

Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco¹

Sílvio Romero de O. Abreu^{2*}, Rinaldo A. Mota³, Grácia Maria S. Rosinha⁴, Odinéia Forner⁴, José W. Pinheiro Júnior³, Renata R.B. Pereira⁴, Roberto S. de Castro³, Carina Elisei⁴, Cléber O. Soares⁴, Flávio R. Araújo⁴ e Renata C. Madureira⁴

ABSTRACT.- Abreu S.R.O., Mota R.A., Rosinha G.M.S., Forner O., Pinheiro Júnior J.W., Pereira R.R.B., Castro R.S., Elisei C., Soares C.S., Araújo F.R. & Madureira R.C. 2008. [Genotypic comparison between *Corynebacterium pseudotuberculosis* samples obtained from sheep and goats with caseous lymphadenitis, raised in the semi-arid region of Pernambuco.] Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28(10):481-487. Clínica Escola de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro de Ensino Superior de Maceió, Rodovia Divaldo Suruagy s/n, Quadra 4, Lote 4, Praia do Francês, Marechal Deodoro, AL 57160-000, Brazil. E-mail: silviobiotec@yahoo.com.br

The objective was to genotypically compare 35 samples of *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtained from abscesses of sheep and goats diagnosed with caseous lymphadenitis originated from 5 different municipalities in the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. The RFLP-PCR technique with *Hpy-Ch4* and *Msp I* and *Pst I* *Msp I* restriction enzymes was used to fingerprint the genes *rpoB* and *pld*, respectively. The results demonstrate that there was no difference on the fragments banding pattern among samples, independently of the host species or geographic area studied, defining a homogeneous profile of *C. pseudotuberculosis* responsible for superficial abscesses for the region.

INDEX TERMS: Genotyping, RFLP-PCR, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, goats, sheep.

RESUMO.- Objetivou-se com este estudo comparar genotipicamente 35 isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* recuperados de conteúdo de abscessos de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa, procedentes de cinco municípios localizados no Sertão de Pernambuco,

Brasil. Utilizou-se a técnica de *fingerprint* RFLP-PCR com as enzimas de restrição *Hpy-Ch4* e *Msp1* aplicada ao gene *rpoB* e as enzimas *Pst I* e *Msp I* para o gene *pld*. Não houve diferença nos padrões de fragmentos de bandas entre os isolados, independente da espécie hospedeira ou da área geográfica estudada, definindo-se um padrão genotípico homogêneo de *C. pseudotuberculosis* responsável por abscessos superficiais na região.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Genotipagem, RFLP-PCR, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caprinos, ovinos.

INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa de pequenos ruminantes causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e caracterizada clinicamente por abscessos caseosos que acometem os linfonodos, pele e vísceras (Unanian et al. 1985). Encontra-se amplamen-

¹ Recebido em 31 de janeiro de 2008.

Aceito para publicação em 28 de maio de 2008.

² Clínica Escola de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro de Ensino Superior de Maceió (CESMAC), Rodovia Divaldo Suruagy s/n, Quadra 4, Lote 4, Praia do Francês, Marechal Deodoro, AL 57160-000, Brasil. *Autor para correspondência: silviobiotec@yahoo.com.br

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

⁴ Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rodov. BR 262 Km 4, Cx. Postal 154, Campo Grande, MS 79002-970, Brasil.

te distribuída no mundo e já foi relatada em vários Estados do Brasil, onde apresenta prevalência relativamente elevada no Nordeste brasileiro (Costa et al. 1973, Langenegger & Langenegger 1991). De caráter insidioso e com tendência a cronicidade, é capaz de produzir perdas econômicas significativas para os criadores de pequenos ruminantes (Panton et al. 1988).

O gênero *Corynebacterium* está representado por mais de 60 espécies na sua maioria isolada de animais ou humanos (Khamis et al. 2005). A bactéria apresenta-se sob a forma de clava, sendo o *Corynebacterium differicum* o protótipo do grupo. Entretanto, algumas corinebactérias são pleomórficas e formam elementos cocóides durante o seu crescimento (Birberstein & Hirsh 2003).

Corynebacterium pseudotuberculosis é um diferóide típico, apresentando-se sob a forma cocóide a filamentosa, não possuem cápsula e sua parede celular é típica das corinebactérias com elevada concentração de lipídeos, que torna a torna hidrofóbica e pode contribuir para a sua sobrevivência dentro dos fagócitos e para sua leucotoxicidade (Birberstein & Hirsh 2003).

Dentro da espécie *C. pseudotuberculosis*, são reconhecidos dois biovars que foram diferenciados inicialmente pela capacidade ou não em reduzir nitrato a nitrito. O biovar *equi*, nitrato-positivo, é normalmente isolado de eqüinos e bovinos, e biovar *ovis*, nitrato-negativo, é isolado, invariavelmente, de caprinos e ovinos, mas também de bovinos (Songer et al. 1988). Entretanto, já foi demonstrado que o biovar *equi* pode, apesar de pouco freqüente, apresentar-se sob a forma de nitrato-negativo, mantendo, no entanto, sua classificação anterior com base em estudo de ribotipagem (Costa et al. 1998).

A investigação taxonômica dos procariontes pode ser dividida em dois períodos: no primeiro, os estudos eram centrados nas características fenotípicas e, no segundo, o foco passou a ser as características genotípicas. Este último foi pautado na detecção de regiões altamente conservadas do genoma, de áreas que sofreram alguma variação como inserção, deleção ou mutação de nucleotídeos específicos para uma espécie ou mesmo amostra (Tortoli 2003).

A genotipagem baseia-se em técnicas de fácil reprodutibilidade, tendo um forte poder discriminatório. As várias técnicas disponíveis passaram a serem conhecidas como técnicas de "DNA fingerprinting" (Darine et al. 1998).

A técnica de RFLP (Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição) é comumente empregada para a diferenciação entre indivíduos de uma mesma espécie, mas de cepas diferentes. Esta técnica pode ser realizada associada à PCR, Reação em Cadeia da Polimerase (RFLP-PCR). Nesta, um determinado fragmento gênico é amplificado com primers específicos para o gene e, posteriormente, submetidos à ação de enzimas de restrição que cortam este gene, ou seu segmento, em pontos específicos, produzindo assim fragmentos de DNA (Darine et al. 1998, Sutherland et al. 1993).

O uso de métodos moleculares para análise seqüencial

do gene RNAr 16S (DNAr) tem facilitado um maior delineamento do gênero, e a disponibilidade em comparar a seqüência deste gene com informações fenotípicas melhoradas tem aumentado significativamente a confiabilidade na identificação das espécies. Estes avanços na taxonomia e métodos de detecção, junto com o interesse nas corinebactérias como agentes oportunistas em infecções em humanos, recentemente resultou no delineamento de um vasto grupo de novas espécies deste gênero (Khamis et al. 2005).

A grande maioria das espécies de *Corynebacterium* pode ser diferenciada pelo polimorfismo das bandas de restrição para o gene do RNAr 16S devido à alta variabilidade das seqüências do DNAr 16S interespecies para esse gênero, que pode ser visto por um grande número de padrões de restrição (Vaneechoutte et al. 1995).

Entretanto, este padrão de variabilidade interespecies não é verdadeiro para as espécies *C. pseudotuberculosis* e *Corynebacterium ulcerans* que não são diferenciadas entre si na sua filogenia quando comparadas suas seqüências do DNAr (Riegel et al. 1995).

Apesar do gene do RNAr 16S ser o marcador molecular mais utilizado para determinar as relações filogenéticas bacterianas, para o gênero *Corynebacterium*, o gene *rpoB* (gene codificador da sub-unidade β da RNA polimerase) parece ser melhor marcador na distinção entre espécies desse gênero (Khamis et al. 2004).

Um dos fatores de maior relevância para a patogenia da linfadenite caseosa é a capacidade de *C. pseudotuberculosis* em produzir a exotoxina fosfolipase D (PLD) (Nairn et al. 1977, Hodgson et al. 1992; MacNamara et al. 1994). Esta toxina parece só ser produzida por duas espécies de *Corynebacterium*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, sendo considerado um bom marcador para a identificação dessas duas espécies (Barksdale 1981).

Sutherland et al. (1989), compararam a PLD de quatro cepas de *C. pseudotuberculosis* frente à habilidade em matar ratos brancos, atividade hemolítica, capacidade em inibir a hemolisina estafilocócica e a atividade antigênica para ELISA, encontrando variação na letalidade, mas não na antigenicidade. Esta variabilidade na intensidade da ação patogênica da PLD poderá ser resultado de mutações no gene *pld* (gene codificador da PLD).

Objetivou-se com este estudo analisar o perfil epidemiológico molecular de isolados de *C. pseudotuberculosis*, utilizando a técnica de RFLP-PCR, para os genes *rpoB* e *pld* de forma a contribuir com o conhecimento do comportamento do agente da linfadenite caseosa em rebanhos de caprinos e ovinos criados no sertão pernambucano.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Pernambuco está localizado a 7° e 15' e 9° e 27' de latitude sul, e 34° e 48' e 41° e 19' de longitude oeste de Greenwich. Com área total de 98.526,60 km², ocupa 6,3% do Nordeste brasileiro e 1,2% do Brasil. O IBGE identificou em Pernambuco,

em 1989, cinco Mesorregiões e 19 Microrregiões geográficas, a saber: Mesorregião do Sertão Pernambucano com 41 municípios; Mesorregião do São Francisco Pernambucano com 15 municípios, Mesorregião do Agreste Pernambucano com 71 municípios, Mesorregião da Mata Pernambucana com 42 municípios e Mesorregião Metropolitana do Recife com 15 municípios. Cada Mesorregião é dividida em Microrregiões, no total de 19. Assim, a Mesorregião do Sertão Pernambucano (região norte do Sertão), divide-se em: Microrregião de Araripina, Microrregião do Salgueiro, Microrregião do Pajeú e Microrregião do Sertão do Moxotó. A Mesorregião do São Francisco Pernambucano (região sul do Sertão), divide-se em: Microrregião de Petrolina e Microrregião de Itaparica (Andrade et al. 2003).

Foram selecionados cinco municípios para a coleta do material, estando três na Microrregião do Pajeú (Itapetim, São José do Egito e Carnaíba), um na Microrregião do Moxotó (Custódia) e um na Microrregião de Itaparica (Floresta). Por município foram visitadas, pelo menos, 25 propriedades, distribuídas de maneira a representar todo o espaço territorial.

Analisaram-se 35 amostras de conteúdo de abscessos superficiais, 26 de caprinos e 8 de ovinos, sendo assim distribuídas: Carnaíba (6 amostras de caprinos e 2 de ovinos); Itapetim (4 amostras de caprinos e 4 de ovinos); São José do Egito (11 amostras de caprinos); Floresta (6 amostras de caprinos e 2 de ovinos); e Custódia (uma amostra de ovino) (Fig.1).

As amostras foram obtidas, após tricotomia local e antiseptia com álcool iodado a 10%, por punção aspirativa de abscessos fechados com auxílio de seringa descartável e agulha 40x12mm.

O material coletado foi cultivado em ágar base enriquecido com 10% de sangue desfibrinado de ovino, sendo as placas incubadas a 37°C em aerobiose durante 48 horas. Posteriormente, foram selecionadas as colônias que apresentaram características compatíveis com o gênero *Corynebacterium* (Carter & Cole 1990). Essas colônias foram submetidas à técnica de coloração de Gram, repicadas para o caldo Brain Heart Infusion (BHI) para posterior identificação utilizando o APIcoryne (BioMerieux-França), confirmando bioquimicamente as amostras como isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* nitrato negativas (biovar *ovis*).

Extração do DNA

No Laboratório de Biologia Molecular da área de Sanidade Animal do Centro Nacional para Pesquisa de Gado de Corte

(Embrapa Gado de Corte), foi realizada a extração do DNA genômico pelo método modificado de Zhang et al. (1994). Para este procedimento, as amostras foram cultivadas em tubos Falcon de 50ml (com 10ml de caldo LB). Esse material foi centrifugado por 10 minutos a 6.000 x g. O pellet foi ressuspenso uma vez com 1ml de tampão TE 10mM, pH 8,7 (0,19g de EDTA 10mM + 0,07g tris HCl 10mM). A suspensão foi transferida para tubos de 2ml que foram centrifugados por 10 minutos a 9.900 x g. Posteriormente, descartado o sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em 800ul de tampão TE (pH 8,7), contendo 10,3% de glicose e 10mg/ml de lisozima, sendo então incubada por 12 horas a 37°C. Posteriormente, cada tubo recebeu 100ul de SDS a 10% + 20ul de NaCl a 5M e 13ul de proteinase K a 20%; a solução foi homogeneizada levemente e incubada por 12 horas a 56°C. Em seguida, adicionou-se 0,8ml de fenol e após agitação leve em mesa agitadora por 20 minutos, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 9.900 x g. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo estéril de 2ml e adicionado aproximadamente o mesmo volume de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após agitação leve por 20 minutos, procedeu-se nova centrifugação por mais 10 minutos a 9.900 x g. O sobrenadante foi, mais uma vez, transferido para outro tubo estéril onde se adicionou aproximadamente a mesma quantidade de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Novamente a solução foi submetida à agitação leve por 20 minutos e centrifugada a 9.900 x g, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo onde adicionou-se 0,6% (do volume total do sobrenadante) de isopropanol para a precipitação do DNA. A suspensão foi homogeneizada levemente e centrifugada novamente a 9.900 x g, por mais 10 minutos. Descartado o sobrenadante, adicionou-se 1ml de álcool a 70% para lavar o DNA e retirar as impurezas. Logo após centrifugou-se por 5 minutos a 9.900 x g; descartado o sobrenadante, deixou-se o pellet secar a temperatura ambiente, sendo ressuspenso em 50ul de água ultra-pura e estocado a -20°C.

Amplificação dos genes

A partir da seqüência depositada no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), do gene *pld* sob o número de acesso L16587 e de acordo com Khamis et al. (2004) foram desenhados os primers para segmentos dos genes *pld* e *rpoB*, respectivamente. Os primers utilizados para o gene *pld* foram, F 5' ATGAGGGAGAAAGTTGTTTTA 3' e R 5' TCACCACGG-GTTATCCGC 3'. Sendo a amplificação realizada em termociclador com o seguinte protocolo: etapa de 3 minutos a

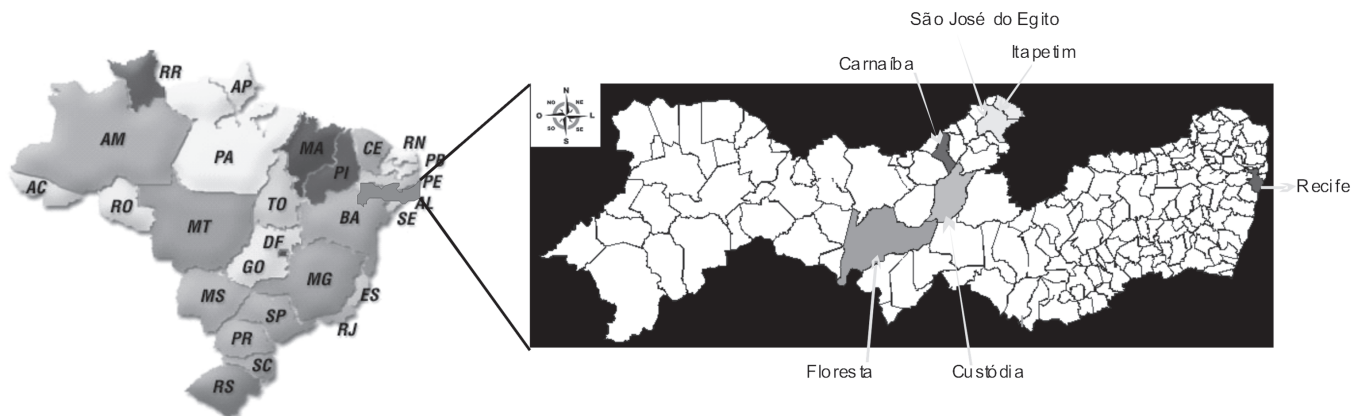


Fig.1. Mapa do Brasil com destaque para o Estado de Pernambuco e localização dos cinco municípios estudados para linfadenite caseosa em ovinos e caprinos, na macro-região do Sertão e a sua capital, Recife, Pernambuco, 2007.

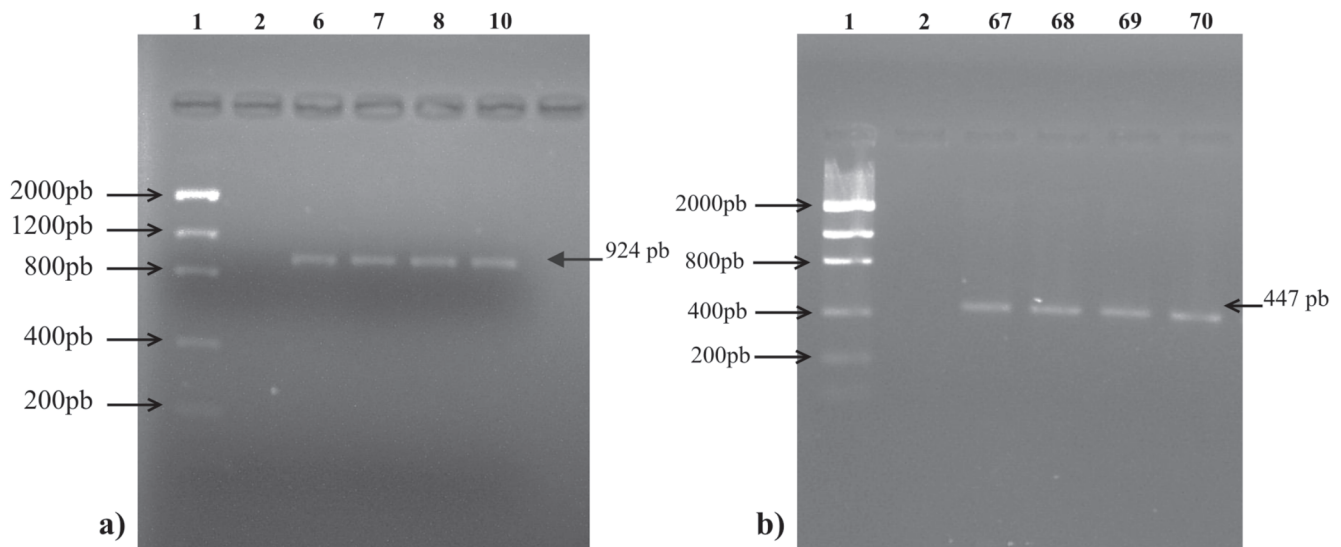


Fig.2. **a)** Perfil de bandas da reação de PCR utilizando primers do gene *pld* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Marcador de pares de bases Low DNA Mass Lader (1), Controle Negativo (2), padrão do gene *pld* (Amostras 6, 7, 8 e 10). **b)** Perfil de bandas da reação de PCR utilizando primers do gene *rpoB* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Marcador de pares de bases Low DNA Mass Lader (1), Controle Negativo (2), padrão do gene *rpoB* (Amostras 67, 68, 69 e 70). Eletroforese em gel de agarose a 2%.

95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C para a desnaturação, 1 minuto a 58°C para o anelamento, 2 minutos a 72°C para a extensão da cadeia e mais 3 minutos a 72°C para a extensão final, gerando bandas de 924pb. Para o gene *rpoB*, as seqüências de primers utilizadas foram, F 5' CGTATGAACATCGGCCAG 3' e R 5' TCCATTTGCCGAAGCGC 3', com amplificação em termociclador sob o seguinte protocolo: etapa de 3 minutos a 95°C, 34 ciclos de 1 minuto a 95°C para a desnaturação, 45 segundos a 56°C para o anelamento, 1 minuto e 30 segundos a 72°C para a extensão da cadeia e mais 10 minutos a 72°C para a extensão final, gerando bandas de 447pb. As reações de PCR foram realizadas em termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler gradient), com um volume final de 50µL contendo 5µL de tampão de PCR 10X, 1,5mM de MgCl₂, 250µM de cada dNTP, 2,5 U de taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1µL de cada primer e 1µL de DNA molde.

Os produtos da amplificação foram observados por eletroforese a 100V por 1 hora, separados por gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados com transiluminador sob luz ultravioleta, utilizando como padrão o marcador Low mass (Invitrogen®) para quantificar o tamanho dos fragmentos (Fig.2).

Digestão enzimática

Para testar a melhor concentração enzimática, 500ng do produto de PCR de um isolado foi digerido com 1µL, 1,5µL e 2µL da enzima de restrição *PstI* (Invitrogen®). Após o teste de concentração enzimática, foi utilizado como padrão 20U das endonucleases *PstI* e *MspI* que possuem respectivamente os seguintes sítios de restrição para o gene *pld*: 5'CTGCA/G 3', e 5' C/CGG 3'.

Para o gene *rpoB* foi utilizado 2µL (20U) das enzimas *HpyCh4* (NewEngland®) e *MspI* (Amersham®). As reações de digestão foram incubadas a 37°C por 6 horas e posteriormente submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida a 15% a 80V por 3 horas, seguido de coloração em brometo de etídio

(5mg/mL) por 20 minutos. O marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®) e um fragmento intacto do gene também foram aplicados aos géis como padrão para estimar o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região Nordeste do Brasil é a que apresenta a maior freqüência de casos de linfadenite caseosa, provavelmente em decorrência da grande concentração de ovinos e caprinos, do tipo de vegetação que contém espinhos, facilitando a abertura de soluções de continuidade que servem como porta de entrada para as bactérias e do baixo grau de instrução dos criadores (Veschi 2005).

Situado nesta região, o Estado de Pernambuco tem o Sertão como sua maior região natural, ocupando 70% do seu território, com sua economia baseada na pecuária, principalmente bovina, caprina e ovina, sendo as duas últimas de grande importância econômica, principalmente para o pequeno produtor. Os municípios estudados situam-se nas microrregiões do Sertão do Pajeú e Sertão do Moxotó, predominando, em quase toda a área das duas regiões, o clima semi-árido e uma forte concentração de caprinos e ovinos (Pernambuco de A/Z 2007).

Somando-se os cinco municípios estudados, foram visitadas aproximadamente 100 propriedades, encontrando-se, em todas elas, animais que apresentavam abscessos superficiais ou animais com lesões de abscessos que haviam rompido naturalmente ou por intervenção do proprietário. Esses resultados indicam a grande circulação do agente e disseminação dos focos da doença no sertão pernambucano.

As culturas do conteúdo dos abscessos obtidos dos caprinos e ovinos estudados resultaram no crescimento de mais de um tipo de microrganismo, demonstrando a

provável pluralidade de agentes infecciosos envolvidos nos processos abscedativos dos pequenos ruminantes. Dentre as bactérias, isoladas em associação a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, destacaram-se *Staphylococcus* sp. e bactérias Gram-negativas não identificadas. Esses achados estão de acordo com Saïd et al. (2002) que também relataram o isolamento de *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Streptococcus* sp. entre outros, de conteúdo de abscessos de ovinos na Tunísia. Quanto ao tempo de isolamento, observou-se crescimento de colônias consideradas características do gênero *Corynebacterium* sp. (pequenas colônias esbranquiçadas, mucosas e que, ao serem pinçadas, tendem a se deslocar por completo) em 48 horas de incubação como relatado por Connor et al. (2000). Em poucos casos, observou-se crescimento sem a formação de verdadeiras colônias, mas sim como pequenos agrupamentos puntiformes disseminados no agar.

No meio de cultura líquido (caldo BHI), observou-se o turvamento deste com a presença de uma membrana, provavelmente em função da grande quantidade de lipídios da célula bacteriana que é uma característica peculiar desse agente, concordando com as observações feitas por Batey (1986).

Observaram-se bactérias Gram-positivas, na sua grande maioria cocóides com a presença de alguns cocobacilos. Apesar de muitos autores relatarem que o grupo *Corynebacteria* se apresenta como bastões, desenhando formas em paliçada ou letras chinesas, Biberstein & Hirsh (2003), afirmaram ser esta espécie pleomórfica, apresentando-se muitas vezes na forma cocóide ou de cocobacilos.

Apenas os isolados identificados com 99 a 100% de certeza pelo teste APICoryne (BioMeriux-França) como pertencentes à espécie *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* tiveram o seu DNA extraído e sua identidade confirmada por PCR.

A análise de restrição revelou que a enzima *Hpy-Ch4* cortou o gene *rpoB* em dois pontos, gerando bandas de 86, 126 e 235 pares de base (pb) e a *Msp I* realizou o corte em três locais, gerando quatro bandas com 54, 78, 93 e 222 pb (Fig.3).

O gene *pld* foi cortado em três pontos pela *Pst I*, produzindo fragmentos de 52, 108, 369 e 395 pb, enquanto que a *Msp I* gerou bandas de 72, 91, 195 e 566 pb (Fig.4).

Este trabalho comparou por RFLP-PCR o gene *pld* que codifica para o principal fator de virulência, a esfingomielinase, fosfolipase D. Os resultados demonstram que entre os isolados de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* aqui estudados, independente da região de origem ou da espécie hospedeira de onde foram obtidos, não houve variação genotípica para esse gene. Este fato sugere que este fator de virulência contra o qual muitos trabalhos de proteção vacinal têm sido elaborados (Ellis et al. 1991, Tachedjian et al. 1995, Hodgson et al. 1999), mantém uma homogeneidade nas suas características genéticas, permitindo assim que a resposta imune desenvolvida contra a PLD possa ser explorada como instrumento de controle da doença também na região estudada.

Vários trabalhos de ribotipagem foram desenvolvidos até o momento buscando comparar padrões genotípicos entre amostras de *C. pseudotuberculosis* utilizando o gene 16S, tendo todos eles encontrado homogeneidade das amostras dentro dos seus respectivos biovars, mesmo entre aquelas com origem em mais de uma região do mundo e causando nos hospedeiros sintomas de intensidade variável (Sutherland et al. 1993, 1996, Costa et al. 1998, Literák et al. 1999).

O gene *rpoB* que codifica a sub-unidade β da RNA polimerase, responsável por toda a transcrição do DNA em RNA, tem sido revelado como um excelente marcador molecular para estudar as variações genotípicas entre espécies, mostrando-se, especificamente para *Coryne-*

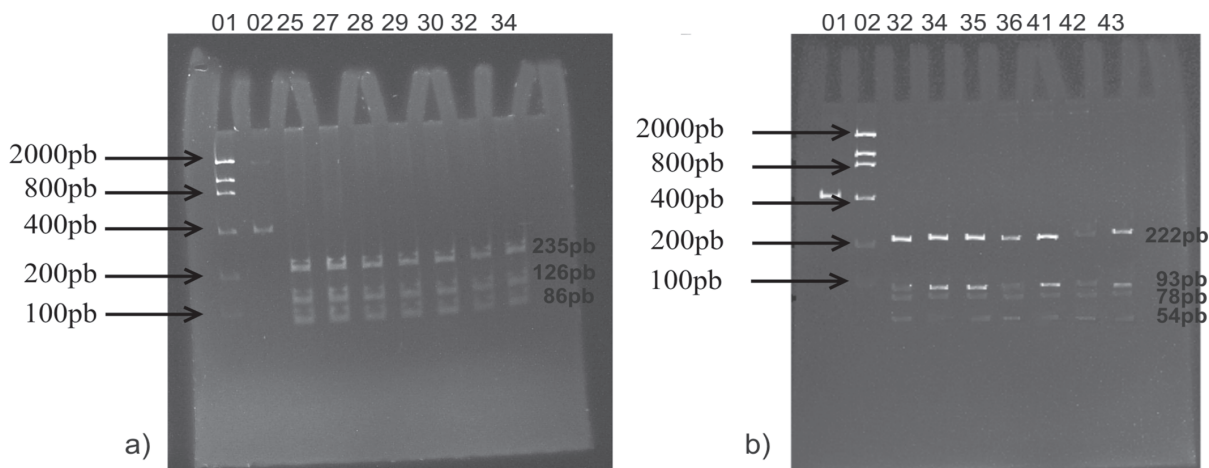


Fig.3. Perfis de restrição do gene *rpoB* digeridos com *Hpy-CH4* por PCR em gel de poliacrilamida a 15%. **a)** Gel, marcador Low DNA Mass Ladder (1), PCR não digerida (2), Amostras de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (25, 27, 28, 29, 30, 32 e 34). **b)** No gel, produto de PCR do gene *rpoB* não digerido (1), marcador Low DNA Mass Ladder (2), produtos de PCR digeridos com *Msp I* (Amostras 32, 34, 35, 36, 41, 42 e 43).

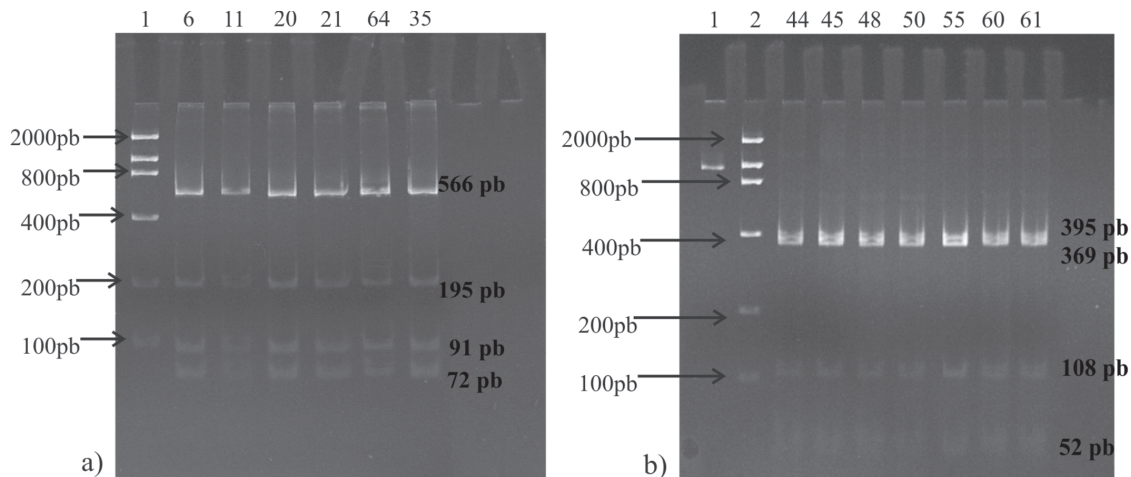


Fig.4. Perfis de restrição do gene *pld* (924pb) digeridos com *PstI* por PCR em gel de poliacrilamida a 15%. **a)** Gel, marcador Low DNA Mass Ladder (1), Amostras de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (6, 11, 20, 21, 64 e 35). **b)** No gel, produto de PCR do gene *pld* não digerido (1), marcador Low DNA Mass Ladder (2), produtos de PCR digeridos com *MspI*, (Amostras 44, 45, 48, 50, 55, 60 e 61).

bacterium pseudotuberculosis, um alvo ainda mais valioso do que o estudo comparativo do gene 16S (Khamis et al. 2004).

Também para o gene *rpoB* não foi observado polimorfismo nas bandas de restrição com as enzimas *Hpv-Ch4* e *Msp I* dentre as amostras aqui estudadas. Este resultado reforça a idéia de uma homogeneidade e estabilidade genética dentre a espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis*, biovar *ovis*, nesta região. Como as amostras foram selecionadas frente a características morfológicas e bioquímicas que indicavam com praticamente 100% de certeza tratar-se de *C. pseudotuberculosis*, o reconhecimento de um padrão genético estável de um gene de baixo grau de mutação e imprescindível para a sobrevivência desta espécie, aliado a um comprovado alto poder discriminatório entre espécies, nos permite colocar esta técnica como possível ferramenta diagnóstica para a LC.

Os resultados indicam que a LC em caprinos e ovinos do Sertão pernambucano é causada por *C. pseudotuberculosis*, biovar *ovis*, que não sofreu mutações detectáveis no seu gene de virulência de maior importância.

O conhecimento mais detalhado desses padrões de fragmentos através de estudos de seqüenciamento poderiam confirmar estes resultados.

CONCLUSÕES

A comparação dos padrões de banda por RFLP-PCR para os genes *rpoB* e *pld* demonstram que as amostras estudadas não apresentam qualquer variação genotípica frente às três enzimas de restrição. Os padrões homogêneos das bandas geradas para ambos os genes, *pld* e *rpoB*, independente da espécie hospedeira de pequeno ruminante ou da área geográfica estudada, reforça a idéia de um padrão genotípico único do *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis*.

A homogeneidade nos padrões de bandas para os genes *rpoB* e *pld* oferece um meio eficiente de identificação de isolados de *C. pseudotuberculosis* permitindo que estes possam ser utilizados em métodos de diagnóstico.

Entretanto, novos estudos deverão ser conduzidos para que se conheça a seqüência nucleotídica desses fragmentos, proporcionando visão mais acurada da característica genotípica dessas amostras para os genes aqui estudados. A confirmação da condição de homogeneidade para o gene *pld* para *C. pseudotuberculosis* deverá incentivar um aumento no número de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras.

REFERÊNCIAS

- Andrade M.C.O., Sampaio F.A.C., Neto J.C.X.A., Jatobá L., Albuquerque M.J.C., Benjamin R.C., Andrade T.L.C. & Lins F.J.C.C. 2003. Atlas Escolar Pernambuco: espaço geo-histórico e cultural. 2ª ed. Editora Grafset, João Pessoa.
- Barksdale L., Linder R., Sulea I.T. & Pollice M. 1981. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Coynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. J. Clin. Microbiol. 13(2):335-343.
- Batey R.G. 1986. Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. Vet. Microbiol. 11(1/2):145-152.
- Biberstein E.L. & Hirsh D.C. 2003. Corynebactérias; *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes*; *Rhodococcus equi*, p.119-126. In: Hirsh D.C. & Zee Y.C. (Ed.), Microbiologia Veterinária. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acesso em 6 de janeiro de 2007. http://www.abrasil.gov.br/avalppa/RelAvalPPA2002/content/av_prog/072/prog072.htm
- Brasil. Ministério do Planejamento. Acesso em 6 de janeiro de 2007. http://www.abrasil.gov.br/avalppa/site/content/av_prog/05/15/prog0515.htm
- Carter G.R. & Cole Jr J.R. 1990. Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology. 5ª ed., Academic Press. 620p.
- Connor K.M., Quirie M.M., Baird G. & Donachie W. 2000. Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium*

- pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 38 (7):2633-2637.
- Costa M.D.M., C mara J.Q., Rocha J.V.N. & Martinez T.C.N. 1973. Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia. Distribui o geogr fica da doença. Bolm Inst. Biol. Bahia, Salvador, 12(1):1-7.
- Costa L.R.R., Spier S.J. & Hirsh D.C. 1998. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. Vet. Microbiol. 62:135-143.
- Darine A.L.C., Magalh es V.D. & Crott L.S.P. 1998. Aplica es da ribotipagem na epidemiologia molecular de infec es bacterianas: revis o. Medicina 30:73-80.
- Ellis J.A., Hawk D.A., Mills K.W. & Pratt D.L. 1991. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. Vet. Immunol. Immunopathol. 28(3-4):303-316.
- Hodgson A.L., Krywult J., Corner L.A., Rothel J.S. & Radford A.J. 1992. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. Infect. Immun. 60:2900-2905.
- Hodgson A.L.M., Carter K., Tachedjian M., Krywult J., Corner L.A., McColl M. & Camaron A. 1999. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. Vaccine 17:802-808.
- Khamis A., Raoult D. & La Scola B. 2004. *ropB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. J. Clin. Microbiol. 42 (9): 3925-2931.
- Khamis A., Raoult D. & La Scola B. 2005. Comparison between *ropB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. J. Clin. Microbiol. 43(4):1934-1936.
- Langenegger C.H. & Langenegger J. 1991. Monitoramento sorol gico e al rgico da infec o por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. Pesq. Vet. Bras. 11(1/2):31-34.
- Liter k I., Horv thova A., Jahnov  M., Rychl k I. & Skalka B. 1999. Phenotype and genotype characteristics of Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. Small Rumin. Res. 32:107-109.
- Nairn M.E., Robertson J.P. & McQuade C.C. 1977. The control of caseous lymphadenitis in sheep by vaccination. Proc. 54th Annu. Conf. Australian Vet. Assoc. 54:159-161.
- McNamara P.J., Bradley G.A. & Songer J.G. 1994. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Mol. Microbiol. 12:921-930.
- Panton M.W., Mercy A.R., Wilkinson F.C., Gardner J.J., Sutherland S.S. & Ellis T.M. 1988. The effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep. Aust. Vet. J. 65(4):117-119.
- Pernambuco de A/Z. Dispon vel em: <<http://www.pe-az.com.br/regioes/regioes.htm>>. Acessado em: 05/01/2007.
- Riegel P., Ruimy R., de Briel D., Pr vost G., Jehl F., Christen R. & Monteil H. 1995. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev., FEMS Microbiol. Lett. 126:271-276.
- Sa d M.S.B., Maitigue H.B., Benzarti M., Messadi L., Rejeb A. & Amara A. 2002. Contribution a l'etude epidemiologique et clinique de la lymphadenite caseuse chez l s ovins. Arch. Inst. Pasteur Tunis 79:51-57.
- Songer J.G., Beckenbach K., Marshall M.M., Olson G.B. & Kelley L. 1988. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 49:223-226.
- Sutherland S.S., Hart R.A. & Buller N.B. 1993. Ribotype analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats. Aust. Vet. J. 70(12):454-456.
- Sutherland S.S., Hart R.A. & Buller N.B. 1996. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. Vet. Microbiol. 49:1-9.
- Tachedjian M., Krywult J., Moore R.J. & Hodgson L.M. 1995. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. Vaccine 13(18):1785-1792.
- Tortoli E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin. Microbiol. Rev. 16(2):319-354.
- Unanian M.D., Silva A.E.D.F. & Pant K.P. 1985. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid North-East Brasil. Trop. Anim. Hlth Prod. 17:57-62.
- Vaneechoutte M., Riegel P., de Briel D., Monteil H., Verschraegen G., De Rouck A. & Claeys G. 1995. Evaluation of the applicability of amplified r-DNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. Res. Microbiol. 146:633-641.
- Veschi J.L. 2005. Linfadenite caseosa. VIII Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas Gerais e M dia Mogiana. Dispon vel em: <http://www.capritec.com.br/pdf/linfadenite_caseosa.pdf> Acessado em: 15/01/2007.
- Wilson K. 1994. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel F.A., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. & Struhl K. (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, unit 2.4:1-5.
- Zhang Y., Praszki r J., Hodgson A. & Pittard A.J. 1994. Molecular analysis and characterization of a broad-host-range plasmid, pEP2. J. Bacteriol. 179(18):5718-5728.