

Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Campus de Botucatu - SP

Ocorrência, caracterização fenotípica e genotípica de linhagens de  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de linfonodos de ovinos com e  
sem linfadenite.

**Thiago de Oliveira Zamprogna**

Botucatu – 2013

Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Campus de Botucatu - SP

Ocorrência, caracterização fenotípica e genotípica de linhagens de  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de linfonodos de ovinos com e  
sem linfadenite.

**Thiago de Oliveira Zamprogna**

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária para obtenção  
do título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro**

Botucatu – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Zamprogna, Thiago de Oliveira.

Ocorrência, caracterização fenotípica e genotípica de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de linfonodos de ovinos com e sem linfadenite / Thiago de Oliveira Zamprogna. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502034

1. Ovino - Doenças. 2. Microbiologia veterinária. 3. Linfadenite caseosa. 4. *Corynebacterium*.

Palavras-chave: Caprino ; *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Linfadenite caseosa; Microbiologia veterinária; Ovino.

Nome do Autor: Thiago de Oliveira Zamproga

Título: Ocorrência, caracterização fenotípica e genotípica de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de linfonodos de ovinos com e sem linfadenite.

#### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro  
Presidente e Orientador  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Profa. Dra. Lisiane de Almeida Martins  
Membro  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
UNIPAR – Umarama – PR

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes  
Membro  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Data da defesa: 29 de Julho de 2013

## Epígrafe

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

(Chico Xavier)

## Agradecimentos

Aos meus pais, por todos os valores que me foram ensinados.

A minha companheira, parceira e amiga Thays Mizuki Lucas, sem seu apoio e sua ajuda, talvez não tivesse conseguido finalizar esse trabalho.

Aos meus tios Mário e Isaura pelo apoio, carinho e conselhos.

Ao meu orientador, professor Márcio Garcia Ribeiro, pela paciência e ajuda nesta jornada.

Aos meus queridos amigos e professores Lisiane de Almeida Martins e Aristeu Vieira da Silva por terem me ensinado a importância do constante saber. Sem dúvida vocês foram muito importantes na minha formação profissional.

Ao professor Antonio Carlos Paes pelos ensinamentos profissionais e culturais.

Ao técnico Fernando José Paganini Listoni pelo apoio logístico e pela ajuda direta e indireta na execução deste trabalho.

Ao pós-graduando Gustavo Lara pela ajuda a campo nas coletas e pelo apoio técnico na execução de parte das técnicas usadas neste trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Celular e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, chefiado pelo professor Vasco Azevedo, assim como agradeço a ajuda de sua orientada Dayana Ribeiro.

As minhas amigas e ex-colegas de pós-graduação, Larissa Condas e Tatiana Salerno pelos momentos de risada, palhaçada e descontração.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela possibilidade de ter realizado o meu mestrado nesta importante e respeitada instituição.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudo de mestrado referente ao processo FAPESP 2011/03120-1.

ZAMPROGNA, T.O. Ocorrência, caracterização fenotípica e genotípica de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de linfonodos de ovinos com e sem linfadenite. Botucatu, 2012. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, SP, Universidade Estadual Paulista.

## **Resumo:**

A linfadenite caseosa ovina se caracteriza pela complexidade etiológica, embora *Corynebacterium pseudotuberculosis* seja considerado o micro-organismo mais frequentemente isolado de ovinos e caprinos em vários países. O exame microbiológico ainda é considerado o método mais prático na rotina de diagnóstico da doença, porém a citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) vem sendo utilizada nos últimos anos no diagnóstico à admissão de animais em exposições com sinais clínicos da doença. Recentemente, o diagnóstico molecular tem-se mostrado promissor na identificação do micro-organismo e biovars. O presente estudo investigou a ocorrência de micro-organismos, a caracterização fenotípica e genotípica de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de linfonodos de ovinos com e sem linfadenite. Foram citoaspirados 197 linfonodos de ovinos apresentando linfadenite (submandibulares, parotídeos, pré-femorais, poplíteos, pré-escapulares) sugestivos, clinicamente, de linfadenite caseosa, visando o diagnóstico microbiológico e citológico. Os animais eram provenientes de 14 rebanhos da região centro oeste e sudoeste do estado de São Paulo. Paralelamente, foram colhidos 202 linfonodos viscerais (mesentéricos e/ou mediastínicos), sem sinais aparentes de linfadenite, obtidos na linha de abate de frigorífico. O material colhido de todos os animais com e sem linfadenite foi submetido ao cultivo microbiológico e exame citológico. Os isolados de *C. pseudotuberculosis* foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana “in vitro” frente à ampicilina, azitromicina, ceftiofur, enrofloxacino, eritromicina, florfenicol, penicilina G, rifampicina e sulfadiazina/trimetoprim, além da confirmação diagnóstico pela PCR-multiplex para detecção dos genes 16S rRNA, *rpoB* e *pld*. Adicionalmente, foi realizado inquérito epidemiológico dos principais fatores de risco associados a linfadenite caseosa nos criatórios. Foram isoladas 86 linhagens de *C. pseudotuberculosis*, das quais 64 (74,0%) foram confirmadas como *C. pseudotuberculosis* pela PCR-multiplex. No diagnóstico citológico foram consideradas positivas 97 (49,2%) amostras que possuíam micro-organismos pleomórficos ou de aspecto “corineforme”. Das 202 amostras colhidas de linfonodos mediastínicos e mesentéricos de ovinos de abatedouro foi observado predomínio de isolamento de estafilococos, estreptococos e enterobactérias. Em nenhuma destas amostras foi isolado *C. pseudotuberculosis*. Foi observado alto “odds ratio” e associação estatística ( $P < 0,05$ ) para a presença da doença em ovinos em idade reprodutiva, em propriedades com histórico de comercialização de animais. Infere-se no presente estudo o predomínio de *C. pseudotuberculosis* na casuística da linfadenite caseosa ovina na região estudada. Apesar da alta sensibilidade “in vitro” de *C. pseudotuberculosis* aos diferentes antimicrobianos testados, o tratamento da doença geralmente é ineficaz, indicando a necessidade de adoção de medidas rigorosas de profilaxia e controle da doença nos criatórios, particularmente quanto à movimentação de animais. Foi observada também boa concordância entre a CAAF e o cultivo microbiológico, e entre o cultivo

microbiológico e a PCR, reforçando que a associação de métodos aumenta a eficácia do diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa ovina.

Palavras chave: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Microbiologia.

ZAMPROGNA, T.O. Occurrence, phenotypic and genotypic characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from lymph nodes of sheep with and without lymphadenitis. Botucatu, 2012. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

### **Abstract:**

Caseous lymphadenitis is an infectious disease which etiology is considered very complex, even with frequently isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from lesions in both sheep and goats. The main sources of infection are infected animals in the herd and lymphadenitis is the most important clinical sign, from which the disease is known.

Microbiological culture is still the most suitable test for routine diagnostic, however fine needle aspiration cytology (FNAC) is being widely applied in recent years as triage to assess possibly infected animals. Further, molecular diagnostic has been promising in identification of the microorganism and its respective biotypes

In the present study, 14 sheep herds were evaluated. From the total of animals, 197 sheep presented enlarged lymph nodes (submandibular, superficial parotid, prefemoral, popliteal, prescapular) suggesting presence of existing disease. Fine needle aspiration cytology was performed in animals with lymphadenitis in order to collect samples for microbiological and cytological exams. Therefore, 202 visceral lymph nodes (mesenteric and mediastinic) were collected from slaughtered sheep without signs of lymphadenitis.

All lymph nodes were submitted to cytological evaluation, microbiological culture and, in samples where the pathogen was obtained, traditional polymerase chain reaction (PCR) and antimicrobial resistance test were also performed. In culture, 86 samples presented the isolation of *C. pseudotuberculosis*, from which, 64 (74%) were confirmed as *C. pseudotuberculosis* by PCR and 22 (26%) as negative. The cytology presented characteristics of pleomorphism in 97 (49.2%) of the samples whilst 100 (50.8%) lymph nodes did not present any cytological modification. Among the lymph nodes obtained from carcasses, no *C. pseudotuberculosis* isolation was observed. Moreover, the isolates submitted to antimicrobial resistance test presented high susceptibility to all antimicrobials tested (ampicillin, azithromycin, ceftiofur, enrofloxacin, erythromycin, florfenicol, penicillin G, rifampicin and sulfadiazine-trimethoprim). Additionally, we conducted an epidemiological survey of the main risk factors associated with caseous lymphadenitis in farms. We isolated 86 strains of *C. pseudotuberculosis*, of which 64 (74.0%) were confirmed as *C. pseudotuberculosis* by PCR-multiplex in cytological diagnosis were considered positive 97 (49.2%) samples that had micro-organisms or aspect pleomorphic. Of the 202 samples taken from mediastinal and mesenteric lymph nodes of sheep slaughterhouse was observed prevalence of isolation of staphylococci, streptococci and enterobacteria. In none of these samples was isolated *C. pseudotuberculosis*. We observed a high "odds ratio" and statistical association ( $P < 0.05$ ) in the presence of the disease in sheep reproductive age in herds with marketing of animals. Despite the high sensitivity "in vitro" of *C. pseudotuberculosis* to different antimicrobials, treatment of disease is usually ineffective, indicating the need to adopt strict measures to prevent and control the disease in farms,

particularly as to the movement of animals. It was also observed good agreement between FNAC and microbiological culture and between microbiological culture and PCR, reinforcing the association of methods increases the diagnostic efficacy of *C. pseudotuberculosis* in ovine caseous lymphadenitis.

Key Words: Caseous Lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Microbiology.

## LISTA DE FIGURA

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Principais linfonodos acometidos pela infecção por <i>C. pseudotuberculosis</i> na espécie ovina..... | 19 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Micro-organismos isolados de 197 linfonodos citoaspirados de ovinos. Botucatu, SP, 2012 .....                                                                                                                  | 33 |
| Tabela 2. Associação do isolamento microbiológico de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e a citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) em linfonodos de ovinos. Botucatu, SP, 2012.....                          | 34 |
| Tabela 3. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” de 86 linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> isoladas de linfonodos de ovinos. Botucatu, SP, 2012.....                                                        | 35 |
| Tabela 4. Micro-organismos isolados, em cultura pura ou em associação, em 202 amostras de linfonodos mediastínicos e mesentéricos sem lesão aparente de ovinos de abatedouros. Botucatu, SP, 2012.....                   | 36 |
| Tabela 5. Identificação de <i>C. pseudotuberculosis</i> no cultivo microbiano, CAAF e PCR em ovinos com linfadenite e em linfonodos de ovinos de abatedouro sem sinais aparentes de linfadenite. Botucatu, SP, 2012..... | 37 |

## LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

® - Marca registrada

°C – Graus Celsius

ASPACO – Associação Paulista dos Criadores de Ovinos

ATCC - American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CAAF – Citologia aspirativa por agulha fina

CAMP – Christie, Atkins, Munch e Petersen

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

*C. pseudotuberculosis* – *Corynebacterium pseudotuberculosis*

*C. ulcerans* – *Corynebacterium ulcerans*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Enzyme Linked immunosorbent assay

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

mg - miligrama

mL- mililitro

mm – milímetro

mM – milimol

mPCR – Multiplex PCR

Mol – molar

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

OR – Odds Ratio

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

*pld* - Exotoxina fosfolipase D

PRA – PCR restriction assay

rpm – Rotações por minuto

*rpoB* – Gene de estudo em relação filogenética

rRNA – RNA ribossomal

$\chi^2$  – Qui quadrado

## SUMÁRIO

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução.....                                                                      | 16 |
| 2. Revisão da literatura.....                                                           | 18 |
| 2.1. Etiologia .....                                                                    | 18 |
| 2.2. Epidemiologia .....                                                                | 20 |
| 2.3. Patogenia .....                                                                    | 23 |
| 2.4. Clínica .....                                                                      | 24 |
| 2.5. Diagnóstico.....                                                                   | 26 |
| 2.6. Tratamento.....                                                                    | 28 |
| 2.7. Controle .....                                                                     | 30 |
| 2.8. Saúde Pública .....                                                                | 31 |
| 3. Objetivos .....                                                                      | 33 |
| 3.1. Geral .....                                                                        | 33 |
| 3.2. Específicos.....                                                                   | 33 |
| 4. Material e Métodos.....                                                              | 34 |
| 4.1. Criatórios de ovinos.....                                                          | 34 |
| 4.2. Animais e colheita de material .....                                               | 34 |
| 4.3. Diagnóstico microbiológico de <i>C. pseudotuberculosis</i> e outras bactérias..... | 35 |
| 4.4. Cultivo microbiológico de <i>Mycobacterium</i> sp. ....                            | 36 |
| 4.5. Diagnóstico citológico.....                                                        | 37 |
| 4.6. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” .....                                | 37 |
| 4.7. Detecção molecular de isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....               | 37 |
| 4.8. Cálculo Amostral e análise estatística .....                                       | 39 |
| 5. Resultados .....                                                                     | 40 |
| 6. Discussão.....                                                                       | 45 |
| 7. Conclusões .....                                                                     | 52 |
| 8. Referências Bibliográficas.....                                                      | 54 |
| ANEXO .....                                                                             | 61 |

## **1. Introdução**

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticadas pelos humanos. A criação de ovinos nos primórdios tinha a finalidade de produção de alimento, principalmente pelo consumo da carne e do leite, e utilização da lã para confecção de roupas (CARVALHO et al., 2008).

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes, criada de forma expressiva na Ásia, África e Oceania, nos quais a ampla difusão da espécie se deve principalmente a capacidade de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações. Países como Austrália e Nova Zelândia são reconhecidos por desenvolverem sistemas de criação caracterizados por alta produtividade e raças especializadas que se difundiram pelo mundo, impulsionando a exploração econômica mundial da ovinocultura (OTTO DE SÁ e SÁ, 2011).

A produção de ovinos também é notória na Europa e na América do Sul com criações desenvolvidas principalmente sobre pastagens naturais. Na América do Sul, a ovinocultura se notabiliza por rebanhos de raças mistas que produzem lã e carne comercializados no mercado nacional e internacional (McMANUS, 2010).

O Brasil possui 17,3 milhões de cabeças ovinas distribuídas por todo o país. Os criatórios se concentram em grande número no estado do Rio Grande do Sul e na região nordeste (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2010). No entanto, mudanças no cenário da ovinocultura nacional vêm ocorrendo na última década, e os estados de São Paulo, Paraná e da região centro-oeste têm apresentado desenvolvimento expressivo na atividade. Outro exemplo prático que sinaliza o avanço na criação de ovinos nestas regiões é representado pelo estado de São Paulo, que entre 1970 e 2008 revelou crescimento de 361,9% na ovinocultura, aumentando de 98.126 mil ovinos para 453.261 mil animais. Tais dados refletem como a criação de ovinos tem se tornado importante no contexto nacional e também para a economia das regiões com intensificação da criação (NICIURA et al., 2010).

O desenvolvimento da produção ovina no Brasil, principalmente nos estados do centro-oeste e sudeste, modifica uma característica peculiar

nacional que era a produção de subsistência. Nas últimas décadas, os animais eram criados no país de forma extensiva, atendendo apenas o consumo local ou como complemento da produção bovina (JUNIOR et al., 2010). Em contraste, com o desenvolvimento da produção de ovinos, determinados problemas sanitários tem-se tornado preocupantes na criação da espécie. Neste contexto, a linfadenite caseosa figura dentre as principais doenças bacterianas que acometem os rebanhos ovinos em todo o mundo (RADOSTITS et al., 2007). A doença causa prejuízos econômicos significativos nos criatórios, advindos da depreciação da pele e lã, queda na produção de leite e carne, descarte precoce de animais e carcaças, bem como morte ocasional de animais (WILLIAMSON, 2001; ARSENAULT et al., 2003; PUGH, 2005; MOTTA et al. 2010).

A linfadenite caseosa ovina se caracteriza pela complexidade etiológica, embora *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) seja considerado o micro-organismo mais frequentemente isolado de ovinos e caprinos em vários países (PUGH, 2005; SMITH, 2006; RADOSTITS et al., 2007). No Brasil, os estudos têm sido conduzidos baseados principalmente na caracterização fenotípica dos isolados (ANDRADE, 2007), em linfonodos de ovinos com lesões aparentes (RIBEIRO, 2009).

O presente estudo investigou a ocorrência, a caracterização fenotípica e genotípica em linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas de linfonodos de ovinos com e sem linfadenite.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1. Etiologia

Diferentes micro-organismos já foram descritos envolvidos na linfadenite infecciosa em ovinos. *C. pseudotuberculosis* é considerado o mais prevalente, seguido de outros micro-organismos como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterobactérias, estafilococos e estreptococos (PUGH, 2005; SMITH, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

*C. pseudotuberculosis* é reconhecido como bactéria intracelular facultativa, pertencente ao grupo dos actinomicetos aeróbios, que contemplam outros patógenos de relevância em medicina veterinária, incluindo *Rhodococcus equi* e os gêneros *Nocardia* e *Dermatophilus*. *C. pseudotuberculosis* se apresenta sob a forma de pequenos bacilos pleomórficos, gram-positivos, entre 0,5-0,6 µm a 1–3 µm, não esporulados, desprovidos de cápsula. São considerados anaeróbios facultativos. Apesar do micro-organismo tolerar aerobiose em meios de cultura, preferencialmente é cultivado em condições de microaerofilia. Na coloração de Gram, Giemsa ou Panótico, o micro-organismo assume aspecto de “letras chinesas”. Nos exames microbiológicos apresenta reação positiva para urease, glicose e maltose, e sacarose negativa. Não hidrolisam a esculina e caseína. São micro-organismos catalase positivos e oxidase negativos (QUINN et al., 1994, 2005; DORELLA et al., 2006; MOTTA et al., 2010).

São descritos dois biovars ou biotipos de *C. pseudotuberculosis* denominados *ovis* e *equi*, diferenciados primariamente com base em características fenotípicas (bioquímicas). O biovar *ovis* acomete preferencialmente os ovinos e caprinos, e caracteristicamente não reduz o nitrato a nitrito (nitrato-negativo), enquanto o biovar *equi* é observado em lesões tegumentares em equinos e é nitrato-positivo. A variação destas biovariantes pode refletir em diferenças na patogenicidade do micro-organismo em animais domésticos. Nos últimos anos, o uso de técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e o uso de enzimas de restrição tem confirmado a classificação bioquímica clássica do micro-organismo nos

biovars *ovis* e *equi*, como base na redução ou não do nitrato, ratificando a fidedignidade dos testes fenotípicos no diagnóstico (DORELLA et al., 2006).

O isolamento microbiano de *C. pseudotuberculosis* pode ser obtido em meios convencionais como o ágar suplementado com sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinados, preferencialmente em condições de microaerofilia, a 37°C. A partir de 48–72 horas são observadas colônias diminutas (0,5 mm de diâmetro), com estreito halo de beta-hemólise, ressecadas, aderidas ao meio, de coloração esbranquiçada ou opaca que, com o envelhecimento, assumem tonalidade amarelada (QUINN et al., 1994, 2005).

*C. pseudotuberculosis* contém lipídeos na parede bacteriana ou ácidos corinomicólicos, à semelhança dos ácidos micólicos presentes na estrutura dos gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium* (BAIRD, 2003). Entretanto, não apresenta álcool-ácido resistência, propriedade característica das micobactérias (BATEY, 1986; BAIRD e FONTAINE, 2007). A fração lipídica da parede deste grupo de bactérias dificulta o processo de fagocitose, pois impede a hidrólise enzimática dos lisossomos e potencializa os efeitos citotóxicos no hospedeiro. Esta porção lipídica está diretamente relacionada à característica piogênica das afecções por *C. pseudotuberculosis*, reconhecida como fator determinante na virulência do micro-organismo (WILLIAMSON, 2001; MEYER et al., 2005). A composição da parede celular dos actinomicetos, incluindo *C. pseudotuberculosis*, confere a este grupo de patógenos a capacidade de resistência ambiental por longos períodos, mesmo sob situações adversas de exposição à luz solar direta ou dessecação (BAIRD e FONTAINE, 2007). *C. pseudotuberculosis* mantém-se viável por até 55 dias em utensílios de uso em animais, contaminados por pus, ou até oito meses em ampla variação das condições de temperatura e umidade (WINTER, 1997; COSTA, 2002).

As linhagens de *C. pseudotuberculosis* possuem diferentes fatores de virulência, que incluem exotoxinas (fosfolipase D, esfingomielinase, dermonecrotinas e hemolisinas) e componentes da estrutura da parede bacteriana, que possibilitam a permanência da bactéria no interior do citoplasma de fagócitos e a indução de reações piogranulomatosas. A capacidade de manter-se viável no interior de fagócitos está intimamente relacionada à elevada concentração de lipídios e a presença de glicoproteínas

na parede bacteriana, que dificultam a fagocitose (DORELLA et al., 2006; MOTTA et al., 2010).

A enzima fosfolipase D é uma importante exotoxina que tem capacidade de causar vasodilatação e favorecer a disseminação de *C. pseudotuberculosis* pelo sistema linfático. Possui também função lítica para eritrócitos, efeito dermonecrótico e, quando secretada em grande quantidade, pode ser letal ao hospedeiro (BAIRD e FONTAINE, 2007). A ação desta exotoxina ou citolisina resulta na destruição das fosfolipases da membrana dos eritrócitos e consequente liberação do íon ferro, importante cofator de multiplicação da maioria das bactérias. A produção da fosfolipase D pode ser observada no teste clássico de CAMP (Christie, Atkins, Munch e Petersen), utilizado como auxiliar no diagnóstico microbiológico. A semeadura perpendicular de *C. pseudotuberculosis* e linhagem de *Rhodococcus equi* resulta em efeito de hemólise sinérgica (reação de CAMP positivo) no meio de ágar sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado, visualizado pela formação de “ponta de seta” na intersecção das semeaduras, a partir de 48 horas de incubação, em condições de microaerofilia ou aerofilia, a 37°C (QUINN et al., 1994, 2005).

## **2.2. Epidemiologia**

Dentre os diferentes problemas de saúde que afetam a criação de pequenos ruminantes, a linfadenite caseosa assume posição de destaque. A doença em ovinos ocorre em praticamente todo o mundo, notadamente nos países com criação expressiva de pequenos ruminantes, que incluem a Austrália, Nova Zelândia, certos países da Europa, sul da África, Reino Unido e Américas (KOMALA et al., 2008).

Os ovinos são naturalmente susceptíveis à doença. A prevalência aumenta com a idade dos animais, provavelmente em virtude do maior risco de exposição ao agente no ambiente e/ou contato com animais infectados.

No Brasil, estima-se que a doença ocorra entre 2 a 50% dos rebanhos, particularmente nas regiões nordeste e sul (RIBEIRO et al., 1988; RIBEIRO et al., 2001; DOMINGUES e LANGONI, 2001; CARVALHO et al., 2008). *C. pseudotuberculosis* já foi investigado e caracterizado fenotipicamente em vários

estados da federação: Bahia (COSTA et al., 1973), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 1982), Ceará (UNANIAN et al., 1985), Rio de Janeiro (LANGENEGGER e LANGENEGGER, 1991), Minas Gerais (GUIMARÃES et al., 2009; SEYFFERT et al., 2010) e São Paulo (CARMO et al., 2009).

Estima-se que a prevalência seja elevada nos rebanhos nordestinos e que a doença clínica possa atingir 30% dos animais nesta região (COSTA et al., 1973). Bento e Zoni (1986) registrou em alta ocorrência a linfadenite caseosa em rebanho leiteiro de cabras confinadas no Rio de Janeiro, enquanto Guimarães et al. (2009) notificaram 70,9% de ovinos infectados por *C. pseudotuberculosis* no estado de Minas Gerais.

A região sudeste experimentou recentemente o aumento significativo da ovinocultura, notadamente nos estados de São Paulo e Minas Gerais. A introdução nos plantéis de animais de outros estados, ou mesmo de outros países, adquiridos sem o devido controle, aliada a negligência do período de quarentena, certamente favoreceu o aumento do contágio de *C. pseudotuberculosis* nos criatórios de ovinos da região sudeste do país.

Os prejuízos com a linfadenite nos rebanhos são elevados e estão relacionados com a menor qualidade da pele e da lã, condenação de carcaças, diminuição da produção de leite e carne, subfertilidade ou redução dos índices de fertilidade do plantel, e descarte precoce de animais. Ainda a doença provoca redução dos nascimentos, baixo peso dos borregos ou cabritos a desmama, gastos com tratamentos, reposição de animais e honorários profissionais, além da morte ocasional de animais jovens e adultos com infecções disseminadas (DOMINGUES e LANGONI, 2001; CARVALHO et al., 2008).

A principal fonte de infecção de *C. pseudotuberculosis* para os pequenos ruminantes são os próprios animais infectados, que eliminam o micro-organismo por abscessos localizados na pele, a partir de secreções dos linfonodos ou oro-nasais, contaminando abundantemente o ambiente. O micro-organismo também é eliminado pelas fezes e pelo leite. No pasto, fezes e solo, ao abrigo da luz solar direta e em locais úmidos, a bactéria pode manter-se viável por meses, até anos. Na água estagnada no interior de banhos de imersão mantém-se infectante por 4 a 5 meses. Ademais, permanece viável

por cerca de dois meses em fômites, equipamentos e utensílios de uso comum nos animais (RADOSTITS et al., 2007; MOTTA et al. 2010).

A principal forma de transmissão da doença é representada pela presença de lesões na pele ou soluções de continuidade, que facilitam o contágio do micro-organismo por via transcutânea, proveniente do ambiente contaminado, de material purulento de linfonodos e/ou da pele de animais infectados. A transmissão ocorre também por lesões provocadas por plantas cactáceas ou alimentação com gramíneas ou forrageiras ressecadas (RIET-CORREA, 2001). Alternativamente, a transmissão ocorre pelo contato direto de animais sadios com aerossóis emanados por animais com pneumonia. Paralelamente, a ingestão de água e alimentos contaminados por material purulento dos animais também deve ser considerada na transmissão da doença (PUGH, 2005).

Para os ovinos, os principais fatores de risco da doença são representados pela tosquia, banhos de imersão e procedimentos como caudectomia ou aplicação de brincos. Os banhos de imersão são apontados como a principal forma de transmissão em criatórios, em virtude da contaminação da solução dos banhos por secreções respiratórias, ou por conteúdo purulento de abscessos de pele e de linfonodos, particularmente se esta prática é realizada após a tosquia dos animais. A contaminação das máquinas de tosquia é outra forma comum de disseminação do micro-organismo nos criatórios. A tosquia frequentemente determina lesões ou soluções de continuidade na pele dos animais, que facilitam a penetração do organismo no tegumento (RADOSTITS et al., 2007).

A contaminação de utensílios de uso comum nos animais como tesouras, aparelhos de colocação de brinco, pinças de casco, lâminas de bisturi, agulhas, entre outros equipamentos perfurocortantes que promovem agravos no tecido cutâneo e subcutâneo, também são considerados relevantes na transmissão da bactéria. A contaminação de ferimentos após práticas cirúrgicas de rotina como castração, corte de cauda e descorna também estão associados à ocorrência da linfadenite caseosa (PUGH, 2005). O hábito de alimentar os pequenos ruminantes em instalações providas de canzil pode determinar também abrasões ou escoriações na região da escápula, na altura do contato com o canzil, promovendo a infecção local da pele, e subsequente

drenagem do micro-organismo preferencialmente para o linfonodo regional (RIBEIRO et al., 2001).

A não remoção das fezes, a manutenção no ambiente de cama dos ovinos por período prolongado, a deficiente exposição de capris e apriscos à luz solar direta, o excesso de umidade e alta lotação animal são fatores que aumentam a carga de contaminação ambiental nos criatórios e, conseqüentemente, dos riscos de infecção decorrentes da contaminação de alimentos, água, equipamentos e/ou utensílios (PUGH, 2005; RADOSTITS et al., 2007).

### **2.3. Patogenia**

Após a invasão pela pele ocorre a fagocitose da bactéria por neutrófilos e macrófagos locais. Estes fagócitos não conseguem inativar completamente o micro-organismo, devido à presença de lipídios e ácido corinomicólico na parede bacteriana que resistem às enzimas lisossomais, propiciando a manutenção intracitoplasmática do organismo nestas células de defesa. Dependendo da virulência da linhagem, da carga infectante bacteriana, da espécie ou mesmo da higidez do animal susceptível, a bactéria pode ficar restrita ao tecido cutâneo e subcutâneo, ou ser drenada para os linfonodos regionais. Dos linfonodos regionais pode disseminar-se para órgãos. Em infecções naturais, poucos dias após a infecção natural as linhagens virulentas podem ser encontradas nos linfonodos regionais (MCKEAN et al., 2007; RADOSTITS et al., 2007).

Eckersall et al. (2007) referiram que após a disseminação por via linfohemática, *C. pseudotuberculosis* atinge vários órgãos, causando diferentes manifestações clínicas, geralmente de evolução crônica. Os pulmões são o principal órgão-alvo após a disseminação do micro-organismo a partir dos linfonodos regionais, determinando alta letalidade. Ocasionalmente, o micro-organismo causa abscessos no fígado, rins, baço, coração, encéfalo, intestino, peritônio, linfonodos mesentéricos e mediastínicos (PUGH, 2005; SMITH, 2006).

As infecções por *C. pseudotuberculosis* induzem reações piogranulomatosas de difícil resolução tecidual. Os piogranulomas possuem

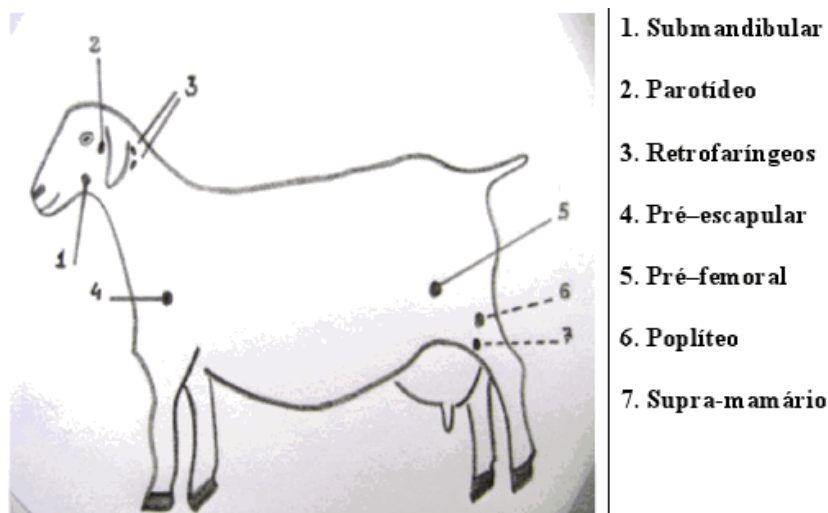
disposição celular peculiar, constituída pelo agente no interior da lesão – livre ou no interior do citoplasma de fagócitos – disperso em grande quantidade de *caseum*, circundado por macrófagos modulados em células epitelióides e neutrófilos. Secundariamente, apresenta outras células como linfócitos e plasmócitos, delimitado externamente por cápsula fibrosa (MCKEAN et al., 2007).

A infecção por via oral (consumo de água ou alimentos contaminados) ou respiratória (inalação de aerossóis) leva a infecção da mucosa local e drenagem do micro-organismo para os linfonodos regionais. À semelhança da infecção cutânea, por via oral a bactéria pode ficar restrita aos linfonodos regionais ou disseminar-se pelo organismo, determinando a formação de abscessos em órgãos (PUGH, 2005; MOTTA et al., 2010).

## **2.4. Clínica**

Em ovinos e caprinos as manifestações clínicas são causadas principalmente pelo biovar *ovis*. No Brasil, com base em métodos fenotípicos, Abreu et al. (2008) identificaram o biovar *ovis* na totalidade de 31 linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas de ovinos e caprinos provenientes do sertão de Pernambuco.

Clinicamente, o sinal mais característico é a linfadenite, que dá nome à doença. O pus proveniente dos linfonodos e abscessos apresenta aspecto denso, pastoso, de coloração branco-amarelada a creme-esverdeada, sem odor desagradável ou pútrido. Comumente são afetados os linfonodos submandibulares, parotídeos, retrofaríngeos, pré-escapulares, pré-femorais, inguinais e poplíteos (Figura 1).



Adaptado de PUGH, 2005.

Figura 1. Principais linfonodos acometidos pela infecção por *C. pseudotuberculosis* na espécie ovina.

A complicação mais preocupante dos casos de linfadenite é representada pela disseminação da bactéria dos linfonodos regionais para diferentes órgãos (RADOSTITS et al., 2007).

As principais afecções desenvolvidas pelo micro-organismo nos casos de disseminação sistêmica são: pneumonia abscedante, enterite, nefrite e hepatite. Nos casos de disseminação do micro-organismo, a reação dos linfonodos regionais acompanha o acometimento do órgão-alvo. No entanto, os animais podem apresentar infecção sistêmica de órgãos e tecidos sem, necessariamente, apresentarem aumento de linfonodos palpáveis externamente. Estes animais tendem a desenvolver a forma crônica da doença, que é caracterizada por emagrecimento e debilidade progressiva, também denominada “forma visceral” ou “síndrome da ovelha magra” (PUGH, 2005; MOTTA et al., 2010).

Em propriedades endêmicas cujo ambiente, equipamentos e utensílios estão maciçamente contaminados, os animais recém-nascidos podem apresentar infecção umbilical. Nestas propriedades, número variável de animais também desenvolve abscessos de pele notadamente na região de cabeça e pescoço, aliado a presença de alopecia local, associados ou não ao desenvolvimento de linfadenite regional e acometimento de órgãos (RADOSTITS et al., 2007).

## 2.5. Diagnóstico

O diagnóstico de rotina da linfadenite caseosa em ovinos é fundamentado nos achados clínico–epidemiológicos, apoiado em exames laboratoriais subsidiários, predominantemente microbiológicos. Na anamnese, faz-se importante observar dados sobre a idade dos animais, raça, tipo de exploração (corte, leite, lã, dupla aptidão), histórico e procedência de animais recém–adquiridos, presença de quarentenário, fluxo de reintrodução de animais no plantel ou de participação em eventos (exposições, leilões), lotação dos animais nos piquetes, qualidade da alimentação e manejo geral dos animais (PUGH, 2005; CARVALHO et al., 2008; MOTTA et al., 2010).

Os principais linfonodos afetados pela doença são os submandibulares, parotídeos, retrofaríngeos, pré-escapulares, pré-femorais, inguinais e poplíteos. Nas propriedades nas quais a doença ocorre de forma endêmica é frequente a formação de abscessos de pele. Os animais que desenvolvem disseminação sistêmica geralmente apresentam sinais de pneumonia, debilidade e emagrecimento progressivo (RADOSTITS et al., 2007; KOMALA et al., 2008). Caracteristicamente, o pus produzido por *C. pseudotuberculosis* não possui odor desagradável (RIBEIRO et al., 2001), fato que o diferencia clinicamente da linfadenite em ovinos por *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes* que, contrariamente, apresenta odor pútrido ou fétido.

O exame microbiológico ainda é considerado o método mais prático na rotina de diagnóstico da doença. O isolamento de *C. pseudotuberculosis* é obtido a partir de material purulento dos linfonodos, secreções nasais, abscessos de pele, leite, fezes ou de fragmentos de órgãos à necropsia (pulmões, rins, fígado, linfonodos mesentéricos e mediastínicos). No cultivo microbiológico de material obtido a partir de secreções purulentas, lavado transtraqueal e de órgãos, o micro-organismo é usualmente isolado no meio de ágar acrescido de sangue ovino ou bovino (5%), desfibrinado. A confirmação da espécie bacteriana é firmada submetendo o isolado a diferentes testes bioquímicos e ao teste de CAMP. Diferenças na redução do substrato nitrato

para nitrito permitem diferenciar o biotipo *ovis* (nitrito–negativo) do *equi* (nitrito–positivo) [QUINN et al., 1994, 2005; PACHECO et al., 2007].

A partir de 1980, tem sido crescente o emprego da citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) no diagnóstico de doenças em animais domésticos (ROCHA, 1998). Guedes et al. (1997) afirmaram que a CAAF apresenta como vantagens o baixo custo, simplicidade de execução, reduzida agressão no local de aspiração tecidual e a possibilidade de diagnóstico citológico acurado, em curto espaço de tempo, se comparado aos outros métodos, como a histopatologia.

A CAAF vem sendo utilizada nos últimos anos à admissão de ovinos em exposições, leilões e outros eventos no estado de São Paulo, com vistas à triagem de animais positivos para linfadenite caseosa, pela Associação dos Criadores de Ovinos do estado de São Paulo (ASPACO). No Brasil, esta técnica foi utilizada pioneiramente por Ribeiro et al. (2001) no diagnóstico da linfadenite caseosa em 11 caprinos, provenientes de criatório no interior do estado de São Paulo. Destes, em sete animais a CAAF revelou micro-organismos pleomórficos de aspecto “corineforme”, que foram confirmados na totalidade dos animais como *C. pseudotuberculosis*, após o isolamento microbiano e caracterização bioquímica, a partir de material obtido da biopsia dos linfonodos.

O método citológico tem permitindo resultados acurados em 70% ou mais dos casos de linfadenite caseosa em ovinos por *C. pseudotuberculosis*. O material aspirado é corado pelos métodos de Gram, Giemsa e/ou Panóptico (RIBEIRO et al., 2011). Desde 2005, no estado de São Paulo, na presença de organismos pleomórficos de aspecto “corineforme” ou lembrando “letras chinesas” na citologia aspirativa de linfonodos aumentados, os animais são impedidos de entrarem ou permanecerem nos recintos nas exposições ranqueadas da ASPACO. A bactéria que mais se assemelha ao *C. pseudotuberculosis* na bacterioscopia direta após a citologia aspirativa e que poderia dificultar a interpretação da CAAF é *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes*. No entanto, *Truepurella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes* apresenta geralmente baixa ocorrência na casuística da linfadenite ovina (RIBEIRO et al., 2001; RIBEIRO et al., 2011).

Outras técnicas como a imunodifusão em gel de ágar, hemaglutinação indireta, inibição da hemólise sinérgica, fixação de complemento, ELISA, soroneutralização e alérgico-diagnóstico também têm sido utilizadas no diagnóstico da doença (PACHECO et al., 2007). Entretanto, a grande maioria destas provas sorológicas apresenta limitações quanto à sensibilidade, especificidade e, especialmente, no que tange ao diagnóstico individual de animais infectados, visando o descarte individual de ovinos nos plantéis (KOMALA et al., 2008).

Recentemente, o diagnóstico molecular de *C. pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa em pequenos ruminantes tem-se mostrado promissor na identificação do micro-organismo e biovars. Os ensaios moleculares têm utilizado como espécime clínico a secreção purulenta de linfonodos. O diagnóstico molecular pela reação em cadeia pela polimerase tem-se baseado na detecção dos genes 16S rRNA (utilizado na taxonomia bacteriana), o gene *rpoB* (usado para estudos de relação filogenética) e o gene *pld* da exotoxina fosfolipase D (esfingomielina associada a virulência de *C. pseudotuberculosis*) [DORELLA et al., 2006]

## 2.6. Tratamento

*C. pseudotuberculosis* é sensível “in vitro” a grande variedade de antimicrobianos, que incluem ampicilina, cefalosporinas (ceftiofur, cefalexina, ceftriaxona), sulfonamidas/trimetoprim, enrofloxacino, florfenicol, gentamicina e tetraciclina. No Brasil, Abreu et al. (2008) descreveram que, dentre 31 linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas da linfadenite em ovinos e caprinos no sertão de Pernambuco, a maior sensibilidade dos isolados foi observada para o norfloxacino, cefazolina, amoxicilina, tetraciclina, sulfa/trimetoprim e orbifloxacina em 80% ou mais das linhagens. Em contraste, no mesmo estudo, os maiores índices de resistência dos isolados foram observados frente à novobiocina, neomicina e gentamicina. Os autores alertaram também para a alta ocorrência de resistência múltipla dos isolados aos antimicrobianos, observada em 16% das linhagens para cerca de 50% dos fármacos.

O tratamento da linfadenite é recomendado por período prolongado, entre 30 a 60 dias, por via parenteral ou oral. No entanto, os ensaios terapêuticos “in vivo” usualmente não resultam em cura bacteriológica, ou somente conduzem os animais à melhora do estado geral (cura clínica). Após o término do tratamento com antimicrobianos convencionais a grande maioria dos animais apresenta recidiva dos sinais clínicos da linfadenite (DORELLA et al., 2006; RADOSTITS et al., 2007). A baixa efetividade do tratamento antimicrobiano “in vivo” frente ao *C. pseudotuberculosis* pode ser atribuída à capacidade de manutenção intracelular da bactéria em fagócitos e a formação de lesão piogranulomatosa, que dificulta os antimicrobianos convencionais atingirem concentrações terapêuticas adequadas no interior celular ou no foco piogranulomatoso, que contém grande quantidade de pus e debris celulares. Alternativamente, as lesões cutâneas podem ser drenadas de forma cirúrgica e tratadas topicamente com a infusão de produtos antissépticos como iodo (2 a 5%) ou clorexidine (2 a 3%), com resultados satisfatórios (KOMALA et al., 2008; MOTTA et al. 2010).

## 2.7. Controle

O controle da linfadenite caseosa ovina é fundamentado em medidas gerais de saúde do rebanho e medidas específicas. As ações gerais de controle e profilaxia da doença são fundamentadas na adoção de quarentena para animais recém-adquiridos ou que retornaram de eventos, dimensionamento adequado da lotação dos pastos e ambientes de confinamento dos animais. A alimentação fornecida aos animais deve ser de qualidade, evitando alimentos grosseiros, fibrosos e pontiagudos. As instalações não devem possuir cercas de arame farpado que possam favorecer traumatismos na pele dos animais (RADOSTITS et al., 2007). Recomenda-se também a retirada diária das fezes e dejetos dos apriscos e a desinfecção periódica das instalações. Todos os ovinos doentes devem ser segregados, e se possível, recomenda-se o descarte gradual destes animais (KOMALA et al., 2008; MOTTA et al. 2010).

Os banhos de imersão representam a principal forma de transmissão do micro-organismo para os ovinos. Assim, recomenda-se a substituição periódica da solução de imersão contra ectoparasitas e a higienização do fosso do banho de imersão. Procedimentos cirúrgicos e/ou práticas de manejo que promovam qualquer solução de continuidade na pele dos animais devem ser realizados com criteriosa assepsia, bem como os instrumentais cirúrgicos e utensílios de uso geral devem passar por rigorosa desinfecção. Nos animais jovens se recomenda cuidados com a antissepsia do umbigo dos borregos e maximizar a ingestão do colostro nas primeiras horas de vida. Em propriedades que a doença cursa de forma endêmica, atenção especial deve ser observada quanto à higiene pessoal, das vestimentas e calçados dos tratadores, bem como na desinfecção de utensílios de uso comum dos animais (PUGH, 2005).

Estão disponíveis comercialmente bacterinas, toxóides, complexo bacterina-toxóide e vacinas atenuadas para a profilaxia específica da doença. A prática da vacinação não impede a infecção, tampouco à exteriorização clínica da doença. Contudo, diminui a frequência e a gravidade das lesões, assim como o número de animais que evoluem para a forma visceral, reduzindo o impacto negativo da doença no plantel. Como *C. pseudotuberculosis* é micro-organismo intracelular, as vacinas atenuadas são

mais efetivas, visto que induzem imunidade celular, possibilitando a inativação do micro-organismo no interior dos fagócitos (DORELLA et al., 2006).

No Brasil, estão disponíveis atualmente três vacinas comerciais para a profilaxia e controle da linfadenite caseosa ovina. Duas contêm cepas de *C. pseudotuberculosis* atenuadas: Linfovac<sup>®1</sup> e Vacina 1002<sup>®2</sup>. Em contraste, a vacina Biodectin<sup>®3</sup> é uma bacterina. A Linfovac<sup>®</sup> e a vacina 1002<sup>®</sup> possuem indicação de uso em animais jovens e adultos. Os borregos devem ser vacinados a partir dos três meses de idade, com reforço 30 dias pós à primeira dose. Os animais adultos não vacinados também devem receber duas doses com intervalo de 30 dias. O Biodectin<sup>®</sup> pode ser usado em ovelhas no parto. Recomenda-se em ovelhas com até três semanas antes do parto, ou em animais adultos não vacinados, sempre com indicação de duas doses com intervalo de 30 dias (GUIMARÃES et al., 2011).

## 2.8. Saúde Pública

Nas últimas décadas tem sido crescente a notificação de humanos infectados por *C. pseudotuberculosis*. No entanto, é considerada uma zoonose menor, de caráter ocupacional (MOTTA et al. 2010). A transmissão para humanos ocorre pelo contato com o material purulento de abscessos, de linfonodos, ingestão de leite ou por feridas contaminadas com material do ambiente dos criatórios de ovinos.

Clinicamente, a doença em humanos é caracterizada pela formação de abscessos e de linfadenopatia regional. Os médicos veterinários, zootecnistas, criadores, magarefes e outros profissionais que mantem contato estreito com ovinos devem tomar as precauções necessárias ao manusear ovinos suspeitos de infecção por *C. pseudotuberculosis* (PEEL et al., 1997)

No Brasil, a maioria dos estudos não tem se preocupado com a investigação da complexidade etiológica da linfadenite caseosa em ovinos (RIBEIRO et al., 2011). Os estudos no país têm realizado o diagnóstico utilizando fundamentalmente técnicas fenotípicas (ABREU, 2007; RIBEIRO,

---

<sup>1</sup> Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda, São Paulo – SP.

<sup>2</sup> LABOVET – Laboratório Veterinário, Feira de Santana – BA.

<sup>3</sup> Fort Dodge Saúde Animal, Campinas – SP.

2009) Ademais, são praticamente insipientes os estudos nacionais voltados à identificação de *C. pseudotuberculosis* em linfonodos sem lesões aparentes de linfadenite. Diante do exposto, o presente estudo investigou a ocorrência, a caracterização fenotípica e genotípica de *C. pseudotuberculosis* obtidos de linfonodos de ovinos com e sem linfadenite.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Geral**

- ✓ Determinar a ocorrência, a caracterização fenotípica e genotípica de linhagens de *C. pseudotuberculosis* isolados de ovinos com e sem linfadenite.

#### **3.2. Específicos**

- ✓ Investigar a ocorrência de micro-organismos de origem bacteriana em ovinos com e sem linfadenite, com ênfase no isolamento de *C. pseudotuberculosis*;
- ✓ Avaliar o perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” e a ocorrência de multirresistência aos antimicrobianos nos isolados de *C. pseudotuberculosis*;
- ✓ Comparar a presença de micro-organismos sugestivos do grupo dos “corineformes” no exame citológico com o isolamento microbiano nos ovinos com linfadenite;
- ✓ Confirmar por métodos moleculares os isolados de *C. pseudotuberculosis* identificados pelo cultivo microbiano e caracterização fenotípica;
- ✓ Avaliar principais dados epidemiológicos das propriedades rurais amostradas com linfadenite caseosa;

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Criatórios de ovinos**

Foram utilizados no estudo 14 criatórios de ovinos, dos quais 12 eram propriedades particulares e os outros dois pertencentes à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ (Aprisco do Departamento de Parasitologia e Aprisco do Departamento de Reprodução). Os criatórios particulares possuíam em média 100 ovinos por propriedade e os apriscos da FMVZ em média de 30 ovinos. As coletas foram realizadas por conveniência em criatórios da região centro-oeste e sudoeste do estado de São Paulo. Os animais amostrados com linfadenite para o estudo foram de diferentes raças, sexo e idade.

Foram obtidos também dados epidemiológicos dos ovinos, de manejo e criação dos animais amostrados, a saber: sexo, faixa etária, raça e procedência dos animais, município do criatório, número de animais da propriedade, tipo de criação (extensivo, intensivo ou semi-intensivo), uso dos animais (cria, venda de matrizes, venda de reprodutores, abate), presença de outros animais domésticos, presença de quarentenário na propriedade e fluxo dos animais (anexo 2).

### **4.2. Animais e colheita de material**

Foi coletado material de 197 ovinos apresentando aumento de linfonodos (submandibulares, parotídeos, pré-femorais, poplíteos, pré-escapulares) sugestivos, clinicamente, de linfadenite caseosa. Não foram utilizados no estudo linfonodos supurados (abscedados).

A colheita de material dos animais com linfadenite visando o diagnóstico microbiológico e citológico foi obtida por punção aspirativa, em duplicata dos 197 linfonodos, utilizando a técnica de CAAF (GUEDES et al., 1997; ROCHA, 1998).

A aspiração do material foi realizada com o citoaspirador de Valeri®, utilizando agulhas hipodérmicas (40x12mm), seringas descartáveis e individuais para cada colheita.

Na presença de mais de um linfonodo aumentado, foi colhido somente um linfonodo por ovino, que foi considerado representativo de uma unidade animal. O primeiro material colhido de cada linfonodo pela CAAF - contido tanto no canhão da agulha quanto na seringa - foi acondicionado sob refrigeração, visando o diagnóstico microbiológico. Em seguida, foi realizada nova citoaspiração, com vistas ao diagnóstico citológico.

Paralelamente, foram colhidos 202 linfonodos viscerais (mesentéricos e/ou mediastínicos), sem sinais aparentes de linfadenite, obtidos na linha de abate do Frigorífico Dom Pig, São Manuel, SP, sob regime de inspeção municipal. Os linfonodos viscerais foram mantidos congelados (-20°C) até o momento do processamento para o diagnóstico microbiológico.

#### **4.3. Diagnóstico microbiológico de *C. pseudotuberculosis* e outras bactérias**

O material aspirado dos 197 linfonodos com linfadenite foi cultivado em aerobiose a 37°C, nos meios de ágar acrescido de sangue ovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey. O ágar MacConkey foi mantido por até 24 horas e o ágar sangue por até 96 horas. A identificação dos micro-organismos foi realizada segundo as características morfotintoriais, bioquímicas e de cultivo (KRIEG e HOLT, 1994; QUINN et al., 1994, 2005). Os 202 linfonodos sem lesões aparentes colhidos na linha de abate foram descongelados e, após flambagem da superfície, foi colhido assepticamente pequeno fragmento do tecido visando cultivo microbiológico em ágar sangue e ágar MacConkey, nas mesmas condições supracitadas (GUAZZELLI, 2009). Não foram utilizados também linfonodos abscedados, tampouco linfonodos incisados na linha de abate.

As linhagens sugestivas de *C. pseudotuberculosis* isoladas no ágar sangue foram submetidas ao teste de CAMP, frente à linhagem padrão de *Rhodococcus equi* (ATCC 33.701+). A caracterização dos biovares (biotipos) *equi* ou *ovis* foi realizada fenotipicamente (método bioquímico), mediante a

redução ou não, respectivamente, do nitrato para nitrito (QUINN et al., 1994, 2005). O diagnóstico microbiológico foi realizado no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP. Os isolados de *C. pseudotuberculosis* foram mantidos estocados no meio de Lignières (25°C), para posterior caracterização molecular das linhagens.

#### **4.4. Cultivo microbiológico de *Mycobacterium* sp.**

Como diagnóstico diferencial, foi investigada a presença de micobactérias nos linfonodos. Para a descontaminação dos fragmentos, foi utilizado o método de Petroff e, em seguida, o material cultivado nos meios de Stonebrink e Löwenstein-Jensen.

Cerca de um grama de cada linfonodo foi triturado em 5mL de solução fisiológica estéril em gral esterilizado, visando a descontaminação pelo método de Petroff (CORRÊA e CORRÊA, 1973). A descontaminação foi realizada com hidróxido de sódio (NaOH) a 8%, por 30 minutos, em estufa a 37°C. Subsequente, o pH foi ajustado com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 8%, ambos na concentração de 1mol. L<sup>-1</sup>. Em seguida, o material foi submetido a duas centrifugações, para o término da descontaminação. O sobrenadante foi descartado e uma alíquota das amostras descontaminadas foi semeada nos meios de Stonebrink-Lesslie e Löwestein-Jensen, contidos em garrafas plásticas com tampa de rosca, utilizadas em cultura celular (QUINN et al., 1994; LARA et al., 2011).

Os meios de Stonebrink-Lesslie e Löwestein-Jensen foram incubados em aerobiose a 37°C e observados, semanalmente, por 90 dias. As garrafas foram mantidas incubadas em posição horizontal, favorecendo o contato do inóculo com toda a superfície e a secagem da fração líquida. As colônias sugestivas do gênero *Mycobacterium* foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen (QUINN et al., 1994). Na presença de bacilos álcool-ácido resistentes, as espécies de *Mycobacterium* foram caracterizadas pela técnica molecular de PCR Restriction Assay (PRA) [LARA et al., 2011]

#### **4.5. Diagnóstico citológico**

O material aspirado visando o diagnóstico citológico dos micro-organismos foi distendido em lâminas de microscopia, de extremidade fosca. As lâminas foram submetidas às colorações de Gram e Panóptico (RIBEIRO et al., 2001).

A presença de micro-organismos com aspecto “corineforme” nas colorações de Gram e/ou Panóptico foi comparada com o isolamento dos agentes no cultivo microbiológico.

#### **4.6. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”**

Todos os isolados caracterizados fenotipicamente como *C. pseudotuberculosis* foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos (CLSI 2005, 2006), frente a diferentes antimicrobianos, a saber: ampicilina (10µg), azitromicina (15µg), ceftiofur (30µg), enrofloxacino (5µg), eritromicina (15µg), florfenicol (30µg), penicilina G (10 unidades), rifampicina (5µg) e sulfadiazina/trimetoprim (25µg). Os isolados que apresentaram resistência simultânea a três ou mais dos antimicrobianos testados foram considerados multirresistentes.

#### **4.7. Detecção molecular de isolados de *C. pseudotuberculosis***

Todos os isolados de *C. pseudotuberculosis* foram encaminhados em tubos com tampa de borracha contendo meio de Lignières, a 25°C, para o Laboratório de Genética Celular e Molecular do Departamento de Biologia Geral (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, para caracterização molecular dos isolados.

O método empregado foi o PCR multiplex (mPCR), visando a detecção de três genes bacterianos distintos: 16S rRNA, *rpoB* (RNA polimerase da  $\beta$ -subunidade ribossomal) e *pld* (exotoxina fosfolipase D).

A metodologia para a extração de DNA genômico foi realizada como descrita por Pacheco et al. (2007), com modificações. Os isolados foram semeados em 30 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 48 horas a 37°C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 4°C, a 5000 rpm, durante 20 minutos. O “pellet” formado foi ressuspensionado em 0,6 mL de Tris/EDTA [10 mM Tris/HCl (pH 7,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), 300 mM NaCl] e transferido para microtubos contendo beads [Microorganism lysing VK01 – KT03961-1-005.2 (2 mL), Precellys Lysing Kit, Bertin]. Em seguida foram dispostos no equipamento Precellys® 24 para etapa de lise mecânica.

Foram utilizados dois ciclos de 15 segundos a 6.500 rpm com intervalo de 30 segundos. Após esta etapa, foi adicionado aos tubos fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O material homogeneizado em vortex e centrifugado por 7 minutos a 13.000 rpm. A fase superior foi transferida para novos tubos e adicionado 1 mL de clorofórmio, novamente homogeneizado em vortex e centrifugado por 7 minutos a 13.000 rpm. Por fim, a fase superior foi retirada e colocada em novos tubos para a reação de precipitação com 2,5 vezes o volume de etanol etílico, 10% do volume de NaAc 3M e 1% do volume de glicogênio (20mg/mL). Em seguida, as amostras foram mantidas *over night* a – 20°C.

Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm. 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 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa a 50°C, por 40 minutos. O DNA foi resuspendido em 40 µL de água MilliQ 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 resuspendido.

Os primers utilizados no estudo foram de acordo com os descritos por Çetinkaya et al. (2002) e Pacheco et al. (2007): 16S-F (5'-ACCGCACTTTAGTGTGTGTG-3'), 16S-R (5'-CTCTACGCCGATCTTGTAT-3'), C2700F (5'-CGTATGAACATCGGCCAGGT-3'), C3130R (5'-TCCATTTCGCCGAAGCGCTG-3'), PLD-F (5'-ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA-3'), e PLD-R2 (5'-ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG-3'). As amostras foram submetidas à técnica de PCR multiplex baseando-se no protocolo estabelecido

por Pacheco et al. (2007). As reações foram realizadas em termociclador (PTC – 100™ Programable Thermal Controller, MJ Research, Inc.), nas seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1 minuto e anelamento a 58°C por 40 segundos. A extensão foi realizada inicialmente a 68°C por 1:30 minutos e extensão final a 68°C por 7 minutos. Para evitar evaporação das amostras durante as reações no termociclador foi adicionado, em cada tubo, 20 µL de óleo mineral. Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de ágar (1%) corado com brometo de etídeo para a visualização dos produtos de amplificação (Pacheco et al., 2007)

#### **4.8. Cálculo Amostral e análise estatística**

Com base em um erro de 6% e nível de confiança de 95% seria necessário a colheita de material de, no mínimo, 188 animais, visando a comparação entre os resultados do diagnóstico microbiológico, citológico e PCR.

O isolamento microbiológico de *C. pseudotuberculosis* foi confrontado com os dados epidemiológicos, visando a associação dos resultados em tabelas de contingência pelos testes de  $\chi^2$ , Exato de Fischer ou G de Williams (TRIOLA, 2005). As variáveis com valores de P menores que 0,25 foram reavaliadas em modelos multivariados. Nestes modelos de regressão logística as variáveis foram selecionadas pelo método de “backward stepwise”, computando a significância estatística da exclusão de cada variável por teste de razão de verossimilhança ( $p < 0,05$ ). O ajuste de cada modelo foi verificado utilizando-se o teste de Hosmer-Lemeshow (BINGHAM et al., 2010). Todas as análises foram realizadas no programa Epi-Info 7 (Centers for Disease Control, Atlanta).

Os parâmetros de eficiência do método citológico foram confrontados com os resultados do isolamento microbiológico (“padrão-ouro”) utilizando a planilha proposta por Mackinnon (2010).

## 5. Resultados

Foram citoaspirados 197 amostras de linfonodos de ovinos apresentando aumento de volume (linfadenite), provenientes de criatórios da região centro-oeste e sudeste paulista.

Da totalidade dos linfonodos foram isolados micro-organismos em 148 (75,1%) amostras. Dos 197 linfonodos, em 86 (43,7%) foi obtido o isolamento de *C. pseudotuberculosis* e 111(56,4%) amostras foram negativas para o isolamento de *C. pseudotuberculosis*. Em 49 (24,9%) amostras de linfonodos não foi obtido o isolamento de nenhum micro-organismo (Tabela 1).

**Tabela 1. Micro-organismos isolados de 197 linfonodos citoaspirados de ovinos. Botucatu, SP, 2012.**

| Micro-organismos                                              | Nº de amostras |
|---------------------------------------------------------------|----------------|
| <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>                     | 86 (43,7%)     |
| <i>Streptococcus</i> sp. + <i>Bacillus</i> sp.                | 17 (8,7%)      |
| <i>Trueperella</i> ( <i>Arcanobacterium</i> ) <i>pyogenes</i> | 12 (6,1%)      |
| <i>Staphylococcus</i> sp.                                     | 11 (5,6%)      |
| <i>Streptococcus</i> sp.                                      | 3 (1,5%)       |
| <i>Escherichia coli</i>                                       | 3 (1,5%)       |
| <i>Staphylococcus</i> hemolítico                              | 2 (1,0%)       |
| <i>Streptococcus</i> β-hemolítico                             | 2 (1,0%)       |
| <i>Streptococcus</i> α-hemolítico                             | 2 (1,0%)       |
| <i>Hafnia alvei</i>                                           | 1 (0,5%)       |
| Negativo                                                      | 49 (24,9%)     |
| Total                                                         | 197 (100,0%)   |

*C. pseudotuberculosis* foi o micro-organismo mais frequente isolado dos linfonodos, seguido por *Streptococcus* sp., *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes* e *Staphylococcus* sp., e outros gêneros bacterianos em menor frequência (Tabela 1) em 31,4% da amostragem.

Na citologia aspirativa, 97 (49,2%) apresentaram micro-organismos pleomórficos (“corineforme”) e 100 (50,8%) amostras não revelaram agentes com este aspecto ou não foi observado nenhum micro-organismo no exame citológico. A Tabela 2 apresenta a associação entre o isolamento microbiano e a citologia.

**Tabela 2. Associação do isolamento microbiológico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) em linfonodos de ovinos. Botucatu, SP, 2012.**

| Isolamento      | CAAF       |             | Total        |
|-----------------|------------|-------------|--------------|
|                 | Positivo*  | Negativo    |              |
| <b>Positivo</b> | 85 (43,1%) | 1 (0,5%)    | 86 (43,6%)   |
| <b>Negativo</b> | 12 (6,1%)  | 99 (50,3%)  | 111 (56,4%)  |
| <b>Total</b>    | 97 (49,2%) | 100 (50,8%) | 197 (100,0%) |

\* positivo = aspecto “corineforme”

Foi observada alta concordância entre os resultados positivos na citologia e o isolamento microbiano, bem como para o resultado negativo na citologia e negativo no isolamento microbiano. Em contraste, em 12 (6,1%) animais foram encontrados micro-organismos de aspecto “corineforme” sem o isolamento de *C. pseudotuberculosis*. Em somente um (0,5%) animal foi obtido o isolamento positivo de *C. pseudotuberculosis* sem a presença à citologia de micro-organismos “corineformes”.

Das 86 amostras de linfonodos com isolamento microbiológico de *C. pseudotuberculosis* que foram submetidas ao diagnóstico molecular, 64 (74%) foram confirmadas como *C. pseudotuberculosis* e 22 (26%) consideradas negativas para esta espécie.

O perfil de sensibilidade microbiana “*in vitro*” de *C. pseudotuberculosis* mostrou 100% de sensibilidade dos isolados frente a ampicilina, azitromicina, ceftiofur, enrofloxacino, eritromicina, florfenicol, penicilina G e rifampicina e 90% para sulfadiazina/trimetoprim. Foram observadas seis linhagens resistentes e três parcialmente sensíveis frente a sulfadiazina/trimetoprim (Tabela 3).

**Tabela 3. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” de 86 linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas de linfonodos de ovinos. Botucatu, SP, 2012.**

| Antimicrobiano           | Sensível         | PS        | resistente         | Total       |
|--------------------------|------------------|-----------|--------------------|-------------|
|                          | nº sensíveis (%) | Nº PS (%) | nº resistentes (%) |             |
| Ampicilina               | 86 (100,0%)      | 0 (0%)    | 0 (0%)             | 86 (100,0%) |
| Azitromicina             | 86 (100,0%)      | 0 (0%)    | 0 (0%)             | 86 (100,0%) |
| Ceftiofur                | 86 (100,0%)      | 0 (0%)    | 0 (0%)             | 86 (100,0%) |
| Enrofloxacino            | 86 (100,0%)      | 0 (0%)    | 0 (0%)             | 86 (100,0%) |
| Eritromicina             | 86 (100,0%)      | 0 (0%)    | 0 (0%)             | 86 (100,0%) |
| Florfenicol              | 86 (100,0%)      | 0 (0%)    | 0 (0%)             | 86 (100,0%) |
| Penicilina G             | 86 (100,0%)      | 0 (0%)    | 0 (0%)             | 86 (100,0%) |
| Rifampicina              | 86 (100,0%)      | 0 (0%)    | 0 (0%)             | 86 (100,0%) |
| Sulfadiazina/Trimetoprim | 77 (89,5%)       | 3 (3,5%)  | 6 (7,0%)           | 86 (100,0%) |

PS = parcialmente sensíveis

Nas 202 amostras colhidas de linfonodos mediastínicos e mesentéricos de ovinos de abatedouro houve predomínio de isolamento dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, isolados ou em associação, seguidos de outros micro-organismos em menor frequência. No entanto, não foi observado o isolamento de nenhuma linhagem de *C. pseudotuberculosis* (Tabela 4).

**Tabela 4. Micro-organismos isolados, em cultura pura ou em associação, em 202 amostras de linfonodos mediastínicos e mesentéricos sem lesão aparente de ovinos de abatedouros. Botucatu, SP, 2012.**

| Micro-organismo                                                                        | Valor absoluto | Valor relativo (%) |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------|
| <i>Staphylococcus</i> sp.                                                              | 53             | 26,23%             |
| <i>Streptococcus</i> sp.                                                               | 07             | 3,46%              |
| <i>Streptococcus</i> sp. $\beta$ -hemolítico                                           | 07             | 3,46%              |
| <i>Streptococcus</i> sp. $\alpha$ -hemolítico                                          | 06             | 2,97%              |
| <i>Escherichia coli</i>                                                                | 04             | 1,98%              |
| <i>Bacillus</i> sp.                                                                    | 03             | 1,48%              |
| <i>Enterobacter</i> sp.                                                                | 02             | 0,99%              |
| <i>Micrococcus</i> sp.                                                                 | 01             | 0,49%              |
| <i>Staphylococcus</i> sp.+ <i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolítico                    | 13             | 6,43%              |
| <i>Staphylococcus</i> sp.+ <i>Streptococcus</i> sp.                                    | 10             | 4,95%              |
| <i>Staphylococcus</i> sp. + <i>Streptococcus</i> $\alpha$ - hemolítico                 | 04             | 1,98%              |
| <i>Streptococcus</i> $\alpha$ - hemolítico + <i>Streptococcus</i> $\beta$ - hemolítico | 02             | 0,99%              |
| Negativo                                                                               | 90             | 44,5               |
| Total                                                                                  | 202            | 100%               |

Em nenhuma das amostras de linfonodos obtidos dos ovinos com linfadenite, tampouco dos linfonodos de animais de abatedouro, foram isolados micro-organismos do gênero *Mycobacterium*.

A Tabela 5 sumaria os resultados do isolamento microbiano, citologia e PCR visando à detecção de *C. pseudotuberculosis* em linfonodos de ovinos com linfadenite e em linfonodos de ovinos de abatedouro, sem alterações aparentes.

**Tabela 5. Identificação de *C. pseudotuberculosis* no cultivo microbiano, CAAF e PCR em ovinos com linfadenite e em linfonodos de ovinos de abatedouro sem sinais aparentes de linfadenite. Botucatu, SP, 2012.**

| Teste          | Resultado | Linfonodos de ovinos com linfadenite | Linfonodos de ovinos sem lesões de abatedouro |
|----------------|-----------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>CAAF</b>    | +         | 97                                   | 0                                             |
|                | -         | 100                                  | 202                                           |
|                | Total     | 197                                  | 202                                           |
| <b>Cultura</b> | +         | 86                                   | 0                                             |
|                | -         | 111                                  | 202                                           |
|                | Total     | 197                                  | 202                                           |
| <b>PCR</b>     | +         | 64                                   | 0                                             |
|                | -         | 22                                   | 0                                             |
|                | Total     | 86                                   | 0                                             |

+ = positivo

- = negativo

+\* = aspecto “corineforme”

CAAF = citologia aspirativa com agulha fina

Dentre os dados epidemiológicos inqueridos foi observada significância estatística ( $P < 0,05$ ) e alto odds ratio (OR) para animais acima de 3,2 anos (OR=9,14) e propriedades com histórico de movimentação de animais, principalmente para a comercialização de matrizes (OR=5,47) e reprodutores (OR=6,45) [Anexo 1].

## 6. Discussão

### 6.1. Etiologia da linfadenite caseosa

No presente estudo, o isolamento de *C. pseudotuberculosis* foi observado em 43,7% dos ovinos com linfadenite em cultivo microbiano. Daniel et al. (2009), no estado de São Paulo, identificaram *C. pseudotuberculosis* no cultivo microbiológico em 26,4% dentre 132 amostras coletadas de linfonodos de ovinos. Ribeiro et al. (2011), também no estado de São Paulo, identificaram *C. pseudotuberculosis* em 73% dentre 100 linfonodos de ovinos amostrados de ovinos com linfadenite. Na Paraíba, Andrade et al. (2012) em estudo de ocorrência da doença e fatores de risco obtiveram 68,2% dos ovinos acometidos por *C. pseudotuberculosis* em 15 amostras, enquanto Souza et al. (2011), no mesmo estado, em estudo de prevalência obtiveram 74,5% de amostras positivas para *C. pseudotuberculosis* dentre 51 amostras encaminhadas para o cultivo microbiológico. O conjunto destes achados reafirma *C. pseudotuberculosis* como o micro-organismo mais prevalente na gênese da linfadenite caseosa em ovinos (DOMINGUES e LANGONI, 2001).

Apesar do predomínio de *C. pseudotuberculosis* nos ovinos amostrados com linfadenite, foram identificados também outros micro-organismos, com referência especial aos estafilococos, estreptococos e enterobactérias, em 31,4% dos animais. Este achado reforça a importância do diagnóstico diferencial de *C. pseudotuberculosis* de outros micro-organismos na casuística da linfadenite caseosa em ovinos (RIBEIRO et al., 2011).

A complicação mais preocupante da linfadenite caseosa ovina é representada pela disseminação da bactéria dos linfonodos superficiais, externos ou “palpáveis” para os linfonodos e/ou órgãos viscerais (PUGH, 2005; RADOSTITS et al., 2007). Em nenhum dos 202 linfonodos viscerais (mesentéricos e mediastínicos) de ovinos colhidos de animais no momento do abate foi isolado *C. pseudotuberculosis*. Em contraste, foram identificados outros micro-organismos de origem bacteriana, com predomínio de estafilococos, estreptococos e enterobactérias, e suas associações. Resultado similar foi obtido por Ribeiro et al. (2011) na mesma região em 100 linfonodos viscerais de ovinos colhidos em abatedouro no estado de São Paulo. No

presente estudo não houve isolamento de *C. pseudotuberculosis* nos linfonodos viscerais, sendo assim, não foi possível afirmar que o micro-organismo infecta preferencialmente os linfonodos da cadeia linfática externa ou “palpáveis” (submandibulares, parotídeos, pré-femorais, poplíteos e pré-escapulares).

Apesar das descrições recentes de tuberculose em pequenos ruminantes, incluindo no Brasil (CYRILLO, 2006; ALMEIDA, 2009), não foram identificados micro-organismo do gênero *Mycobacterium* nos linfonodos amostrados de ovinos com linfadenite, tampouco de linfonodos de animais de abatedouro. Este resultado indica, provavelmente, a baixa ocorrência da doença na espécie, na região estudada, embora não exima a necessidade de incluir micro-organismos do gênero *Mycobacterium* no diagnóstico diferencial de *C. pseudotuberculosis*, devido às similaridades clínicas das infecções em pequenos ruminantes por estas bactérias.

### **Teste de sensibilidade microbiana “in vitro” (antibiograma)**

Dentre as 86 linhagens de *C. pseudotuberculosis*, todas foram sensíveis “in vitro” - no método de difusão em discos - frente à ampicilina, azitromicina, ceftiofur, enrofloxacino, eritromicina, florfenicol, penicilina G e rifampicina. Apenas três (3,5%) e seis (7,0%) isolados foram, respectivamente, parcialmente sensíveis e resistentes a sulfadiazina/trimetoprim, não sendo observado no presente estudo a presença de linhagens multirresistentes.

No Brasil, em estudo similar realizado no Recife abordando o perfil de sensibilidade “in vitro” de 31 isolados de *C. pseudotuberculosis* em pequenos ruminantes, Abreu et al. (2007) testando 14 antimicrobianos, obtiveram sensibilidade das linhagens  $\geq 90\%$  para seis antimicrobianos (cloranfenicol, ciprofloxacino, norfloxacino, cefazolina, tetraciclina e amoxicilina),  $>70\%$  para três fármacos (penicilina, lincomicina e ampicilina). Abreu et al. (2007) obteve eficácia de 87% para sulfadiazina, de forma semelhante ao resultado encontrado no presente estudo, de 90% de efetividade do fármaco. Muckle e Gyles (1982) investigando o perfil de sensibilidade “in vitro” de 26 isolados de *C. pseudotuberculosis* obtidos de linfadenite caseosa de caprinos, reportaram que todas as linhagens foram sensíveis a ampicilina, cloranfenicol, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, penicilina G e sulfadiazina/trimetoprim. No mesmo

estudo, apenas três isolados foram sensíveis a neomicina e todas foram resistentes a estreptomicina, de maneira similar ao observado nos isolados do presente estudo.

Hassan et al. (2011) na Arábia Saudita, testando 17 antimicrobianos em 18 linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas de linfonodos de ovinos, observaram que todos os isolados foram sensíveis a seis antimicrobianos, incluindo a rifampicina, à semelhança do encontrado no presente estudo, visto que todas as 86 linhagens foram sensíveis a rifampicina. Ainda no estudo Hassan et al. (2011), as 18 linhagens foram resistentes a quatro antimicrobianos incluindo a eritromicina e a penicilina. Este resultado diverge do encontrado nos animais amostrados, visto que as 86 linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas foram sensíveis a eritromicina e penicilina G. Ainda que vários estudos tenham observado elevada sensibilidade “in vitro” de isolados de *C. pseudotuberculosis* obtidos de pequenos ruminantes a diferentes fármacos, o tratamento “in vivo” da doença geralmente surte pouco efeito. O insucesso do tratamento da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes pode encontrar justificativa na localização intracelular do patógeno ou mesmo pela formação de piogranuloma pela bactéria, que dificulta a inativação do micro-organismo, ou que os fármacos convencionais atinjam concentrações efetivas no foco infeccioso (PUGH, 2005; DORELLA et al., 2006; RADOSTITS et al., 2007).

### **Citologia aspirativa com agulha fina**

Vários métodos têm sido utilizados nas últimas décadas para o diagnóstico da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes, incluindo testes sorológicos, de resposta imune celular e, recentemente, técnicas de biologia molecular (RIBEIRO et al., 2001, DORELLA et al., 2006, RADOSTITS et al., 2007). Contudo, a dificuldade da utilização dos testes sorológicos visando o descarte individual dos animais soropositivos, ou mesmo a ocorrência de reações inespecíficas, tem limitado o uso destes testes na rotina diagnóstica da doença em pequenos ruminantes. Na prática, o isolamento microbiano de *C. pseudotuberculosis* a partir do cultivo de material purulento de linfonodos, abscessos e órgãos ainda representa o procedimento mais utilizado na rotina de diagnóstico da doença (RIBEIRO et al., 2001, MOTTA et al., 2010).

A citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) foi utilizada pioneiramente no Brasil por Ribeiro et al. (2001) visando o diagnóstico da linfadenite caseosa. Neste estudo foi possível isolar *C. pseudotuberculosis* em sete dentre onze amostras de material purulento obtidas de caprinos com linfadenite, bem como visualizar micro-organismos “corineformes” corados pelos métodos de Gram e Giemsa. Os autores enfatizaram que a técnica se mostrou de fácil execução, de baixo custo e de reduzida agressão tecidual se comparada a outras técnicas de diagnóstico em tecidos, como a histopatologia.

A CAAF tem sido utilizada nos últimos anos como método de diagnóstico de triagem da linfadenite caseosa nas exposições ranqueadas de ovinos da Associação Paulista de Criadores de Ovinos (ASPACO), desde 2004. Este procedimento tem impedido a entrada e/ou a permanência de animais com a doença nos recintos (OLIVEIRA, 2009; MOTTA et al., 2010), minimizando os riscos de disseminação do micro-organismo em animais comercializados nos eventos. Estudo realizado em 2009 comparou a CAAF, o exame microbiológico, ELISA e PCR no diagnóstico da linfadenite caseosa em 26 ovinos sintomáticos (linfonodos enfartados e abscedados) e em 129 assintomáticos, e observou alta especificidade do cultivo bacteriano (98,0%) e do método citológico (94,%) (RIBEIRO, 2009). Dados do presente estudo mostraram que dos 197 fragmentos de linfonodos coletados por punção aspirativa de ovinos com linfadenite, em 86 (43,7%) foi possível o isolamento microbiano de *C. pseudotuberculosis*. Neste mesmo material, 97 (49,2%) amostras acusaram à microscopia, micro-organismos pleomórficos, de aspecto “corineforme”. Foi observada boa concordância nos animais amostrados entre o cultivo microbiológico e a CAAF. Em somente um animal foi encontrada citologia negativa com a presença de isolamento microbiano, enquanto em 12 animais foram observados micro-organismos “corineformes” sem o isolamento de *C. pseudotuberculosis*. Estes achados permitem afirmar que a CAAF possibilita o diagnóstico presuntivo de ovinos com linfadenite caseosa por *C. pseudotuberculosis*, e que este procedimento pode contribuir para a adoção de ações de profilaxia e controle da doença nos criatórios. Adicionalmente, esta técnica citológica se mostra eficiente como método de triagem na rotina de admissão de pequenos ruminantes em exposições e feiras de animais, restringindo a entrada e permanência de animais com aumento de linfonodos

contendo micro-organismos de aspecto “corineforme” à citologia (OLIVEIRA, 2009), até que se proceda à confirmação diagnóstica por cultivo microbiológico ou por outros métodos como a PCR.

No presente estudo, a CAAF identificou micro-organismos “corineformes” em 97 linfonodos, dos quais 86 linhagens foram identificadas como *C. pseudotuberculosis* e 11 como *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*. Resultado similar foi encontrado por Ribeiro et al. (2001), que identificou *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes* em 6(6%) animais dentre 100 ovinos com linfadenite. Tal inespecificidade da CAAF na linfadenite ovina é esperada, visto que na morfologia à microscopia, *C. pseudotuberculosis* e *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes* são praticamente indistinguíveis. (MOTTA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2011). No entanto, tal limitação não inviabiliza o uso do método citológico, visto que a linfadenite ovina causada por *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes* geralmente é de baixa frequência. Este achado reforça que a associação de métodos, como o citológico e o microbiológico, possibilitam o aumento da eficiência do diagnóstico da linfadenite infecciosa em ovinos.

## PCR

Pacheco et al. (2007) no Brasil desenvolveram ensaio de PCR multiplex com o objetivo de amplificar simultaneamente três genes específicos de *C. pseudotuberculosis* na mesma reação, visando o diagnóstico da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes: 16S rDNA (RNA ribossômico 16S), *rpoB* (responsável pela síntese da subunidade beta da RNA polimerase), e *pld* (exotoxina fosfolipase D). Tal modificação é justificada, em parte, para minimizar as reações cruzadas entre *C. pseudotuberculosis* com *Corynebacterium ulcerans* (DORELLA et al., 2006).

Ilhan (2013) em estudo realizado na Turquia com 147 amostras de abscessos de linfonodos (pré-escapular e mediastínico) de carcaças ovinas, obteve o isolamento de *C. pseudotuberculosis* em 81(55%) amostras. Destas, 80 (98%) amostras foram positivas a PCR. Neste estudo os autores utilizaram o primer *pld* descrito por Pacheco et al. (2007), porém não foi utilizada a técnica de multiplex.

No presente estudo utilizando a técnica de PCR multiplex com modificações propostas por Pacheco et al. (2007) foram detectadas 74% de amostras positivas e 26% negativas, de um total de 86 estirpes de *C. pseudotuberculosis* identificadas pelo cultivo microbiológico. Este resultado difere do encontrado por Çetinkaya et al. (2002), que dentre 96 linhagens identificadas como *C. pseudotuberculosis* pelo método microbiológico, 93 (97%) foram positivas ao PCR. Tal discrepância de resultados pode ser justificada pelas modificações na técnica de multiplex proposta por Pacheco et al. (2007), que reduz a possibilidade de resultados cruzados com *C. ulcerans*. Outro fator que pode ser considerado, é que no estudo de Çetinkaya et al. (2002) foi utilizado apenas o primer 16S rRNA, enquanto no presente estudo foram utilizados os primers 16S rRNA, *rpoB* e *pId*, aumentando assim a sensibilidade do teste para *C. pseudotuberculosis*.

A técnica de PCR aplicada ao diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* possibilita apresenta boa sensibilidade e especificidade, rapidez de resultados e automação, permitindo a confirmação do micro-organismo em material proveniente de culturas bacterianas, ou a detecção do micro-organismo em material purulento de linfonodos, ainda que o patógeno não esteja viável (DORELLA et al., 2006). No entanto, ainda apresenta como limitação o número restrito de laboratórios que disponibilizam a técnica na rotina diagnóstica. Desta forma, caracteriza-se como alternativa viável de diagnóstico ao método convencional microbiológico, se constituindo em método promissor no controle/profilaxia da linfadenite caseosa ovina.

### **Dados epidemiológicos**

Foi observado alto odds ratio e associação estatística entre a presença da linfadenite nos ovinos amostrados em idade reprodutiva, particularmente em propriedades com histórico de comercialização de animais. No entanto, não foram encontrados - na literatura consultada - dados similares de avaliação de indicadores epidemiológicos ou de risco da doença, que possibilitassem confrontar os dados dos animais do presente estudo. Não obstante, os achados encontrados nos animais amostrados e propriedades sinalizam a necessidade da adoção de medidas de controle e profilaxia visando evitar a

disseminação da doença, notadamente para procedimentos que envolvam a movimentação de animais entre criatórios;

Diante do potencial de disseminação do patógeno e da ineficácia do tratamento, faz-se necessária a adoção de medidas rigorosas de profilaxia da linfadenite caseosa nos rebanhos, que incluem evitar a aquisição de animais de locais endêmicos, fomentar o controle da movimentação de animais, bem como medidas de higiene dos utensílios de uso comum nos animais, a adoção da vacinação, quarentena e o descarte gradual de animais infectados (PUGH, 2005; RADOSTITS et al., 2007).

## 7. Conclusões

- ✓ A alta frequência de isolamento de *C. pseudotuberculosis* nos linfonodos dos ovinos com linfadenite confirma o predomínio do micro-organismo na linfadenite caseosa nesta espécie;
- ✓ A presença de outros micro-organismos como estafilococos, estreptococos e enterobactérias isolados dos ovinos com linfadenite denota a importância do diagnóstico microbiológico nas infecções em linfonodos na espécie;
- ✓ Os isolados de *C. pseudotuberculosis* mostraram alta sensibilidade “in vitro” aos diferentes antimicrobianos testados, apesar das dificuldades de tratamento dos animais acometidos, provavelmente devido às características de localização intracelular e formação de piogranulma nas infecções pela bactéria em ovinos, que dificultam a ação “in vivo” dos fármacos;
- ✓ A ausência de isolamento de *C. pseudotuberculosis* em linfonodos viscerais reforça o predomínio da infecção dos linfonodos externos (“palpáveis”) e a baixa ocorrência da forma “visceral” ou disseminada da infecção;
- ✓ A concordância observada entre a CAAF e o cultivo microbiológico nos animais com isolamento de *C. pseudotuberculosis* indica a validade do exame citológico como método de triagem no diagnóstico da doença;
- ✓ A concordância na detecção de *C. pseudotuberculosis* pelo método microbiológico e PCR, em 74% dos isolados, reforça a validade do método microbiológico no diagnóstico de rotina da doença e sinaliza a necessidade de associação de métodos com intuito de otimizar a fidedignidade do diagnóstico da doença;

✓ O alto odds ratio e associação estatística entre a presença da doença em animais em idade reprodutiva, em propriedades com histórico de comercialização de animais, ratifica a necessidade da adoção de medidas de controle e profilaxia visando evitar a disseminação da doença em procedimentos que envolvam a movimentação de animais entre os criatórios;

## 8. Referências Bibliográficas

- ABREU, S.R.O. **Comparação genotípica e fenotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco, Brasil.** Recife, 2007. 71p. (Tese – Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
- ABREU, S.R.O.; MOTA, R.A.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.P.; ROSINHA, G.M.S.; CASTRO, R.S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de Pernambuco, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.3, p.502-509, 2008.
- ALMEIDA, C.A.S. **Avaliação do teste cervical comparativo no diagnóstico imunoalérgico da tuberculose em caprinos (*Capra hircus*).** São Paulo, 2009. 89p. (Dissertação – Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.
- ANDRADE, J.S.L. **Linfadenite caseosa em ovinos e caprinos criados nas micro-regiões de Piancó e Itaporanga – PB: Inquérito e fatores de risco associados à doença.** Patos, 2007. 71p. (Dissertação – Mestrado) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, PB – Universidade Federal de Campina Grande.
- ANDRADE, J.S.L.; AZEVEDO, S.; TELES, J.A.A.; HIGINO, S.S.S.; AZEVEDO, E.O. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32,n.2,p.116-120, 2012.
- ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALARNEAU, J.R.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 67-81, 2003.
- BAIRD, G.J.; FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**. v.137, p.179-210, 2007.
- BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**. v.63, p. 269-72, 1986.
- BENTO, A. H. L.; ZONI, M. S. Observações sobre a ocorrência da linfadenite caseosa em cabras confinadas no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.8, p.136-138, 1986.
- BINGHAN, G.M.; BUDKE, C.M.; SLATER, M.R. Knowledge and perceptions of dog-associated zoonoses. **Preventive Veterinary Medicine**, v.93, p.211-221, 2010.

- BRACARENSE, A.P.F.R.L.; REIS, A.C.F.; VIOTTI, N.M.A. Estudo comparativo entre o exame citológico e histopatológico nas neoplasias dos animais domésticos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA**, 15., 1993, Rio de Janeiro, RJ. *Resumos*. Rio de Janeiro: 1993. p.139.
- BRASIL - Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção da Pecuária Municipal – 2010.  
Disponível em:  
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>  
> Acessado 05 de Maio de 2013.
- BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. **Australian Veterinary Journal** v. 57, p. 105-110, 1980.
- CARMO, F.B.; GOUVEIA, A.M.G.; GUIMARÃES, A.S.; PAULETTI, R.B.; LAGE, A.P.; RAGOZO, A.M.A.; PORTELA, R.W.D.; GONÇALVES, V.S.P.; AZEVEDO, V.; HEINEMANN, M.B. Soroprevalência da linfadenite caseosa em criações comerciais de ovinos no Distrito Federal e no estado de São Paulo. In: **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009 Porto de Galinhas, PE**. Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia.
- CARVALHO, E. B.; OLIVEIRA, M. A. G.; DOMINGUES, P. F. **Base para criação de ovinos no Estado de São Paulo**. 4. ed. São Manuel, SP: Associação Paulista de Criadores de Ovinos-ASPACO, 2008. v. 1. 118 p.
- ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; De BAERE, T.; VANECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.88, p. 75–83, 2002.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. CLSI approved standard M100-S15. Wayne, PA, USA, 2005.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard** - 8th ed. CLSI document M2-A9. Wayne, PA, USA: 2006.
- CONNOR, K.M.; FONATAINE, M.C.; RUDGE, K.; BAIRD, G.J.; DONACHIE, W. Molecular genotyping of multinodular ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Research**, v.38, p.613-623, 2007.
- CORRÊA, C.N.M.; CORRÊA, W.M. Micobactérias isoladas de bovinos e suínos em São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.40, n.3, p.205-208, 1973.
- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.147-149.

- COSTA, LFM. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v.1, p.105-15, 2002.
- COSTA, M.D.M.; CÂMARA, J.K.; ROCHA, J.V.N.; MARTINEZ, T.C.N. Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia – Distribuição geográfica da doença. **Boletim do Instituto da Bahia**. v.12, n.1, p.1-7, 1973.
- CYRILLO, F.C. **Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos (*Ovis aries*)**. São Paulo, 2006. 93p. (Dissertação – Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.
- DANIEL, G.T.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A.F.C. Detecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através do cultivo microbiológico e PCR de amostras ovinas suspeitas de linfadenite caseosa no estado de São Paulo, SP. **Biológico**, v.71,n.2,p.21, 2009.
- DANIEL, G.T.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A.F.C.; DOMINGUES, P.F. **Estudo de parâmetros de constituintes do leite e plasma sanguíneo, possível associação do polimorfismo genético-bioquímico das beta-globulinas e transferrinas e exame citológico nas mastites bovinas subclínicas**. Botucatu: 1999. 121p. (Tese - Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista.
- DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. **Manejo Sanitário Animal**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas Ltda. - EPUB, 2001. 210 p.
- DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v.37, p.201–218, 2006.
- ECKERSAL, P.D.; LAWSON, F.P.; BENICE, L.; WATERSON, M.M.; LANG, T.L.; DONACHE, W.; FONTAINE, M.C. Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, v.3, p.35, 2007.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. Produção de leite no mundo em 2001. Disponível em: <<http://japy.com/htmlgb/lait/monde.htm>> Acesso em 10 de maio 2013.
- GUZZELLI, A. **Virulência de linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de linfonodos de suínos e javalis (*Sus scroffa*) de abatedouros**. Botucatu, 2009. 55p. (Dissertação – Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP - Universidade Estadual Paulista.
- GUEDES, R.C.M.; NOGUEIRA, R.H.G.; TUDURY, E.A. Diagnóstico citológico de lesões proliferativas e inflamatórias através da técnica de punção de tecidos com agulha fina. **Hora Veterinária**, n.96, p.15-21, 1997.

- GUIMARÃES, A.S.; SEYFFERT, N.; BASTOS, B.L.; PORTELA, R.W.D.; MEYER, R.; CARMO, F.B.; CRUZ, J.C.M.; McCULLOCH, J.A.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**. v.87, p.86-91, 2009.
- GUIMARÃES, A.S.; CARMO, F.B.; PAULETTI, R.B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. GOUVEIA, A.M.G. Caseous Lymphadenitis: Epidemiology, Diagnosis and Control. **The IIOAB Journal**, v.2, p.33-43, 2011.
- HASSAN, N.A.; AL-HUMIANY, A.A.; BAHOBAIL, A.; MANSOUR, A. Bacteriological and Pathogenical Studies on Caseous Lymphadenitis in Sheep in Saudi Arabia. **International Journal of Microbiological Research**, v.2, p.28-37, 2011
- ILHAN, Z. Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.164, n.2, p.60-66, 2013.
- JUNIOR, C.J.; RODRIGUES, L.S.; MORAES, V.E.G. Onivocaprinocultura de corte – a convivência dos extremos. **Agroindústria BNDS Setorial**, v.31, p.281-320, 2010.  
Disponível em: <  
[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes\\_pt/Institucional/Publicacoes/Consulta\\_Expressa/Setor/Agroindustria/201003\\_08.html](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Publicacoes/Consulta_Expressa/Setor/Agroindustria/201003_08.html)> Acessado: 01 de junho de 2013.
- KOMALA, T.S.; RAMLAN, M.; YEOH, N.N.; SURAYANI, A.R.; SHARIFAH HAMIDAH, S.M. A survey of caseous lymphadenitis in small ruminant farms from two districts in Perak, Malaysia-Kinta and Hilir Perak. **Tropical Biomedicine**, v.25, n.3, p.196-201, 2008.
- KRIEG, N.R. & HOLT, J.C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 984p.
- LANGENEGGER, H.; LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.11, p.1-7, 1991.
- LARA, G.H.B.; RIBEIRO, M.G.; LEITE, C.Q.F.; PAES, A.C.; GUAZZELLI, A.; SILVA, A.V.; SANTOS, A.C.B.; LISTONI, F.J.P. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). **Veterinary Science**, v.90, p.185-188, 2011.
- MACKINNON, A. A spread sheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. **Computers in Biology and Medicine**, v.30, p.127-134, 2000.

- MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAEER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.107, p.249–254, 2005.
- MCKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and play a role in macrophage death. **Microbiology**, v.153, p.2203-2211, 2007.
- MCMANUS, C.; PAIVA, S.R.; ARAÚJO, R.O. Genetics and breeding in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, p.236-246, 2010
- MOTTA, R.G.; CREMASCO, A.C.M.; RIBEIRO, M.G. Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.2, p.200-213, 2010.
- MUCKLE, C.A., GYLES, C.L., Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v.46, p.206–208, 1982.
- NICIURA, S.C.M.; VERÍSSIMO, C.J.; MOLENTO, M.B.; RODRIGUES, C.F.C.; MARGATHO, L.F.F.; COSTA, R.L.D.; CURCI, V.C.L.M. Investigação do manejo e do controle de verminose em criações de ovinos no Estado de São Paulo. São Carlos: **Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2010. 7p. (EMBRAPA – CNPC. Comunicado Técnico, 95).
- OLIVEIRA, M.A.G. Punção aspirativa aumenta o controle sanitário da linfadenite caseosa em exposições de ovinos no estado de São Paulo. **O Ovelheiro**, v.13, n.78, p.11, 2009
- OTTO DE SÁ, C. e SÁ, J.L. Origem e Domesticação dos Ovinos. Disponível em:  
<<http://www.crisa.vet.br/história.htm>>  
Acessado: 02 de Maio de 2013.
- PACHECO, L.G.C.; PENA, R.R.; CASTRO, T.L.P.; DORELLA, F.A.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; FROTA, M.N.L.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; ALVES, F.S.F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.480–486, 2007.
- PATON, M.W.; WALKER, S.B.; ROSE, I.R. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal**., v. 81, p. 91-95, 2003.
- PEEL, M.M.; PALMER, G.G.; STACPOOLE, A.M.; KERR, T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia and review. **Clinical Infectious Diseases**, v.24, p.185-191, 1997.

- PUGH, D.G. **Clínica de Ovinos e Caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. p.232-233.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B.K; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Rhodococcus equi*. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.71-73.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. p.137-143.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary medicine – A Textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p.795–798.
- RIBEIRO, D. **Análise comparativa de métodos de diagnóstico para linfadenite caseosa em ovinos sintomáticos e assintomáticos**. Araçatuba, 2009. 65p. (Dissertação – Mestrado) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba – SP – Universidade Estadual Paulista.
- RIBEIRO, M.G.; DIAS JÚNIOR, J.G.; PAES, A.C.; BARBOSA, P.; NARDI JÚNIOR, G.; LISTONI, F.J.P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 23-28, 2001.
- RIBEIRO, M.G.; BELOTTA, A.F.; FERNANDES, M.C.; GUENA, R.; JÚNIOR, G.N.; LARA, G.H.B.; GIUFFRIDA, R.; ZAMPROGNA, T.O. Citologia Aspirativa no diagnóstico da linfadenite em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.10, p.839-843, 2011
- RIBEIRO, O.C.; SILVA, J.A.H.; PEREIRA FILHO, M. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.10, n.2, p.23-24, 1988.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C.; LEMOS, R.A. Doenças de Ruminantes e Equinos. 1ª ed. São Paulo: Varela Editora e Livraria. 2001, 1000p.
- ROCHA, N.S. Citologia aspirativa por agulhas finas (CAAF). **Revista Cães e Gatos**, v.13, n.79, p.14-16, 1998.
- SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L.G.C.; PORTELA, R.W.; BASTOS, B.L.; DORELLA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; GOUVEIA, A.M.G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, A. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science** v.88, p.50-55, 2010.
- SILVA, S.F.; SANTOS, A.F.; LAUZER, J.J.; COSTA, D.F. Linfadenite caseosa em ovinos abatidos na região de Campanha do Rio Grande do Sul. **Revista do Centro de Ciências Rurais**. v.12, p.149–154, 1982.

- SOUZA, M.F.; CARVALHO, A.Q.; JUNIOR, F.G.; CORREA, F.R. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.3, p.224-230, 2011.
- SMITH, B.P. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3.ed. São Paulo: Manole. 2006. 1728p.
- 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. **Canadian Journal Veterinary Research**. v.62, p.38–43, 1998.
- TRIOLA, M.F. **Introdução à Estatística**. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 682p.
- TUDURY, E.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; GIRALDI, J.H.; BAHR, M.V. Metástase cerebral de tumor venéreo transmissível em cão. **Revista Cães e Gatos**, n.40, p.27-28, 1992.
- UNANIAN, M.M., SILVA, A.E.D.F., PANT, K.P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid North-East Brazil. **Tropical Animal Health and Production**. v.17, p.57-62, 1985
- WILLIAMSON, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**. v.17, n.2, p.359–371, 2001.
- WINTER, A.C. Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. **Veterinary Record**. v.140, p.611, 1997.

## ANEXO

**Anexo 1. Frequência absoluta e relativa de positivos e negativos para o isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos, segundo as variáveis epidemiológicas e as estatísticas associadas. Botucatu, 2012.**

|                              | Positivo |        | Negativo |        | TOTAL | Estatísticas |                   |
|------------------------------|----------|--------|----------|--------|-------|--------------|-------------------|
| Município                    | N        | %      | N        | %      | N     | Valor de P   | or (IC95% or)     |
| Bauru                        | 5        | 50,0   | 5        | 50,0   | 10    | 0,0001       | Nd                |
| Bofete                       | 26       | 42,6   | 35       | 57,4   | 61    |              | 0,74 (0,04-12,44) |
| Botucatu                     | 37       | 69,8   | 16       | 30,2   | 53    |              | 2,31 (0,14-39,31) |
| Buri                         | 0        | 0,0    | 1        | 100,0  | 1     |              | Nd                |
| Fartura                      | 2        | 5,7    | 33       | 94,3   | 35    |              | 0,06 (0,00-1,37)  |
| Itapeva                      | 1        | 7,7    | 12       | 92,3   | 13    |              | 0,08 (nd)         |
| Itararé                      | 1        | 50,0   | 1        | 50,0   | 2     |              | 1                 |
| Lenções Paulista             | 10       | 100,0  | 0        | 0,0    | 10    |              | Nd                |
| Piratininga                  | 4        | 36,4   | 7        | 63,6   | 11    |              | 0,57 (nd)         |
| Taguaí                       | 0        | 0,0    | 2        | 100,0  | 2     |              | Nd                |
| Sexo                         |          |        |          |        |       |              |                   |
| Fêmea                        | 82       | 44,09  | 104      | 55,91  | 186   | 0,6687       | 1,58 (0,46-5,42)  |
| Macho                        | 4        | 33,33  | 8        | 66,67  | 12    |              |                   |
| Faixa Etária (em anos)       |          |        |          |        |       |              |                   |
| 0,0- 0,8                     | 1        | 11,11  | 8        | 88,89  | 9     | 0,0001       | 0,50 (nd)         |
| 0,8- 1,6                     | 0        | 0,00   | 2        | 100,00 | 2     |              | Nd                |
| 1,6- 2,4                     | 1        | 20,00  | 4        | 80,00  | 5     |              | 1                 |
| 2,4- 3,2                     | 1        | 4,55   | 21       | 95,45  | 22    |              | 0,19 (nd)         |
| 3,2- 4,0                     | 32       | 69,57  | 14       | 30,43  | 46    |              | 9,14 (0,93-89,35) |
| 4,1- 5,1                     | 51       | 44,74  | 63       | 55,26  | 114   |              | 3,23 (0,35-29,88) |
| Raça                         |          |        |          |        |       |              |                   |
| Dorper                       | 5        | 83,33  | 1        | 16,67  | 6     | 0,0230       | 5,00 (nd)         |
| Ile de France                | 2        | 100,00 | 0        | 0,00   | 2     |              | Nd                |
| Mestiço                      | 3        | 100,00 | 0        | 0,00   | 3     |              | Nd                |
| Santa Inês                   | 74       | 40,44  | 109      | 59,56  | 183   |              | 0,68 (0,09-4,92)  |
| Sulffolk                     | 2        | 50,00  | 2        | 50,00  | 4     |              | 1                 |
| Local da punção              |          |        |          |        |       |              |                   |
| Abcesso cabeça               | 0        | 0,00   | 1        | 100,00 | 1     | 0,0290       | nd                |
| Inguinal                     | 11       | 91,67  | 1        | 8,33   | 12    |              | 11,00 (nd)        |
| Mamário                      | 1        | 50,00  | 1        | 50,00  | 2     |              | 1                 |
| Parotídeo                    | 16       | 57,14  | 12       | 42,86  | 28    |              | 1,33 (0,08-23,54) |
| Pele                         | 12       | 30,77  | 27       | 69,23  | 39    |              | 0,44 (0,02-7,71)  |
| Poplíteo                     | 2        | 40,00  | 3        | 60,00  | 5     |              | 0,67 (nd)         |
| Pré-escapular                | 27       | 35,53  | 49       | 64,47  | 76    |              | 0,55 (0,03-9,17)  |
| Região cervical (subcutâneo) | 0        | 0,00   | 1        | 100,00 | 1     |              | nd                |
| Subcutâneo (lombar)          | 1        | 100,00 | 0        | 0,00   | 1     |              | nd                |
| Submandibular                | 16       | 50,00  | 16       | 50,00  | 32    |              |                   |
| Úbere                        | 0        | 0,00   | 1        | 100,00 | 1     |              | nd                |
| Número Animais Propriedade   |          |        |          |        |       |              |                   |
| 000 - 160                    | 33       | 40,74  | 48       | 59,26  | 81    | 0,7752       | 2,06 (0,20-20,70) |
| 160 -  320                   | 39       | 45,88  | 46       | 54,12  | 85    |              | 2,54 (0,25-25,45) |
| 320 -  480                   | 4        | 36,36  | 7        | 63,64  | 11    |              | 1,71 (nd)         |
| 480 -  640                   | 1        | 25,00  | 3        | 75,00  | 4     |              | 1                 |
| 800 -  960                   | 9        | 52,94  | 8        | 47,06  | 17    |              | 3,37 (0,29-39,32) |
| Raças: Dorper                |          |        |          |        |       |              |                   |
| SIM                          | 44       | 48,89  | 46       | 51,11  | 90    | 0,2042       | 1,50 (0,85-2,65)  |
| NÃO                          | 42       | 38,89  | 66       | 61,11  | 108   |              |                   |
| Raças: Ile de France         |          |        |          |        |       |              |                   |
| SIM                          | 10       | 100,00 | 0        | 0,00   | 10    | 0,0007       | nd                |

|                                    |    |        |     |        |     |         |                   |
|------------------------------------|----|--------|-----|--------|-----|---------|-------------------|
| NÃO                                | 76 | 40,43  | 112 | 59,57  | 188 |         |                   |
| <b>Raças: Mestiço</b>              |    |        |     |        |     |         |                   |
| SIM                                | 10 | 100,00 | 0   | 0,00   | 10  | 0,0007  | nd                |
| NÃO                                | 76 | 40,43  | 112 | 59,57  | 188 |         |                   |
| <b>Raças: Santa Inês</b>           |    |        |     |        |     |         |                   |
| SIM                                | 76 | 41,08  | 109 | 58,92  | 185 | 0,0257  | 0,21 (0,05-0,78)  |
| NÃO                                | 10 | 76,92  | 3   | 23,08  | 13  |         |                   |
| <b>Raças: Sulffolk</b>             |    |        |     |        |     |         |                   |
| SIM                                | 10 | 83,33  | 2   | 16,67  | 12  | 0,0099  | 7,23 (1,54-33,96) |
| NÃO                                | 76 | 40,86  | 110 | 59,14  | 186 |         |                   |
| <b>Raças: Texel</b>                |    |        |     |        |     |         |                   |
| SIM                                | 5  | 50,00  | 5   | 50,00  | 10  | 0,9183  | 1,32 (0,37-4,72)  |
| NÃO                                | 81 | 43,09  | 107 | 56,91  | 188 |         |                   |
| <b>Raças: White Dorper</b>         |    |        |     |        |     |         |                   |
| SIM                                | 1  | 25,00  | 3   | 75,00  | 4   | 0,8088  | 0,43 (0,04-4,18)  |
| NÃO                                | 85 | 43,81  | 109 | 56,19  | 194 |         |                   |
| <b>Tipo de criação</b>             |    |        |     |        |     |         |                   |
| Extensivo                          | 24 | 24,24  | 75  | 75,76  | 99  |         | 0,17 (0,08-0,39)  |
| Intensivo                          | 24 | 64,86  | 13  | 35,14  | 37  | <0,0001 | 1                 |
| Semi-intensivo                     | 38 | 61,29  | 24  | 38,71  | 62  |         | 0,86 (0,37-1,99)  |
| <b>TEE: Cria</b>                   |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 54 | 39,42  | 83  | 60,58  | 137 | 0,1201  | 0,59 (0,32-1,08)  |
| Não                                | 32 | 52,46  | 29  | 47,54  | 61  |         |                   |
| <b>TEE: Venda de Matrizes</b>      |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 23 | 76,67  | 7   | 23,33  | 30  | 0,0001  | 5,47 (2,22-13,49) |
| Não                                | 63 | 37,50  | 105 | 62,50  | 168 |         |                   |
| <b>TEE: Venda de Reprodutores</b>  |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 23 | 79,31  | 6   | 20,69  | 29  | 0,0001  | 6,45 (2,49-16,69) |
| Não                                | 63 | 37,28  | 106 | 62,72  | 169 |         |                   |
| <b>TEE: Abate</b>                  |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 23 | 26,44  | 64  | 73,56  | 87  | 0,0001  | 0,27 (0,15-0,50)  |
| Não                                | 63 | 56,76  | 48  | 43,24  | 111 |         |                   |
| <b>OAE: Avicultura</b>             |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 17 | 38,64  | 27  | 61,36  | 44  | 0,5784  | 0,78 (0,39-1,54)  |
| Não                                | 69 | 44,81  | 85  | 55,19  | 154 |         |                   |
| <b>OAE: Bovinocultura de corte</b> |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 17 | 44,74  | 21  | 55,26  | 38  | 0,8573  | 1,07 (0,52-2,18)  |
| Não                                | 69 | 43,13  | 91  | 56,88  | 160 |         |                   |
| <b>OAE: Haras</b>                  |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 12 | 85,71  | 2   | 14,29  | 14  | 0,0024  | 8,91 (1,94-41,01) |
| Não                                | 74 | 40,22  | 110 | 59,78  | 184 |         |                   |
| <b>OAE: Eucalipto</b>              |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 12 | 85,71  | 2   | 14,29  | 14  | 0,0024  | 8,92 (1,94-41,01) |
| Não                                | 74 | 40,22  | 110 | 59,78  | 184 |         |                   |
| <b>OAE: Agricultura</b>            |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 2  | 40,00  | 3   | 60,00  | 5   | 0,7641  | 0,86 (0,14-5,30)  |
| Não                                | 84 | 43,52  | 109 | 56,48  | 193 |         |                   |
| <b>OAE: Bubalinocultura</b>        |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 9  | 52,94  | 8   | 47,06  | 17  | 0,5678  | 1,52 (0,56-4,12)  |
| Não                                | 77 | 42,54  | 104 | 57,46  | 181 |         |                   |
| <b>Procedência do rebanho</b>      |    |        |     |        |     |         |                   |
| Fêmeas próprias e Machos comprados | 5  | 100,00 | 0   | 0,00   | 5   |         | nd                |
| Fêmeas próprias e Machos comprados | 67 | 41,10  | 96  | 58,90  | 163 | 0,0154  | 1,11 (0,48-2,61)  |
| Todos animais comprados            | 10 | 38,46  | 16  | 61,54  | 26  |         | 1                 |
| <b>VAC: Clostridiose</b>           |    |        |     |        |     |         |                   |
| Sim                                | 86 | 45,50  | 103 | 54,50  | 189 | 0,0189  | nd                |
| Não                                | 0  | 0,00   | 9   | 100,00 | 9   |         |                   |

|                               |    |       |     |        |     |         |                     |
|-------------------------------|----|-------|-----|--------|-----|---------|---------------------|
| VAC: Pasteurella              |    |       |     |        |     |         |                     |
| Sim                           | 33 | 51,56 | 31  | 48,44  | 64  | 0,1494  | 1,63 (0,89-2,96)    |
| Não                           | 53 | 39,55 | 81  | 60,45  | 134 |         |                     |
| Quarentena de animais novos   |    |       |     |        |     |         |                     |
| Sim                           | 84 | 54,90 | 69  | 45,10  | 153 | 0,0001  | 26,17 (6,12-111,93) |
| Não                           | 2  | 4,44  | 43  | 95,56  | 45  |         |                     |
| Isolamento de animais doentes |    |       |     |        |     |         |                     |
| Sim                           | 86 | 45,03 | 105 | 54,97  | 191 | 0,0485  | nd                  |
| Não                           | 0  | 0,00  | 7   | 100,00 | 7   |         |                     |
| Ocorrência %                  |    |       |     |        |     |         |                     |
| <=0,1%                        | 32 | 45,07 | 39  | 54,93  | 71  | 0,8432  | 1,11 (0,62-1,99)    |
| >0,1%                         | 54 | 42,52 | 73  | 57,48  | 127 |         |                     |
| Movimentação de animais       |    |       |     |        |     |         |                     |
| Anual                         | 23 | 88,46 | 3   | 11,54  | 26  | <0,0001 | 30,67 (nd)          |
| Semestral                     | 31 | 33,33 | 62  | 66,67  | 93  |         | 2,00 (0,21-18,66)   |
| Trimestral                    | 31 | 43,66 | 40  | 56,34  | 71  |         | 3,1 (0,33-29,15)    |
| Mensal                        | 0  | 0,00  | 4   | 100,00 | 4   |         | nd                  |
| Semanal                       | 1  | 25,00 | 3   | 75,00  | 4   |         | 1                   |
| TM: abate                     |    |       |     |        |     |         |                     |
| SIM                           | 51 | 42,15 | 70  | 57,85  | 121 | 0,7562  | 0,87 (0,49-1,55)    |
| NÃO                           | 35 | 45,45 | 42  | 54,55  | 77  |         |                     |
| TM: exposição                 |    |       |     |        |     |         |                     |
| SIM                           | 15 | 57,69 | 11  | 42,31  | 26  | 0,1733  | 1,94 (0,84-4,47)    |
| NÃO                           | 71 | 41,28 | 101 | 58,72  | 172 |         |                     |
| TM: leilão                    |    |       |     |        |     |         |                     |
| SIM                           | 10 | 83,33 | 2   | 16,67  | 12  | 0,0099  | 7,24 (1,54-33,96)   |
| NÃO                           | 76 | 40,86 | 110 | 59,14  | 186 |         |                     |
| TM: TOP                       |    |       |     |        |     |         |                     |
| SIM                           | 17 | 38,64 | 27  | 61,36  | 44  | 0,5784  | 0,77 (0,39-1,54)    |
| NÃO                           | 69 | 44,81 | 85  | 55,19  | 154 |         |                     |
| TM: venda                     |    |       |     |        |     |         |                     |
| SIM                           | 15 | 65,22 | 8   | 34,78  | 23  | 0,0436  | 2,74 (1,11-6,82)    |
| NÃO                           | 71 | 40,57 | 104 | 59,43  | 175 |         |                     |
| Dig. linfadenite              |    |       |     |        |     |         |                     |
| Sim                           | 42 | 49,41 | 43  | 50,59  | 85  | 0,1845  | 1,53 (0,87-2,71)    |
| Não                           | 44 | 38,94 | 69  | 61,06  | 113 |         |                     |

Anexo 2. Modelo de questionário epidemiológico realizado nas propriedades com histórico de linfadenite caseosa ovina. Botucatu, 2012.



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
Serviço de Diagnóstico Microbiológico e Micológico do Hospital Veterinário

## Questionário

Propriedade:

Proprietário:

Município:

|                                                                   |                                                               |                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------|
| Data: __/__/__                                                    |                                                               | Nome do Animal<br>(identificação) |      |
| Espécie                                                           | Sexo <input type="checkbox"/> M<br><input type="checkbox"/> F | Idade                             | Raça |
| Material:<br>Características: Coloração<br>Aspecto (consistência) |                                                               |                                   |      |
| Diagnóstico/Suspeita                                              |                                                               | Tratamento Utilizado              |      |

|                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Número de animais na propriedade                                                                                                                                                       |
| Raças:                                                                                                                                                                                 |
| Sistema de criação<br><input type="checkbox"/> Extensivo <input type="checkbox"/> Semi-Intensivo <input type="checkbox"/> Intensivo                                                    |
| Tipo de exploração econômica<br><input type="checkbox"/> Cria <input type="checkbox"/> Venda de matrizes <input type="checkbox"/> Venda de reprodutores <input type="checkbox"/> Abate |
| Outras atividades exercidas na propriedade<br><input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, Quais:                                                                        |

|                                                                                                                                                   |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Procedência do Rebanho                                                                                                                            |  |
| Origem dos animais                                                                                                                                |  |
| Manejo Sanitário                                                                                                                                  |  |
| Vermifugação ( <input type="checkbox"/> ) Sim ( <input type="checkbox"/> ) Não                                                                    |  |
| Corte e desinfecção de umbigo ( <input type="checkbox"/> ) Sim ( <input type="checkbox"/> ) Não                                                   |  |
| Vacinação do rebanho ( <input type="checkbox"/> ) Sim ( <input type="checkbox"/> ) Não Quais:                                                     |  |
| Vacinação contra linfadenite ( <input type="checkbox"/> ) Sim ( <input type="checkbox"/> ) Não                                                    |  |
| Quarentena de animais oriundos de outras localidades ( <input type="checkbox"/> ) Sim ( <input type="checkbox"/> ) Não                            |  |
| Isolamento de animais doentes ( <input type="checkbox"/> ) Sim ( <input type="checkbox"/> ) Não                                                   |  |
| Histórico de linfadenite no rebanho ( <input type="checkbox"/> ) Sim ( <input type="checkbox"/> ) Não                                             |  |
| Ocorrência (%)                                                                                                                                    |  |
| Periodicidade de mov. dos animais ( <input type="checkbox"/> ) Mensal ( <input type="checkbox"/> ) Semestral                                      |  |
| Outro: _____                                                                                                                                      |  |
| Tipo de mov. ( <input type="checkbox"/> ) Exposição ( <input type="checkbox"/> ) Leilão                                                           |  |
| Outros: _____                                                                                                                                     |  |
| Diagnóstico de linfadenite ( <input type="checkbox"/> ) Sim ( <input type="checkbox"/> ) Não                                                      |  |
| Método de diagnóstico ( <input type="checkbox"/> ) Microbiológico ( <input type="checkbox"/> ) Citológico ( <input type="checkbox"/> ) Sorológico |  |