e removendo LC nos abatedouros da Austrália Ocidental (WALKER, 1996).

A Associação Paulista de Criadores de Ovinos (ASPACO), representada pela equipe de médicos veterinários, vistoriam os animais que chegam no recinto de feiras e exposições de ovinos. Nos animais que apresentam sinais clínicos de LC, é realizada a punção aspirativa por agulha fina de linfonodo pela equipe de médicos veterinários da ASPACO. Os casos positivos são impedidos de adentrarem nas exposições, retornando a sua origem (FILHO, 2007).

O artigo 225 da lei nº 1283 de 18/12/1950 que trata dos critérios referentes aos casos de LC em ovinos e caprinos enfatiza que os critérios para condenação são extensão dos abscessos presentes na carcaça. Assim, condenam-se as carcaças de animais magros e gordos quando as lesões são numerosas e extensas, em qualquer região. Podem ser aproveitadas para o consumo as carcaças de animais, magros e gordos, após remoção e condenação das partes atingidas e esterilizadas pelo calor (RIISPOA, 1950).

A principal via de transmissão da doença é o exsudato dos linfonodos rompidos, cujo material segregado contém elevado número de organismos viáveis (GASPAROTO, 1996). A transmissão ocorre mediante o contato entre o material drenado do abscesso e a pele ou mucosas íntegras dos animais sadios, ou com soluções de continuidade (BATEY, 1986 BURREL, 1981). Ocasionalmente, ocorre por inalação de aerossóis (CHAPLIN et al., 1999). Segundo Paton (1997), a fonte de microrganismos em rebanhos ovinos poderiam ser lesões pulmonares clinicamente não diagnosticadas, responsáveis pela liberação das bactérias por aerossóis.

Machos e fêmeas podem apresentar a doença em qualquer estação, porém a ocorrência aumenta em animais mais velhos, principalmente após um a dois anos de vida (GASPAROTO, 1996; MEYER et al., 2002).

As principais formas de propagação da doença entre propriedades são representadas pela introdução de animais infectados e equipamentos contaminados (tatuadores, brincadores e tosquiadores). Quando um animal infectado é introduzido num rebanho livre da doença, dentro de dois a três anos ocorre alta incidência do aparecimento de abscessos em todo rebanho (ALVES; PINHEIRO, 2000).

Diversos procedimentos de manejo favorecem a disseminação entre os animais, incluindo tosquia, tatuagem, marcação, castração, corte de cauda e vacinação. Fatores como a grande concentração de pequenos ruminantes, a vegetação composta por numerosas plantas cactáceas, que causam ferimentos na pele de caprinos e ovinos, e a falta de orientação adequada aos criadores de caprinos e ovinos, quanto à sanidade de seu rebanho são de grande relevância na transmissão e disseminação da doença (ALVES; PINHEIRO, 2000; GASPAROTO, 1996; GLENN, 2003; GOUVEIA, 2004; WALKER, 1996).

Outra forma comum da LC ser introduzida dentro de um rebanho é por animais assintomáticos provenientes de rebanhos infectados (SCHREUDER et al., 1986), decorrente de compras, empréstimos, trocas ou retorno de animais de exposições, feiras e outros concursos ou qualquer outro tipo de entrada de animais infectados na propriedade. Difícilmente um rebanho se mantém totalmente livre. Desta maneira, é necessária orientação técnica no sentido de adquirir animais em bom estado sanitário (GOUVEIA, 2004).

Animais infectados não são os únicos reservatórios desta infecção. *C. pseudotuberculosis*, possui alta viabilidade no ambiente. A habilidade do microrganismo sobreviver no ambiente favorece a presença deste agente nos criatórios. O microrganismo mantém-se viável na madeira por uma semana, na palha por três semanas e na forragem (feno) por oito semanas (ALVES; PINHEIRO, 2000). Resiste meses à dessecação, quando protegido do sol direto. Embora seja capaz de prolongada sobrevivência em solo rico e úmido (oito meses) e em matéria orgânica, não há evidências de que ele possa se multiplicar no solo (AUGUSTINE; RENSHAW, 1986).

De modo geral, a infecção em humanos é rara e é reconhecida como doença ocupacional (PEEL et al., 1997), particularmente quando ovinos e caprinos infectados são esfolados manualmente. A forma mais comum de transmissão da infecção é através da perfuração das mãos e braços com facas contaminadas, levando a quadro predominante de linfadenite axilar. Este mesmo quadro também é comum em açougueiros, trabalhadores de matadouros e manipuladores de tosquiadeiras (PEEL et al., 1997). A doença tem sido disseminada em humanos que consomem leite cru proveniente de ovelhas e cabras infectadas. Precauções sempre devem ser tomadas para prevenir o contato com o exsudato purulento ou com objetos contaminados e o leite deve sempre ser adequadamente pasteurizado para o consumo humano (KIMBERLING, 2002).

Uma vez estabelecida no rebanho, a doença se torna endêmica, tornando problemática sua erradicação (WILLIAMSON, 2001). O uso de antimicrobianos para controlar a doença não representa estratégia viável, visto que os fármacos não penetram na cápsula dos abscessos (ALVES; PINHEIRO, 1997; WILLIAMSON, 2001). A eficiência das vacinas existentes é limitada (DORELLA et al., 2006; PATON et al., 2003). Assim, o controle da LC deve ser realizado primariamente por medidas profiláticas, incluindo, medidas de manejo, como limpeza e desinfecção das instalações em geral, lâminas de tosquia, objetos perfuro-cortantes, depois do contato com animais (BAIRD, 2006; BROWN et al., 1987), evitando a entrada do agente etiológico e sua disseminação no rebanho.

O diagnóstico clínico, fundamentado na identificação e palpação de ovinos com abscessos nos linfonodos superficiais, verificando a existência de hipertrofia e supuração de abscessos é altamente sugestivo da doença, principalmente se vários animais do grupo estão afetados (BAIRD, FONTAINE, 2007). Cuidados especiais devem ser tomados, pois alguns sinais podem confundir este diagnóstico, tanto na forma superficial como na visceral. No entanto, todo e qualquer aumento do linfonodo deve ser investigado.

Considerado como padrão-ouro para LC, o diagnóstico bacteriológico é

baseado no isolamento e identificação bioquímica do agente contido no material purulento dos abscessos. O diagnóstico bacteriológico a partir de material drenado dos abscessos é definitivo, permanecendo como um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico *in vivo*. Este método distingue *C. pseudotuberculosis* de outros organismos que produzem lesões abscedativas, como o *Arconobacterium (Actinomyces) pyogenes* (WILLIANSO, 2001).

Os dois métodos principais de diagnóstico microbiológico são: o teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peters, iniciais dos nomes dos seus inventores) e a caracterização bioquímica (BAIRD; FONTAINE, 2007). Para o teste de CAMP, os microrganismos isolados de material drenado do abscesso são incubados em ágar-sangue com *Rhodococcus equi* e *Staphylococcus aureus*. *R. equi* e *C. pseudotuberculosis* interagem formando hemólise sinérgica com formação de “ponta de seta” no ágar-sangue, devido a uma interação entre a PLD e Fosfolipase C de *R. equi*. Já a interação com *S. aureus* causa inibição da hemólise por ação da beta-lisina produzida por esse microrganismo. Esse teste, porém, tem a limitação de não diferenciar *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans*, que também produz a PLD. Para isto, devemos diferenciar este dois microrganismos por teste de fermentação de carboidratos.

A caracterização bioquímica pode ser feita usando os métodos tradicionais ou pelo uso de “kits” comerciais como o API Coryne (bioMérieux, Inc.). Em ambos os casos, a caracterização é realizada através da avaliação da habilidade da bactéria em utilizar ou não o substrato. *C. pseudotuberculosis* é identificado por provas bioquímicas, tais como: produção de catalase, produção de urease, redução de nitrato a nitrito e fermentação de carboidratos, sem produção de gás como: maltose, manose, glicose, galactose (variável). Não fermenta lactose (MUCKLE; GYLES, 1982; SONGER et al., 1988), não possui atividade proteolítica, não hidrolisa a gelatina nem digere a caseína (QUINN, et al., 1994). Songer et al. (1988) esclarecem que as diferenças entre os resultados de algumas provas bioquímicas, principalmente de fermentação de carboidratos, podem ocorrer, em virtude dos diferentes métodos usados por

diversos autores. Sugerem, ainda, que estas diferenças podem ser atribuídas à existência de variedades entre as linhagens estudadas.

Embora o isolamento e a caracterização de *C. pseudotuberculosis* continuem sendo “padrão-ouro” para o diagnóstico da LC, esses métodos possuem limitações devido a extensiva variabilidade nas características bioquímicas de diferentes isolados (MUCKLE, GYLES, 1982; SONGER et al., 1988). Ademais, demandam tempo ou, muitas vezes, são inviáveis, pois muitos animais possuem apenas abscessos internos, ou abscessos externos já supurados e fibrosados, contendo poucas bactérias viáveis (BAIRD; FONTAINE, 2007).

Como alternativa ao diagnóstico bacteriológico, podemos recorrer ao diagnóstico citológico (RIBEIRO et al., 2001). O diagnóstico citológico, utilizando-se da citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo com as colorações de Giemsa ou Panótico Rápido (*Diff Quik*), consagrada para a realização da citomorfologia (GETACHEW; TESFAHUNEGN, 1999), aliada a coloração de Gram, que é amplamente utilizada na rotina para coloração de bactérias em esfregaços (QUINN et al., 2005), juntas possibilitam o diagnóstico presuntivo do agente, antes da abscedação dos linfonodos acometidos, através da identificação morfotintorial de *C. pseudotuberculosis* (RIBEIRO et al., 2001).

A CAAF de linfonodos é uma técnica relativamente simples que fornece resultado rápido e acurado em curto espaço de tempo (COWELL et al., 2003; HIRSCHBERGER, 1994; MILLS, 1989). Pode ser indicada como método de diagnóstico diferencial e de eleição em países com recursos limitados (WRIGHT et al., 2008), pela sua viabilidade, praticidade e facilidade na obtenção e leitura das amostras, podendo ser realizado rotineiramente em centros de diagnósticos, a campo ou à admissão de animais em eventos. Este método é econômico e menos invasivo que uma biópsia cirúrgica, além de ter especificidade comprovada (MANITCHOTPISIT et al., 1999; WRIGHT et al., 2008). Adicionalmente, as amostras aspiradas com conteúdo representativo de material provenientes de linfonodos, também permitem execução de diferentes técnicas de PCR (MANITCHOTPISIT et al., 1999; GOEL et al., 2006;

VAGO et al., 2000) e material ideal para realização de cultivo (ALJAFARI et al., 2004; WRIGHT et al., 2008).

Porém, entre os fatores limitantes desta técnica é o tempo de armazenamento superior a um ano, se o material coletado for usado para diagnóstico molecular retrospectivo utilizando a amplificação de ácido nucléico (GOEL et al., 2006), a obtenção de falsos negativos e falsos positivos (MANITCHOTPISIT et al., 1999), taxa variável de positividade dependente da qualidade do material aspirado, e por fim, o diagnóstico através da identificação citológica é presuntivo (RIBEIRO et al., 2001) necessitando de um teste confirmatório.

É necessário ressaltar a proporção de ovinos infectados que apresentam somente abscessos internos e a necessidade do diagnóstico da doença na fase subclínica. Por essa razão diversas pesquisas com testes sorológicos vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos para o diagnóstico da LC, tais como teste da inibição da hemólise (BROWN et al., 1987; KURIA et al., 2001), imunodifusão (BURRELL, 1981), teste de fixação do complemento (SHIGIDI, 1979), ensaio de microaglutinação (MENZIES; MUCKLE, 1989), ensaio imunoenzimático (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assays) (CARMINATI et al., 2003; DERCKSEN et al., 2000; SCHREUDER et al., 1994; ter LAAK et al., 1992). Particularmente o ELISA provou ser método versátil nos programas de controle e erradicação em rebanhos (DERCKSEN et al., 2000).

As limitações dos testes sorológicos incluem: inability para distinguir entre animais previamente expostos daqueles que hospedam silenciosamente o patógeno (ÇENTIKAYA et al., 2002; WILLIAMSON, 2001), menor especificidade quando comparado com o cultivo bacteriano, presença de anticorpos maternos que geram resultados falso-positivos. Os resultados são dependentes da resposta imune do hospedeiro ao patógeno, e isso implica em um período de “janela imunológica” que varia com a idade, com a rota e extensão da exposição a *C. pseudotuberculosis* e com o intervalo entre a exposição e diagnóstico.

Devido aos resultados divergentes obtidos com testes sorológicos

desenvolvidos até então (DERCKSEN et al., 2000; DORELLA et al., 2006; MENZIES et al., 2004; WILLIAMSON, 2001) e em razão da necessidade de diferenciar *C. pseudotuberculosis* de um outro agente patogênico envolvido com a sintomatologia de LC, tais como *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella multocida*, *S. aureus*, *Streptococcus sp.* e *Nocardia sp.*, o isolamento desta bactéria diretamente do material purulento de linfonodos permanece como um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico (ALVES; PINHEIRO, 1997; RIBEIRO et al., 2001). O desenvolvimento de método rápido e específico para detectar *C. pseudotuberculosis*, por métodos moleculares, representa grande perspectiva no diagnóstico.

Çetinkaya et al. (2002) propuseram teste baseado na PCR para identificar isolados de *C. pseudotuberculosis* pela amplificação parcial da seqüência do gene do RNA ribossômico 16S (16S rDNA). Apesar da reação cruzada com *C. ulcerans*, foi observado que a PCR usada neste estudo pode ser aplicada com sucesso no diagnóstico da LC em caprinos e ovinos, constituindo-se em alternativa para o método convencional, devido a suas vantagens como especificidade e rapidez. Como limitação, o método não exclui o cultivo bacteriano do material extraído dos abscessos, o que implica na demora do diagnóstico, além de restringir o mesmo à fase clínica da LC.

Pacheco et al (2007) desenvolveram ensaio de PCR multiplex com o objetivo de amplificar simultaneamente três genes específicos de *C. pseudotuberculosis* na mesma reação: 16S rDNA (RNA ribossômico 16S), *rpoB* (responsável pela síntese da subunidade beta da RNA polimerase), e *pld* (exotoxina fosfolipase D). Este ensaio foi capaz de detectar o patógeno diretamente de amostras clínicas (aspirado dos abscessos), sem a necessidade de cultivar os microrganismos. Porém o limite de detecção foi de  $10^3$  U.F.C., limitando o teste a amostras em fase clínica da infecção.

Tendo em vista a necessidade do diagnóstico rápido, precoce e viável para a Linfadenite Caseosa Ovina, em casos subclínicos e/ou exclusivamente internos, o presente estudo teve por objetivos:

- Objetivo geral:

Comparar a sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico sorológico, citológico, bacteriológico e molecular para LC.

Objetivos epecíficos:

Avaliar se o material proveniente de punção de biópsia aspirativa por agulha fina de linfonodo pode ser submetido a outras técnicas de diagnóstico para LC.

Padronizar protocolo para extração de DNA de *C. pseudotuberculosis* de amostras clínicas provenientes de punção de biópsia aspirativa de linfonodo de ovinos sintomáticos e assintomáticos.

Verificar se através da amplificação individual do gene *pld* de *C. pseudotuberculosis* é possível detectar essa bactéria nas amostras clínicas.

## REFERÊNCIAS

- ALJAFARI, A. S.; KHALIL, E. A.; ELSIDDIG, K. E. et al. Diagnosis of tuberculous lymphadenitis by FNAC, microbiological methods and PCR: a comparative study. *Cytopathology*. v. 15, n. 1, p. 44-8, 2004.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite Caseosa – Recomendações e Medidas Profiláticas. *Agropecu. Catarin*. v. 13, p. 12-14, 2002.
- ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P. et al. Prevalence of and carcass condensation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.*, v. 59, p. 67-81, 2003.
- AUGUSTINE, J. L.; RENSHAW, H. W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudates on common barnyard fomites. *Am. J. Vet. Res.* v. 47, p. 713-715, 1986.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* v. 137, p. 179-210, 2007.
- BATEY, R. G. Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lamb slaughtered at Western Australian abattoir. *Am. J. Vet. Res.* v. 47, n. 2, p. 482-485, 1986.
- BRASIL. Lei 1283, 18 dez. 1950 (regulamentada pelo decreto 30691, 29 mar. 1952). Dispõe sobre os critérios de inspeção industrial e sanitária de carnes e derivados. *Diário Oficial*, Brasília, 19 dez. 1950.
- BROWN, C. C.; OLEANDER, H. J. ALVES, S. F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brasil. *Can. J. Vet. Res.* v. 51, p. 46-49, 1987.

BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. *Aust. Vet. J.* v. 57, p. 105-110, 1980.

CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L. F. et al. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *R. Ci. Méd. Biol.* v. 2, p. 88-93, 2003.

CHAPLIN, P. J.; DE ROSE, R.; BOYLE, J. S.; et al. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* v. 67, p. 6434–6438, 1999.

COWELL, R. L.; DORSEY, K. E.; MEINKOTH, J. H. Lymph node cytology. *Vet Clin. North Am. Small Anim. Pract.* v. 33, n. 1, p. 47-67, 2003.

ÇETINKAYA, B.; KARAHANA, M.; ATIL, E. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet. Microbiol.* v. 2359, p. 1-9, 2002.

DAVIS, E. W. In: SMITH, B. P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Editora Manole LTDA, 1993. v. 2, cap. 33, p.1111 – 1117.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOORENB, T. et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* v. 75, p. 167-175, 2000.

DOHERR, M. G.; CARPENTER, T. E.; WILSON, W. D. et al. Application and evaluation of a mailed questionnaire for an epidemiologic study of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses. *Prev. Vet. Med.* v. 35, p. 241-253, 1998.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; OLIVEIRA, S. C. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.*, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.

FILHO, A. S. V. Regulamento FEINCO 2008. Disponível em: [http://www.aspaco.org.br/regulamentos/REGULAMENTO\\_FEINCO\\_2008.pdf](http://www.aspaco.org.br/regulamentos/REGULAMENTO_FEINCO_2008.pdf)  
Acesso em 18 de novembro 2008.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. *Small Rumin. Res.* v. 76, p. 42–48, 2008.

GASPAROTO, S. W. *Caseous Lymphadenitis*. Goat Rancher Magazine. Jul, 1996.

GETACHEW, A.; TESFAHUNEGN, Z. Is fine needle aspiration cytology a useful tool for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis? *East Afr. Med. J.* v. 76, n. 5, p. 260-3, 1999.

GLENN, J. S. *Caseous lymphadenitis (cla, boils, abscesses) in goats – with spllemental comments about sheep. What do you do after the diagnosis is confirmed?* Extension Veterinarian, UC Davis. 8 p. jan, 2003.

GOEL, M. M.; BUDHWAR, P.; GOEL, M. et al. Nucleic acid amplification of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from archival fine needle aspiration smear scrapings vs. fresh fine needle aspirates of tuberculous lymphadenitis. *Acta Cytol.* v. 50, n. 4, p. 393-7, 2006.

GOUVEIA, A. M. G. *Manejo geral e sanitário de ovinos e caprinos aptidão corte*. In: Encontro de caprino – ovinocultores de corte da Bahia, 4, 2004, Salvador. Anais... Cruz das Almas: Nova Civilização, 2004. p.37-45.

HIRSCHBERGER, J. Lymph node cytology. *Tierarztl. Prax.* v. 22, n. 6, p. 592-5, 1994.

HOMMEZ, J.; DEVRIESE, L. A.; VANEECHOUTTE, M. et al. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* v. 37, p. 954–957, 1999.

JOLLY, R. D. Some observations on surfave lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. *J. Appl. Bacteriol.* v. 29, p. 189-196, 1966.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*. São Paulo: Editora Manole, 2000. 6 ed. cap.1, 10, 22. p. 17; 490-491; 1044-1046.

KIMBERLING, C. V. *CLA in sheep and goats*. Fort Collings: Colorado State University – College of. Veterynary Medicine & Biomedical Sciences. out. 2002.

KURIA, J. K. N.; MBUTHIA, P. G.; KANG'ETHE, E. K. et al. Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Vet. Res. Commun.* v. 25, p. 89-97, 2001.

LANGENEGGER, H.; LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 11, n.1/2, p. 1-7, 1991.

MAGALHÃES, H. H. Diagnóstico de situação da caprinocultura em algumas microrregiões dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro – Resultados Preliminares. *Cabras e Bodes*, v.1, p.5-7, 1985.

MANITCHOTPISIT, B.; KUNACHAK, S.; KULAPRADITHAROM, B. et al. Combined use of fine needle aspiration cytology and polymerase chain reaction in the diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis. *J. Med. Assoc. Thai.* v. 82, n. 4, p. 363-8, 1999.

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. *Can. J. Vet. Res.* v. 53, p. 313–318, 1989.

MENZIES, P. I. *Caseous lymphadenitis of sheep and goats*. The Merck Vet Manual, 8 ed. Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., 1998, p. 55-56.

MENZIES, P. I.; HWANG, Y. T.; PRESCOTT, J. F. Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for

diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.*, v. 100, p. 129-137, 2004.

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

MILLS, J. N. Lymph node cytology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* v. 19, n. 4, p. 697-717, 1989.

MOURA COSTA, M. D.; CÂMARA, J. Q.; ROCHA, J. V. N. et al. Linfadenite caseosa dos caprinos no estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. *B. IBB Salvador.* v. 12, n. 1, p. 1-7, 1973.

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

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. (1974) apud BLOOD, D. C., RADOSTITS, O. M. *Clínica Veterinária*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 16. p.486.

NOGUEIRA, A.H.C.; CURCI, V.C.L.M.; FERRARI, C.I.L. et al. Aspectos epidemiológicos da ovinocultura na região de Araçatuba – dados preliminares. *Biológico*, São Paulo, v.68, p.33, Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68\\_supl\\_raib/033.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/033.pdf)>. Acesso em 10 out. 2007.

O'REILLY, K. M.; GREEN, L. E.; MALONE, F. E. et al. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. *Prev. Vet. Med.* v. 83, p. 242–259, 2008.

PACHECO, L. G.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L.P. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* v. 56, n. 4, p. 480-486, 2007.

PATON, M. The epidemiology of caseous lymphadenitis in Australia and observations on other production systems. In: Proceeding of the 101<sup>st</sup> Meeting of US Animal Health Association, Louisville, KY, p. 18-24, 1997.

PATON, M.W.; WALKER, S. B.; ROSE, I. R. et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.*, v. 81, p. 91-95, 2003.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v. 96, p. 129–139, 2003.

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* v. 24, p. 185–191, 1997.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 52, n.5., p. 1-14, 2000.

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

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. et al. *Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. Ed. Guanabara Koogan, 9 ed., 1937 p., 2002.

RIBEIRO, M. G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A. C. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 23-28, 2001.

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J. A. H.; PEREIRA FILHO, M. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 10, n. 2, p. 23-24, 1998.

RIET-CORREA, F. SCHILD, A.; MENDEZ, M. C. *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. São Paulo: Varela, 2001. v. 1. p. 284-287.

SCHREUDER, B. E. C.; ter LAAK, E. A.; GRIESEN, H. W. An outbreak of caseous lymphadenitis in dairy goats: first report of the disease in The Netherlands. *Vet. Q.* v. 8, n. 1, p. 61-67, 1986.

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. *Vet. Rec.* v. 135, p. 174-176, 1994.

SHIGIDI, M. T. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Br. Vet. J.* v. 135, p. 172-177, 1979.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. Subcutaneous swellings. *Goat Medicine*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994, p.45-63.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M. et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* v. 49, p. 223-226, 1988.

SOUZA NETO, J. Características gerais da caprinocultura leiteira no Estado de Pernambuco. Sobral, EMBRAPA-CNPC, 1987. (EMBRAPA-CNPC. Boletim de Pesquisa n.4).

STANFORD, K.; BROGDEN, K. A.; McCLELLAND, L. A. et al. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. Vet. Res.* v. 62, p. 38–43, 1998.

ter LAAK, E. A.; BOSCH, J.; BIJL, G. C. et al Double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.* v. 53, p. 1125–1132, 1992.

TINÔCO, A. L. A. Diagnóstico de situação da ovino/caprinocultura em três municípios do sertão baiano – Euclides da Cunha, Quijingue, Monte Santo – Bahia, 1981/1982. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1983. 13p. (Seminário).

VAGO, L.; ZERBI, P.; CALDARELLI-STEFANO, R. et al. Polymerase chain reaction for Mycobacterium tuberculosis complex DNA - Use on negative archival Ziehl-Neelsen cytologic samples. *Acta Cytol*, v. 44, n. 6, p. 1023-1028, 2000.

WALKER, B. *Cheesy gland caseous lymphadenitis in sheep*. 2. ed., Agfact A3. 9.21– New South Wales Department of Agriculture, p. 1-4, 1996.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v. 17, p. 359-371, 2001.

WRIGHT, C. A.; VAN DER BURG, M.; GEIGER, D.; et al. Diagnosing mycobacterial lymphadenitis in children using fine needle aspiration biopsy: cytomorphology, ZN staining and autofluorescence -- making more of less. *Diagn Cytopathol.* v. 36, n. 4, p. 245-51, 2008.

YERUHAM, I.; FRIEDMAN, S.; PERL, S. et al.. A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in dairy cattle herd. *Vet. Dermatol.* v. 15, p. 315-320, 2004.

## **ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS**

**RESUMO** – A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença crônica contagiosa, causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* que acomete ovinos e caprinos acarretando perdas econômicas importantes. O diagnóstico é baseado no cultivo e identificação bioquímica. No entanto, a fase subclínica e/ou visceral requerem métodos alternativos para detecção. Apesar dos métodos de diagnósticos já existentes, raramente pesquisas investigaram a utilização de material proveniente de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodo de ovinos aplicadas a outras técnicas de diagnóstico. O presente trabalho objetivou avaliar a sensibilidade e especificidade de métodos de diagnóstico para LC em ovinos sintomáticos (n=26) e assintomáticos (n=129), utilizando material colhido através de PAAF de linfonodo. As técnicas de diagnóstico foram baseadas na amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene alvo *p/d* (fosfolipase D), no cultivo bacteriano e identificação bioquímica e citodiagnóstico. O teste sorológico por ELISA indireto foi adaptado para a espécie ovina. As amostras clínicas recuperadas da PAAF forneceram material adequado e suficiente para realização dos testes propostos, implementando a rotina do diagnóstico para LC. Dentre os métodos testados, o ELISA e a PCR foram os que apresentaram maior sensibilidade (92%). A maior especificidade foi verificada no cultivo bacteriano (98%), seguido do exame citológico (94%).

**Palavras-Chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, biopsia por agulha, ELISA, citologia, técnicas bacteriológicas, reação em cadeia da polimerase.

## I. INTRODUÇÃO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente causador da Linfadenite Caseosa (LC), que acomete particularmente pequenos ruminantes (BROWN et al., 1987), com infecções ocasionais em bovinos, eqüinos, alpacas e humanos (BRAGA et al., 2006; DOHERR et al., 1998; HOMMEZ et al., 1999; PEEL et al., 1997; YEURHAM et al., 1997).

A LC possui evolução crônica, de natureza supurativa, caracterizada pelo desenvolvimento de abscessos encapsulados no tecido subcutâneo, linfonodos e órgãos internos de ovinos e caprinos (WILLIAMSON, 2001). A doença provoca grande prejuízo aos criadores, representados pela diminuição na produção de leite, carne e lã, desvalorização da pele devido às cicatrizes, condenação de carcaças, morbidade e mortalidade (PATON et al., 1988; RIZVI et al., 1997). Os animais portadores de LC são impedidos de participar de feiras e exposições de raça no estado de São Paulo, como também de campeonatos de ganho de peso realizados pela Associação Paulista de Criadores de Ovinos (FILHO, 2008).

A doença comumente é introduzida nos rebanhos por animais assintomáticos provenientes de criatórios infectados (SCHREUDER et al., 1986). Uma vez estabelecida no rebanho, a erradicação é problemática (WILLIAMSON, 2001). Para o sucesso do controle da LC, faz-se necessário identificar e isolar os animais infectados dos saudáveis (BAIRD; FONTAINE, 2007; WILLIAMSON, 2001). Nos ovinos, abscessos localizados nos linfonodos superficiais são sugestivos da doença, principalmente quando vários animais do grupo estão igualmente afetados (BAIRD; FONTAINE, 2007). O diagnóstico da LC pode ser baseado nos sinais clínicos, no isolamento e identificação bioquímica do agente contido no material purulento dos abscessos. Contudo, as principais limitações do diagnóstico bacteriológico, considerado padrão ouro, é a grande variabilidade nas características bioquímicas de diferentes isolados

(MUCKLE; GYLES, 1982; SONGER et al., 1988), além do tempo, e da impossibilidade de detectar infecções subclínicas. Ressaltando ainda que na forma visceral, os ovinos infectados apresentam abscessos internos, freqüentemente no pulmão e linfonodo mediastinal, inviabilizando o diagnóstico, optando-se desta forma pelos testes sorológicos (BAIRD; FONTAINE, 2007).

O diagnóstico da doença em ovinos na fase subclínica e/ou a identificação de animais com abscessos internos requerem métodos de diagnóstico alternativos. Por essa razão, pesquisas com testes sorológicos vêm sendo desenvolvidas para o diagnóstico da LC, incluindo inibição da hemólise sinérgica (BROWN et al., 1986), imunodifusão (BURRELL, 1980), fixação do complemento (SHIGIDI, 1979), microaglutinação (MENZIES; MUCKLE, 1989), ELISA (*enzyme linked immunosorbent assays*) (CARMINATI et al., 2003; DERCKSEN et al., 2000; SCHREUDER et al., 1994; ter LAAK et al., 1992). Ainda que a maioria dos testes demonstrem baixa sensibilidade ou especificidade, particularmente o ELISA provou ser um método versátil nos programas de controle e erradicação da doença (DERCKSEN et al., 2000). Entretanto, é necessária a disponibilidade de teste confirmatório altamente sensível e específico (DERCKSEN et al., 2000; WILLIAMSON, 2001), que ainda é desempenhado pela cultura bacteriológica, seguida de identificação bioquímica de isolados.

Como alternativas ao diagnóstico bacteriológico e à sorologia, tem-se empregado o diagnóstico citológico (RIBEIRO et al., 2001), bem como métodos moleculares (ÇENTIKAYA et al., 2002; PACHECO et al., 2006).

O diagnóstico citológico, por meio da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodo submetida às colorações de Gram e panótico rápido, possibilita o diagnóstico presuntivo do agente, antes da abscedação dos linfonodos acometidos, mediante a identificação morfotintorial de *C. pseudotuberculosis* (RIBEIRO et al., 2001). Adicionalmente, as amostras aspiradas, com conteúdo representativo de material provenientes de linfonodos, permitem análises citomorfológicas (WRIGHT et al., 2008),

identificação do organismo em esfregaços arquivados ou frescos, corados por diferentes técnicas (GANGANE et al.; 2008; GETACHEW; TESFAHUNEGN, 1999; GUPTA et al., 1993), execução de diferentes técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) (GOEL et al., 2006; MANITCHOTPISIT et al., 1999; VAGO et al., 2000) e material ideal para realização de cultivo (ALJAFARI et al., 2004; WRIGHT et al., 2008). Porém, o diagnóstico utilizando a identificação citológica é presuntivo ou de triagem (RIBEIRO et al., 2001), necessitando de teste confirmatório. Uma das limitações da PAAF é a falta de material apropriado para cultivo bacteriano, especialmente nos casos em que são negativos na citologia (BEZABIH et al., 2002).

O diagnóstico molecular, utilizando a PCR, possibilita a identificação de isolados de *C. pseudotuberculosis* através da amplificação parcial do gene do RNA ribossômico 16S (16S rDNA), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase) e *pld* (exotoxina fosfolipase D) com o cultivo bacteriano prévio (ÇENTIKAYA et al., 2002) ou direto de amostras clínicas (PACHECO et al., 2007). A amplificação de um ou múltiplos *loci* numa mesma PCR é uma estratégia amplamente utilizada para detectar patógenos. Este procedimento apresenta uma série de vantagens, incluindo a identificação altamente específica do microrganismo, economia de tempo e de reagentes (HALBERT et al., 2005).

Apesar da vasta opção de métodos de diagnóstico existentes, poucos estudos utilizaram a PAAF de linfonodo de ovinos para avaliar a viabilidade do material aspirado e execução de outras técnicas de diagnóstico para LC. O presente estudo avaliou a sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico citológico, bacteriológico e molecular, de espécimes provenientes de PAAF de linfonodos, bem como o teste sorológico para o diagnóstico da LC em ovinos sintomáticos e assintomáticos.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 1 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados 455 ovinos, provenientes de nove propriedades localizadas na região noroeste do estado de São Paulo (Birigüi, Nova Castilho, Glicério, Buritama, Araçatuba e distritos: Prata, Jacutinga, Água Limpa) no período de junho a julho de 2007. Para análise comparativa pareada dos testes diagnósticos, foram examinadas 165 amostras.

O critério de inclusão para a utilização dos animais foi baseado no exame clínico realizado no momento da colheita do material, independente de raça, sexo e tipo de criação. Os ovinos que apresentavam aumento de volume de linfonodo superficial ou abscessos cutâneos eram considerados sintomáticos (n=36) (Figura 1).

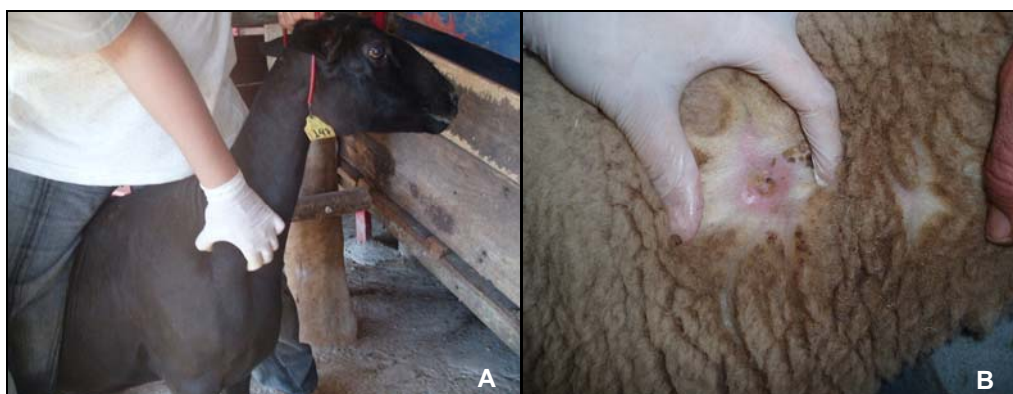


Figura 1 – A) Ovino com aumento de volume no linfonodo pré-escapular direito. B) Abscesso cutâneo na região escapular direita.

Os animais sem sinais clínicos e/ou que conviviam no mesmo ambiente (pasto/ piquete ou baia) com os sintomáticos eram considerados assintomáticos (n=129) (Figura 2).

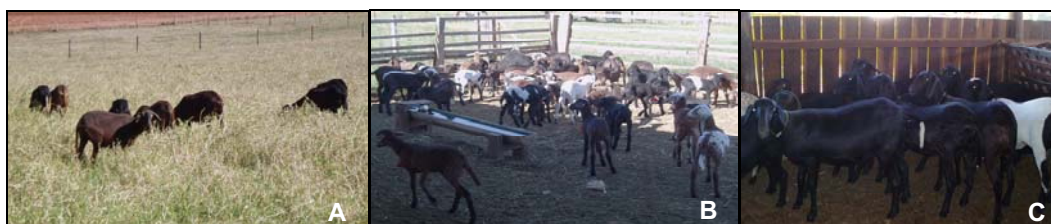


Figura 2 – Animais criados a pasto (A), em piquete (B) e baia (C).

O linfonodo superficial de escolha para a punção aspirativa foi o pré-escapular direito (Figura 3), porém outros superficiais (pré-escapular esquerdo, crural, poplíteo e mamário) (Figura 4) e lesões abscedativas (na região da cabeça, cervical ventral e dorsal) foram aspiradas quando sugestivas de LC (Figura 5).

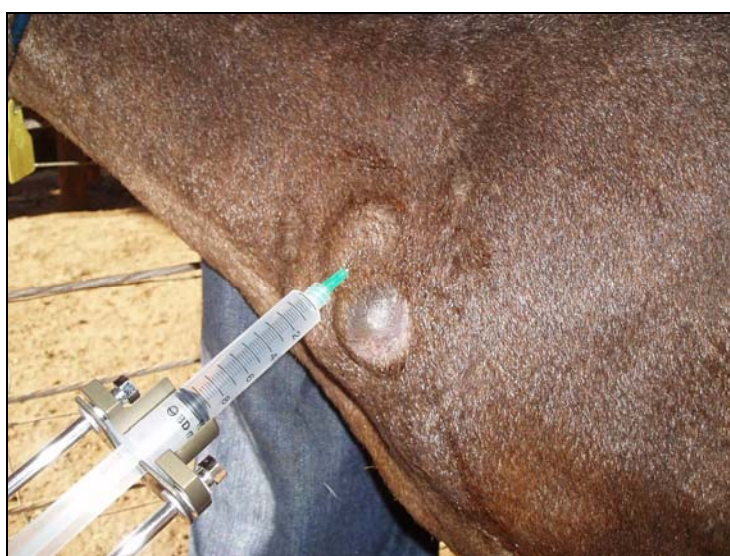


Figura 3 – Linfonodo superficial de escolha: pré-escapular direito.



Figura 4 – Linfonodos superficiais com aumento de volume: pré-escapular esquerdo (A), crural esquerdo (B), poplíteo direito (C) e mamário esquerdo (D).



Figura 5 - Lesão abscedativa na região da cabeça (A) que evidenciou conteúdo purulento, denso sugestivo de LC durante a PAAF (B), apresentando coloração branco-amarelada na abertura da lesão (C). Após a retirada do conteúdo pode-se observar a espessura da cápsula.

Para a colheita do soro utilizou-se o sistema de coleta a vácuo, com agulha hipodérmica 21 G (25 mm x 8/10). Após a retração do coágulo sangüíneo, os soros foram centrifugados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da sua utilização.

Para a punção aspirativa foi utilizada agulha hipodérmica (30 x 7 mm) e, seringa de 10 ml, acoplada ao citoaspirador.

## 2 ELISA

Nos soros dos 165 ovinos, o teste de ELISA indireto foi realizado baseando-se na identificação de imunoglobulinas totais específicas contra antígenos secretados de cultura de 48 horas de *C. pseudotuberculosis*. O protocolo do ELISA indireto foi realizado segundo Carminati et al. (2003), modificado para a espécie ovina. As placas de poliestireno de fundo chato com 96 poços (Maxisorp® - Nunc) foram sensibilizadas com 100 µl do sobrenadante da cultura de 48 horas de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth* - Acumedia), diluído a 1:100, em tampão carbonato bicarbonato a 0,05M, pH 9,6, incubadas a 4°C por 12 horas. Após duas lavagens com PBS contendo 0,1% de Tween-20 realizou-se o bloqueio, com 200 µl/poço de PBS-T20, contendo 5% de leite desnatado, durante duas horas. Em seguida, foram incubadas (50 µl/poço) com soros testes diluídos a 1:100 em PBS-T20 contendo 1% de leite desnatado durante 1 hora. Após cinco lavagens em PBS-T20, foi adicionado às placas 50 µl de imunoglobulina de coelho anti-imunoglobulina de ovino, conjugada a peroxidase (Dako®), diluída a 1:10.000 em PBS-T20. As placas foram incubadas a 37° C por 45 minutos e, em seguida, lavadas 5 vezes em PBS-T20 e incubadas com 50 µl/poço de TMB (tetramethylbenzidine) por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de 25 µl de ácido sulfúrico (2N) e a leitura realizada em leitor de ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550), com filtro de 490 nm. As amostras foram testadas em duplicata com controles positivo e negativo apropriados. O ponto de corte do ensaio foi calculado pela média dos resultados de 45 soros ovinos de áreas não endêmicas para LC, somada a três desvios padrão, para confirmar o status de soropositividade. A Densidade Óptica (DO) considerada como ponto de corte foi 0,32 e os valores para controle positivo, negativo e branco foram 1,38, 0,15, 0,05, respectivamente.

### 3 Citologia Aspirativa por Agulha Fina (CAAF)

O material aspirado dos 165 linfonodos foi imediatamente distendido em lâminas de vidro devidamente identificadas, as quais foram secas ao ar e submetidas às colorações de panótico rápido e Gram, utilizando-se kits comerciais (Newprov<sup>®</sup>), segundo recomendações do fabricante. A esfregaços corados foram classificados em 4 grupos: 1) positivo quando exibiam “fundo sujo”, com evidências de restos celulares, sugestivo de necrose e presença de coco-bacilos com características morfológicas de *C. pseudotuberculosis* (Gram positivos, delicados, pleomórficos, em forma de letra chinesa) (Figura 6); 2) suspeito, quando exibiam, células gigantes, epitelióides ou macrófagos se agrupando, neutrófilos degenerados, fundo do esfregaço sujo, sugestivo de necrose (Figura 7); 3) negativo, quando exibiam reação linfocitória, edema, ausência de destruição celular e de forma bacteriana (Figura 8); 4) material insuficiente, quando exibiam predomínio de hemácias, células adiposas ou musculares.

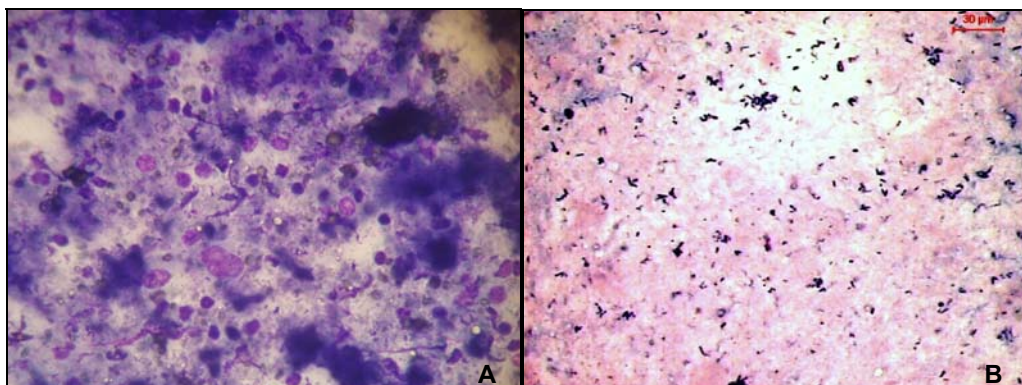


Figura 6 – Esfregaços positivos exibindo “fundo sujo”, com evidências de restos celulares, sugestivo de necrose (A) e presença de coco-bacilos Gram positivos delicados, pleomórficos, em forma de letra chinesa com características morfológicas de *C. pseudotuberculosis* (B) (obj. 100x).

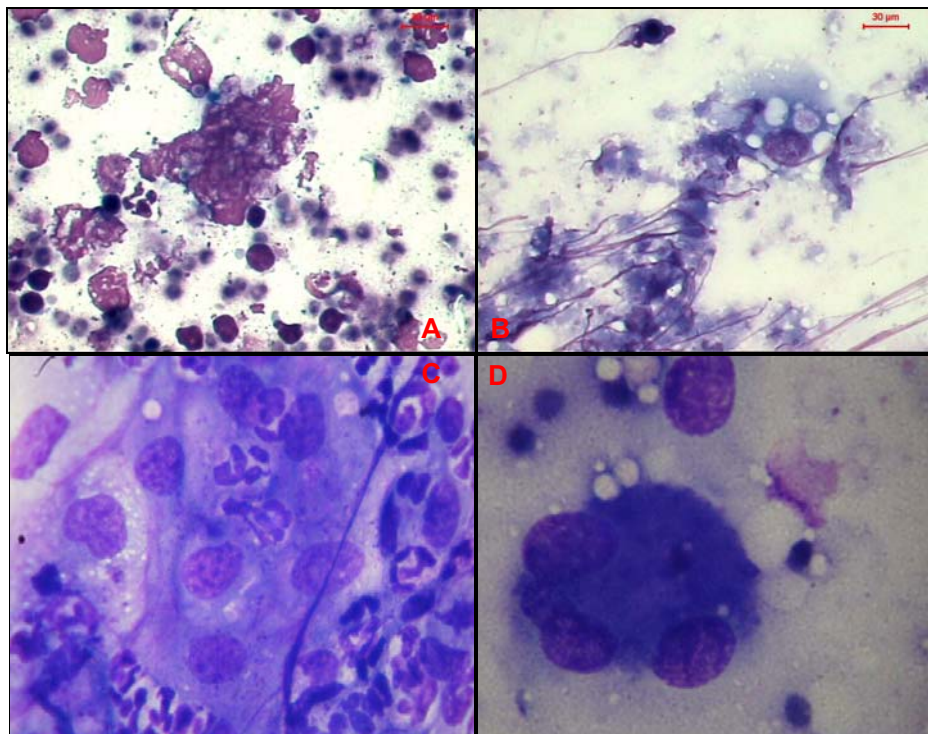


Figura 7 - Esfregaços com diagnóstico suspeito. A) Esfregaço com infiltrado supurativo a necrótico com debris celulares e fundo sujo. B). Macrófago bolhoso e necrose. C) Macrófago do tipo epitelióide no centro e neutrófilos ao redor. D) Célula gigante (Panóptico rápido, obj. 100x).

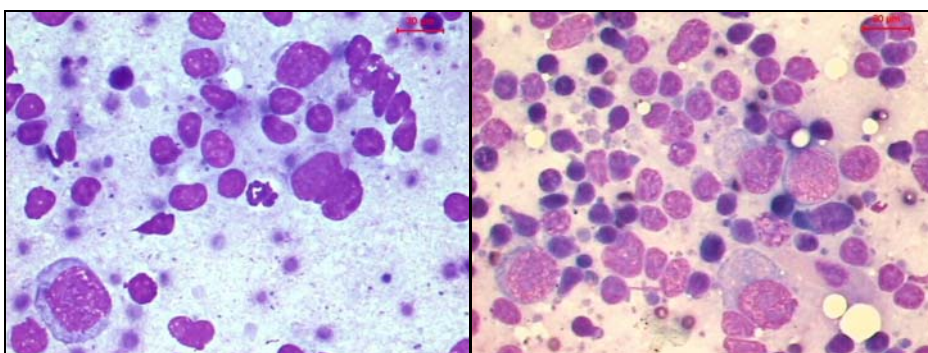


Figura 8 – Esfregaços com reação linfohistiocitária, edema, ausência de destruição celular e de forma bacteriana.

Para avaliar o exame citológico em tabelas 2 x 2, o resultado da análise microscópica das lâminas foi agrupado em positivo e os classificados como suspeito e negativo, reclassificados em negativos. Aqueles cujo material resultou insuficiente foram excluídos desta avaliação.

#### 4 Cultivo e Identificação Bioquímica

O material remanescente contido no conjunto agulha e seringa de cada amostra (n=165) foi lavado com 400 µl de água Milli-Q estéril em microtubos de 500 µl e alíquotas de 20 µl cultivadas em ágar BHI e ágar BHI chocolate (5% de sangue ovino) com 1% de solução de telurito de potássio. As amostras permaneceram por 48 horas a 37°C e as colônias com as características morfológicas de *C. pseudotuberculosis*, como, coloração branco-amarelada, foscas, secas, planas, de bordas irregulares, aspecto arenoso (Figura 9), e que no meio seletivo mantiveram as mesmas características, porém de coloração enegrecida, foram submetidas à coloração de Gram, avaliação bioquímica convencional e presença de fosfolipase D.



Figura 9 - Colônias características de *C. pseudotuberculosis*, crescimento de 48 horas em ágar BHI.

A habilidade da *C. pseudotuberculosis* em fermentar carboidratos foi avaliada no meio básico CTA (Cystine Tryptic Agar – BD) contendo 1% de

carboidratos desidratados, ou seja: glicose, sacarose, maltose, manose, manitol, xilose e ribose. Os isolados foram ainda avaliados para produção de catalase, de urease, redução de nitrato a nitrito e de fosfatase alcalina (40  $\mu\text{g/ml}$  de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato – BCIP - Sigma), além de motilidade e  $\text{H}_2\text{S}$ . Nos tubos contendo os carboidratos, caldo uréia, caldo nitrato e meio SIM foram inoculados uma alçada generosa de colônias com 48 horas crescidas em ágar BHI. Os tubos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  e observados em 24 e 48 horas. Os meios que se tornaram amarelos foram interpretados como positivos e os que se mantiveram rosa-avermelhado como negativo.

O teste da fosfatase alcalina foi realizado em placa de Petri, divididas em quadrados eqüidistantes, onde foram depositados 3  $\mu\text{l}$  de solução bacteriana como inóculo. A solução foi preparada com colônias bacterianas de 48 horas em 500  $\mu\text{l}$  de água Milli-Q ou estéril, homogeneizada, com turbidez maior ou igual ao fator mínimo do tubo 6 da escala de McFarland. Foi considerada reação positiva quando a colônia apresentava-se verde-azulada e negativa quando não houve mudança na cor da colônia.

A presença de fosfolipase D foi avaliada pelo teste da hemólise sinérgica com *R. equi*, resultando em CAMP Positivo e CAMP Reverso com *S. aureus* inoculado no centro. Os testes foram realizados em ágar BHI sangue ovino. A leitura do teste CAMP foi realizada em 48 e 72 horas (Figura 10).

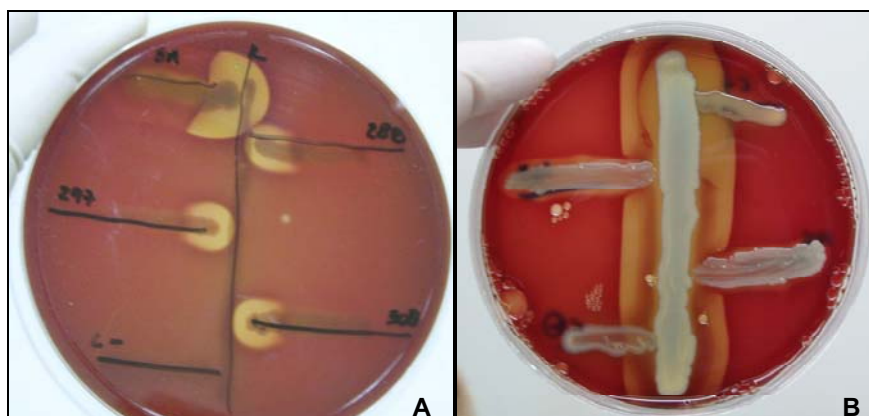


Figura 10 - Leitura do teste CAMP após 72 horas. A) CAMP Positivo. B) CAMP Reverso.

Para avaliar o cultivo e a identificação bioquímica de *C. pseudotuberculosis* em tabelas 2 x 2, foram consideradas positivas as linhagens que fermentaram glicose e manose; produziram urease; reduziram nitrato em nitrito; catalase positivas; não fermentaram sacarose, manitol e ribose; sem motilidade e ausência de H<sub>2</sub>S; positivas para o teste CAMP e CAMP reverso.

### **5 PCR (gene alvo *p/d*)**

A extração do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*, a partir do material aspirado por agulha fina de 165 linfonodos, foi realizada segundo o protocolo de Pacheco et al. (2007), com modificações. Em 300 µl do lavado (punção aspirativa de linfonodo em água Milli-Q) foram acrescentados 400 µl de solução de Tris-EDTA-lisozima (Tris-HCl (10 mM); EDTA (10 mM); NaCl (300 mM); lisozima (10 mg/ml), em um microtubo de 2 ml. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 1 hora, adicionado 5 µl de proteinase K (20 mg/ml) a cada amostra e incubadas em banho-maria a 56°C por 1 hora. Após o tempo de incubação, foram acrescentados 5 µl de sarcosil 30% (N-Lauroylsarcosine sodium salt), seguido de agitação por 15 min. e incubadas em banho-maria a 65°C por 5 min. Após incubação a 4°C por 5 min., o DNA genômico extraído foi purificado e precipitado com o uso de protocolo padrão de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989). Ao final, a fase superior de cada amostra foi transferida para novo microtubo, visando a precipitação do DNA genômico. Álcool etílico absoluto foi adicionado numa quantidade equivalente a duas vezes o volume da amostra. Acrescentou-se solução de acetato de sódio (3M) equivalente a 10% do volume da amostra, e solução de glicogênio (20 mg/ml) equivalente a 1% do volume total. O DNA foi precipitado *over night* a -20°C. Após centrifugação a 13.000 rpm por 15 min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol a 70%

gelado. Após a centrifugação a 13.000 rpm por 20 min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a 50°C por cerca de 40 min. Finalmente, o DNA foi ressuscitado em 20 µl de água Milli-Q estéril. Para verificar a qualidade da extração e quantificá-la visualmente, todas as amostras de DNA extraídas foram submetidas à corrida eletroforética, utilizando 2 µl do DNA ressuscitado. Nas amostras que mostraram forte *background* foi adicionado 10 µl de água Milli-Q no DNA ressuscitado.

Os iniciadores utilizados neste estudo foram PLD-F (5' ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA 3') e PLD-R2 (5' ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG 3'), visando a amplificação de 203 pares de base do gene alvo *pld*, codificador da exotoxina fosfolipase D. O iniciador PLD-R2 é o responsável por excluir a amplificação do gene *pld* da bactéria *C. ulcerans* (PACHECO et al., 2007). As reações foram preparadas em microtubos de 200 µl com volume final de 10 µl, composto por: 1.5 U AccuPrimer™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), 1 X AccuPrime™ PCR Buffer I (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs, AccuPrime™ protein, 10% glicerol) e 2 µM de cada iniciador (PLD-F/ PLD-R2) com 2 µl de DNA. As reações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research Inc.), nas seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial: 95°C por 3 min.; 34 ciclos de 95°C por 1 min.; anelamento: 60°C por 40 segundos; extensão: 68°C por 1 min. 30 seg.; extensão final: 68°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (5 mg/ml). O padrão de peso molecular utilizado foi o 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Em todas as reações foram utilizados controle positivo (cepa referência: UFBA 1002 de *C. pseudotuberculosis*) e negativo (água Milli-Q) (Figura 11).

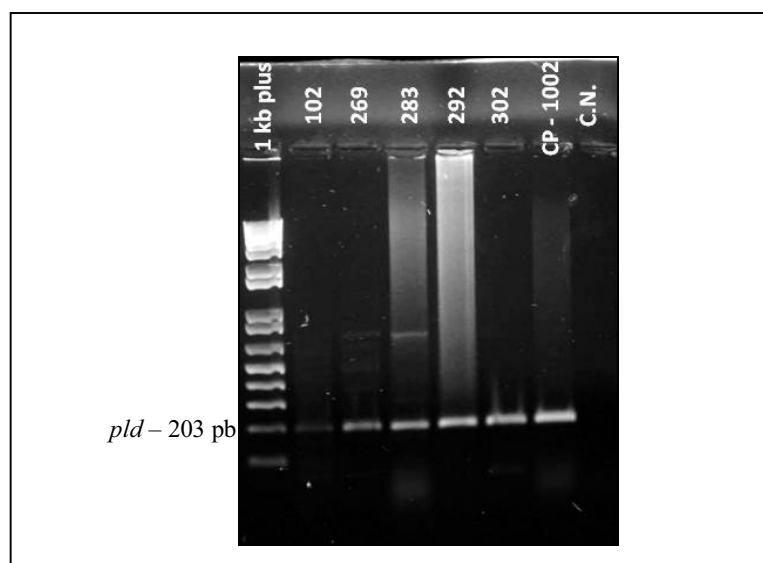


Figura 11 - Perfil de amplificação do gene *pld* em amostras de ovinos sintomáticos. CP – 1002, controle positivo; CN, controle negativo.

Para confirmar os resultados da PCR, 39 amostras aleatórias de ovinos sintomáticos (n=9) e assintomáticos (n=30), que se mostraram positivas foram seqüenciadas. Os produtos da PCR foram precipitados com 20% polietilenoglicol (PEG 8000) (KUSUKAWA et al., 1990) e seqüenciado usando o DYEnamic ET Dye Terminator kit (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. As seqüências foram comparadas com as depositadas do gene *pld* (GenBank - Nucleotide - L16586 and L16587) de *C. pseudotuberculosis*, por similaridade usando o BLAST-N (ALTSCHUL et al., 1990). As seqüências geradas mostraram similaridade com o gene da fosfolipase D de *C. pseudotuberculosis*, com porcentagens de igualdade (identities) variando entre 89% a 100%.

## 6 Análise Estatística

A análise estatística foi constituída do teste não paramétrico, Teste Exato de Fisher para verificar a associação entre o resultado das diferentes

técnicas de diagnóstico com o exame clínico (sintomático e assintomático). Foi determinada a sensibilidade com base na porcentagem de animais positivos (sintomáticos) para LC que tiveram resultado positivo nos testes. A especificidade foi mensurada pela porcentagem de animais negativos (assintomáticos) para LC que tiveram resultado negativo nos testes. A intensidade de concordância entre os testes diagnósticos foi medida pelo coeficiente Kappa. Para comparar duas proporções com resultados dependentes (dois testes realizados na mesma amostra), foi utilizado o teste de McNemar relativo às diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas, baseadas no exame clínico e cultivo. O nível de significância adotado foi de 5%. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se os programas GraphPad InStat e BioEstat 4.0.

### III. RESULTADOS

A distribuição dos resultados obtidos nos métodos de diagnóstico aplicados nas 165 amostras de ovinos sintomáticos e assintomáticos está sumariada na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado dos testes diagnósticos aplicados em 165 amostras de ovinos, após exame clínico para Linfadenite Caseosa. Araçatuba, SP, 2008

| Teste     | Resultado | Sintomático | Assintomático | Total | $p^{(1)}$ |
|-----------|-----------|-------------|---------------|-------|-----------|
| ELISA     | +         | 33          | 89            | 122   | 0.0051    |
|           | -         | 3           | 40            | 43    |           |
|           | Total     | 36          | 129           | 165   |           |
| Citologia | +         | 25          | 7             | 32    | <0.0001   |
|           | -         | 11          | 122           | 133   |           |
|           | Total     | 36          | 129           | 165   |           |
| Cultivo   | +         | 10          | 3             | 13    | <0.0001   |
|           | -         | 26          | 126           | 152   |           |
|           | Total     | 36          | 129           | 165   |           |
| PCR       | +         | 33          | 91            | 124   | 0.0086    |
|           | -         | 3           | 38            | 41    |           |
|           | Total     | 36          | 129           | 165   |           |

(1) Teste Exato de Fisher

+ = positivo

- = negativo

PCR = reação em cadeia da polimerase

O teste exato de Fisher demonstrou associação significativa ( $p < 0.05$ ) entre o exame clínico (sintomáticos e assintomáticos) e o resultado dos testes diagnósticos aplicados aos animais examinados. Das 165 amostras analisadas,

124 (75%) foram consideradas positivas pela PCR, 122 (74%) no ELISA indireto, 32 (19%) no exame citológico e, 13 (8%) no cultivo e isolamento bacteriano. Dos ovinos assintomáticos analisados (n=129), 98% (126/129) resultaram como negativos no cultivo bacteriano, 94% (122/129) na citologia, 31% (40/129) no ELISA e 29% (38/129) na PCR.

A sensibilidade e especificidade dos testes aplicados foram calculados com base no exame clínico, com intervalo de confiança de 95% (Tabela 2).

Tabela 2 - Sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos para Linfadenite Caseosa em 165 ovinos com 95% de intervalo de confiança

|           | Sensibilidade    | Especificidade   |
|-----------|------------------|------------------|
| ELISA     | 0.92 (0.77-0.98) | 0.31 (0.23-0.40) |
| Citologia | 0.69 (0.52-0.84) | 0.94 (0.89-0.98) |
| Cultivo   | 0.28 (0.14-0.45) | 0.98 (0.93-0.99) |
| PCR       | 0.92 (0.77-0.98) | 0.29 (0.22-0.38) |

Os resultados obtidos mostraram sensibilidade de 92% (33/36) nos testes de ELISA e PCR, 69% (25/36) para a análise citológica e 28% (10/36) no exame de cultivo microbiológico. A especificidade do exame microbiológico foi de 98% (126/129), seguida pela citologia com 94% (122/129), 31% (40/129) no ELISA e de 29% (38/129) na PCR. A especificidade verificada na PCR encontra-se dentro do intervalo de confiança obtido no ELISA. Os valores referentes aos resultados falso-positivos foram de 71% (100-29) na PCR, 69% (100-31) no ELISA, 6% (100-94) na citologia e 2% (100-98) no cultivo.

A Tabela 3 apresenta os resultados agrupados segundo os testes diagnósticos utilizados.

Tabela 3 – Resultados em diferentes testes diagnósticos para o diagnóstico Linfadenite Caseosa Ovina em 165 amostras. Araçatuba, SP, 2008

| ELISA | Citologia | Cultivo | PCR | Número de amostras |
|-------|-----------|---------|-----|--------------------|
| +     | +         | +       | +   | 9                  |
| +     | +         | +       | -   | 0                  |
| +     | +         | -       | +   | 14                 |
| +     | +         | -       | -   | 6                  |
| +     | -         | +       | +   | 1                  |
| +     | -         | +       | -   | 1                  |
| +     | -         | -       | +   | 69                 |
| +     | -         | -       | -   | 22                 |
| -     | +         | +       | +   | 1                  |
| -     | +         | +       | -   | 0                  |
| -     | +         | -       | +   | 0                  |
| -     | +         | -       | -   | 2                  |
| -     | -         | +       | +   | 1                  |
| -     | -         | +       | -   | 0                  |
| -     | -         | -       | +   | 29                 |
| -     | -         | -       | -   | 10                 |

Os resultados agrupados obtidos pelos 4 testes diagnósticos para LC constaram 9 amostras positivas e 10 negativas em todos os testes realizados. Das amostras analisadas, 69 foram positivas somente no ELISA e na PCR. Não foi observado nenhum resultado positivo somente no cultivo, porém 29 amostras foram positivas na PCR, 22 no ELISA e somente 2 na citologia.

Na Tabela 4 é apresentado o desempenho dos resultados dos testes diagnósticos em ovinos sintomáticos e assintomáticos, tendo como teste de referência o cultivo bacteriano.

Tabela 4 - Relação dos resultados nos testes ELISA, citológico e PCR com o cultivo microbiano como teste referência em 165 ovinos sintomáticos e assintomáticos para Linfadenite Caseosa. Araçatuba, SP, 2008

| Cultivo | Total | ELISA |      | Citologia |       | PCR   |      |
|---------|-------|-------|------|-----------|-------|-------|------|
|         |       | +     | -    | +         | -     | +     | -    |
| +       | 13    | 11    | 2    | 10        | 3     | 12    | 1    |
| -       | 152   | 111   | 41   | 22        | 130   | 112   | 40   |
| Total   | 165   | 122   | 43   | 32        | 133   | 124   | 41   |
|         |       | S     | 85%  | S         | 77%   | S     | 92%  |
|         |       | E     | 27%  | E         | 85%   | E     | 26%  |
|         |       | Kappa | 2.4% | Kappa     | 37.4% | Kappa | 3.8% |

S=sensibilidade; E=especificidade

Foi constatada diferença significativa entre a proporção de resultados positivos no ELISA (74% - 122/165) ( $p < 0.0001$ ), citologia (19% - 32/165) ( $p = 0.0003$ ) e no PCR (75% - 124/165) ( $p < 0.0001$ ) com o resultado positivo no cultivo bacteriano (8% - 13/165), segundo o Teste de McNemar.

Foi verificada concordância significativa entre os resultados do ELISA, da citologia e da PCR com os do cultivo bacteriano, quando analisados em ovinos sintomáticos e assintomáticos para LC.

A sensibilidade dos testes ELISA, citológico e PCR foi de 85% (11/13), 77% (10/13) e 92% (12/13), respectivamente. A citologia associada ao cultivo demonstrou 85% (130/152) de especificidade e 15% (100-85) de resultados falso-positivos.

Na Tabela 5 foi avaliado o desempenho dos resultados dos testes diagnósticos em ovinos sintomáticos, tendo como teste de referência o cultivo bacteriano.

Tabela 5 - Relação dos resultados nos testes ELISA, citológico e PCR com o cultivo como teste referência em 26 ovinos sintomáticos para Linfadenite Caseosa. Araçatuba, SP, 2008

| Cultivo | Total | ELISA |       | Citologia |       | PCR   |      |
|---------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|------|
|         |       | +     | -     | +         | -     | +     | -    |
| +       | 10    | 9     | 1     | 9         | 1     | 10    | 0    |
| -       | 26    | 24    | 2     | 16        | 10    | 23    | 3    |
| Total   | 36    | 33    | 3     | 25        | 11    | 33    | 3    |
|         |       | S     | 90%   | S         | 90%   | S     | 100% |
|         |       | E     | 8%    | E         | 38%   | E     | 11%  |
|         |       | Kappa | -1.3% | Kappa     | 19.5% | Kappa | 6.8% |

S=sensibilidade; E=especificidade

Na avaliação do desempenho dos resultados dos testes diagnósticos em ovinos sintomáticos (n=26), tendo como teste de referência o cultivo, foi constatada diferença significativa entre a proporção de resultados positivos no ELISA (92% - 33/36) ( $p < 0.0001$ ), na citologia (69% - 25/36) ( $p = 0.0007$ ) e na PCR (92% - 33/36) ( $p < 0.0001$ ), com a proporção de resultados positivos no cultivo (28% - 10/36), segundo o Teste de McNemar.

Foi verificada concordância significativa entre os resultados do teste citológico e PCR com o cultivo, mas não existiu concordância com o ELISA.

A sensibilidade dos testes ELISA e citológico foram de 100% (10/10) e da PCR de 90% (9/10). A citologia associada ao cultivo demonstrou 38% (10/26) de especificidade e a PCR 11% (3/26), mas com 62% (100-38) e 89% (100-11) de resultados falso-positivos, respectivamente.

Na Tabela 6 foi avaliado o desempenho dos resultados dos testes diagnósticos em ovinos assintomáticos, tendo como teste de referência o cultivo.

Tabela 6 – Relação dos resultados nos testes ELISA, citológico e PCR com o cultivo como teste referência em 129 ovinos assintomáticos para Linfadenite Caseosa. Araçatuba, SP, 2008

| Cultivo | Total | ELISA |       | Citologia |       | PCR   |       |
|---------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|
|         |       | +     | -     | +         | -     | +     | -     |
| +       | 3     | 2     | 1     | 1         | 2     | 2     | 1     |
| -       | 126   | 87    | 39    | 6         | 120   | 89    | 37    |
| Total   | 129   | 89    | 40    | 7         | 122   | 91    | 38    |
|         |       | S     | 67%   | S         | 33%   | S     | 67%   |
|         |       | E     | 31%   | E         | 95%   | E     | 29%   |
|         |       | Kappa | -0.2% | Kappa     | 17.3% | Kappa | -0.3% |

S=sensibilidade; E=especificidade

Na avaliação do desempenho dos resultados dos testes diagnósticos em ovinos assintomáticos (n=129), tendo como teste de referência o cultivo, foi constatada diferença significativa entre a proporção de resultados positivos no ELISA (69% - 89/129) ( $p < 0.0001$ ) e na PCR (70% - 91/129) ( $p < 0.0001$ ) com o cultivo (2% - 3/129), porém não houve diferença significativa ( $p = 0.2888$ ) com a proporção de resultados positivos na citologia (5% - 7/129), segundo o Teste de McNemar.

Não foi verificada concordância significativa entre os testes ELISA e PCR com o cultivo, no entanto existiu concordância significativa (17.3%) com a citologia.

A sensibilidade dos testes ELISA e citológico foram de 67% (2/3) e 33% (1/3) na PCR. A citologia associada ao cultivo demonstrou 95% (120/126) de especificidade e somente 5% (100-95) falso-positivos.

#### IV DISCUSSÃO

O material proveniente de PAAF de linfonodo de ovinos sintomáticos e assintomáticos demonstrou ser uma alternativa viável, versátil e de reduzida agressão tecidual, quando comparado a outras técnicas convencionais para o diagnóstico da LC. Sua utilização tem sido amplamente descrita no diagnóstico de diferentes afecções em medicina veterinária, incluindo a LC em pequenos ruminantes (RIBEIRO et al., 2001). No presente estudo, o emprego da CAAF permitiu a detecção do agente etiológico e observação das alterações citológicas nas colorações de Gram e/ou Giemsa em linfonodos de animais sintomáticos e assintomáticos, permitindo o diagnóstico presuntivo do agente, antes da abscedação do linfonodo acometido, bem como da avaliação da evolução da doença.

O isolamento direto de *C. pseudotuberculosis* a partir do material purulento de linfonodos foi possível em 8% (13/165) das amostras cultivadas. A característica do teste padrão ouro é ter a mínima possibilidade de erro. Mesmo com suas limitações, o cultivo permanece como um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico “in vivo” (RIBEIRO et al., 2001). A especificidade encontrada por este método, de 98% comprovou esta afirmação, mostrando 72% (26/36) de falso-negativos e somente 2% (3/129) de falso-positivos. O envolvimento de outros agentes na ocorrência de lesões abscedativas, incluindo *Pasteurella multocida* e *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* (RADOSTITIS et al., 2002), pode ser uma das explicações para a quantidade de resultados falso-negativos observados. Outra justificativa para a quantidade de falso-negativos no cultivo é a pequena quantidade de material significativo e apropriado para o cultivo (BEZABIH et al., 2002) e do pequeno número de bactérias viáveis em abscessos crônicos (BAIRD; FONTAINE, 2007).

O cultivo bacteriano pode ser substituído pelo citológico em exames clínicos de rotina em rebanhos ovinos sintomáticos e assintomáticos, devido a sua boa sensibilidade (69%) e elevada especificidade (94%).

A PAAF de linfonodos constatou também sua eficiência no teste de PCR, com positividade em 75% (124/165) das amostras examinadas, sendo 26% (33/124) de ovinos sintomáticos e 73% (91/124) de assintomáticos. A padronização de um protocolo para extração de DNA e de amplificação do gene *pld* de *C. pseudotuberculosis* diretamente de amostras clínicas provenientes de ovinos sintomáticos e assintomáticos sem a necessidade de cultivo bacteriano prévio diminuiu o tempo gasto para o diagnóstico molecular da LC, tornando-o mais prático para ser usado na rotina de laboratórios de diagnóstico e pesquisa. Além disso, a sensibilidade de 92% obtida neste trabalho foi semelhante à observada por Pacheco et al. (2007), de 94,6%. As diferenças na sensibilidade estão, provavelmente, relacionadas aos diferentes ensaios de PCR realizados e às características do material analisado que se diferem (VAGO et al., 2000). No entanto, a especificidade de 29% foi muito baixa, com 70% de falso-positivos.

A PCR manteve sua sensibilidade de 92% quando os resultados foram analisados em conjunto com o cultivo bacteriano em amostras de ovinos sintomáticos e assintomáticos e, atingiu os 100% quando foram consideradas somente as amostras de ovinos sintomáticos. Vale ressaltar que o diagnóstico molecular por PCR, à partir de colônias bacterianas, é o método que conseguimos obter maior concentração de DNA genômico, sem a interferência de DNA eucarioto ou de outros microrganismos que porventura estão no abscesso.

Os ovinos soropositivos para LC no teste de ELISA representaram 74% (122/165), resultando em 92% de sensibilidade, valores estes muito próximos aos referidos por Carminati et al. (2002) para a espécie caprina, de 93,5%; porém superiores aos encontrados por Dercksen et al. (2000), de 79%. Os resultados deste método, quando analisado com os do cultivo microbiológico em amostras de ovinos assintomáticos, diminuíram para 67%, mostrando que a

associação destes métodos utilizado na fase subclínica da doença, reduz a sensibilidade frente ao uso isolado do ELISA.

Quando nos deparamos com ovinos sem sinais clínicos para LC e necessitamos da confirmação de que os mesmos não possuem a doença, podemos optar tanto pelo uso da citologia, como do cultivo separadamente ou ambos os testes associados. Entretanto, na tentativa de se estabelecer um diagnóstico definitivo da possibilidade da LC em rebanho de ovinos com sinais clínicos sugestivos da enfermidade, os testes sorológicos assim como o molecular apresentaram-se com a mesma sensibilidade. Vale ressaltar a viabilidade e o custo dos diferentes métodos para uma decisão apropriada.

## V. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos permitem sugerir o emprego da PAAF de linfonodo para obtenção de material a ser utilizado no diagnóstico da LC em programas sanitários, exame de rotina, a campo e em laboratórios, uma vez que o mesmo demonstrou ser uma alternativa viável, versátil e de reduzida agressão tecidual.

O material proveniente de PAAF de linfonodos pode ser submetido à técnica de PCR, com amplificação do gene *pld*, diretamente de amostras clínicas de ovinos sintomáticos e assintomáticos.

A demanda por um teste sensível, capaz de identificar *C. pseudotuberculosis* em ovinos assintomáticos foi atendida. O ELISA e a PCR mostraram-se métodos sensíveis, enquanto o cultivo microbiano e o exame citológico revelaram maior especificidade.

## VI. REFERÊNCIAS

- ALJAFARI, A. S.; KHALIL, E. A.; ELSIDDIG, K. E. et al. Diagnosis of tuberculous lymphadenitis by FNAC, microbiological methods and PCR: a comparative study. *Cytopathology*. v. 15, n. 1, p. 44-8, 2004.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* v. 215, p. 403–410, 1990.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* v. 137, p. 179-210, 2007.
- BEZABIH, M.; MARIAM, D. W.; SELASSIE, S. G. Fine needle aspiration cytology of suspected tuberculous lymphadenitis. *Cytopathology*. v. 13, p. 284–290, 2002.
- BRAGA, W. U.; CHAVERA, A. E.; GONZÁLEZ, A. E. Clinical, humoral, and pathologic findings in adult alpacas with experimentally induced infection. *Am. J. Vet. Res.* v. 67, n. 9, p. 1570–1574, 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*
- BROWN, C. C.; OLANDER, H. J., ZOMETTA, C. et al. Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. *Am. J. Vet. Res.* v.47, p. 1461-1463, 1986.
- BROWN, C. C.; OLEANDER, H. J. ALVES, S. F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brasil. *Can. J. Vet. Res.* v. 51, p. 46-49, 1987.
- BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. *Aust. Vet. J.* v. 57, p. 105-110, 1980.

CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L. F. et al. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *R. Ci. Méd. Biol.* v. 2, p. 88-93, 2003.

ÇETINKAYA, B.; KARAHANA, M.; ATIL, E. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet. Microbiol.* v. 2359, p. 1-9, 2002.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOORENB, T. et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* v. 75, p. 167-175, 2000.

DOHERR, M. G.; CARPENTER, T. E.; WILSON, W. D. et al. Application and evaluation of a mailed questionnaire for an epidemiologic study of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses. *Prev. Vet. Med.* v. 35, p. 241-253, 1998.

FILHO, A. S. V. Regulamento FEINCO 2008. Disponível em: [http://www.aspaco.org.br/regulamentos/REGULAMENTE\\_O\\_FEINCO\\_2008.pdf](http://www.aspaco.org.br/regulamentos/REGULAMENTE_O_FEINCO_2008.pdf) Acesso em 18 de novembro 2008.

GANGANE, N.; ANSHU; SINGH, R. Role of modified bleach method in staining of acid-fast bacilli in lymph node aspirates. *Acta Cytol.* v. 52, n. 3, p. 325-8, 2008.

GETACHEW, A.; TESFAHUNEGN, Z. Is fine needle aspiration cytology a useful tool for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis? *East Afr Med J.* v. 76, n. 5, p. 260-3, 1999.

GOEL, M. M.; BUDHWAR, P.; GOEL, M. et al. Nucleic acid amplification of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from archival fine needle aspiration smear scrapings vs. fresh fine needle aspirates of tuberculous lymphadenitis. *Acta Cytol.* v. 50, n. 4, p. 393-7, 2006.

GUPTA, S. K.; CHUGH, T. D.; SHEIKH, Z. A. et al. Cytodiagnosis of tuberculous lymphadenitis. A correlative study with microbiologic examination. *Acta Cytol.* v. 37, n. 3, p. 329-32, 1993.

HALBERT, N. D.; REITZEL, R. A.; MARTENS, R. J. et al. Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Rhodococcus equi* and the *vapA* gene. *Am. J. Vet. Res.* v. 66, p. 1380–1385.

HOMMEZ, J.; DEVRIESE, L. A.; VANEECHOUTTE, M. et al. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* v. 37, p. 954–957, 1999.

KUSUKAWA, N.; UEMORI, T.; ASADA, K. et al.: Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. *Biotechniques* v. 9, p. 66–68, 1990.

MANITCHOTPISIT, B.; KUNACHAK, S.; KULAPRADITHAROM, B. et al. Combined use of fine needle aspiration cytology and polymerase chain reaction in the diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis. *J Med Assoc Thai.* v. 82, n. 4, p. 363-8, 1999.

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. *Can. J. Vet. Res.* v. 53, p. 313–318, 1989.

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

PACHECO, L. G.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L.P. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* v. 56, n. 4, p. 480-486, 2007.

PATON, M. W.; MERCY, A. R.; WILKINSON, F. C. et al. The effects of caseous lymphadenitis on wool production and body-weight in young sheep. *Aus. Vet. J.* v. 65, p.117 – 119, 1988.

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* v. 24, p. 185–191, 1997.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. et al. *Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. Ed. Guanabara Koogan, 9 ed., 1937 p., 2002.

RIBEIRO, M. G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A. C. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 23-28, 2001.

RIZVI, S.; GREEN, L. E.; GLOVER, M. J. Caseous lymphadenitis: An increasing cause for concern. *Vet. Rec.* v. 140, p. 586-587, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. ed. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 1989.

SCHREUDER, B. E. C.; ter LAAK, E. A.; GRIESEN, H. W. An outbreak of caseous lymphadenitis in dairy goats: first report of the disease in The Netherlands. *Vet. Q.* v. 8, n. 1, p. 61-67, 1986.

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. *Vet. Rec.* v. 135, p. 174-176, 1994.

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

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M. et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* v. 49, p. 223–226, 1988.

ter LAAK, E. A.; BOSCH, J.; BIJL, G. C. et al Double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.* v. 53, p. 1125–1132, 1992.

VAGO, L.; ZERBI, P.; CALDARELLI-STEFANO, R. et al. Polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA - Use on negative archival Ziehl-Neelsen cytologic samples. *Acta Cytol*, v. 44, n. 6, p. 1023-1028, 2000.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v. 17, p. 359-371, 2001.

WRIGHT, C. A.; VAN DER BURG, M.; GEIGER, D.; et al. Diagnosing mycobacterial lymphadenitis in children using fine needle aspiration biopsy: cytomorphology, ZN staining and autofluorescence -- making more of less. *Diagn. Cytopathol.* v. 36, n. 4, p. 245-51, 2008.

YERUHAM, I.; ELAD, D.; VAN-HAM, M. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies. *Vet. Rec.* v. 140, p. 423–427, 1997.