

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES
NO CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA**

LAUANA BORGES SANTIAGO

SOBRAL – CE
FEVEREIRO – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES
NO CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA**

LAUANA BORGES SANTIAGO

SOBRAL – CE
FEVEREIRO – 2010

LAUANA BORGES SANTIAGO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES NO
CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA

**Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Zootecnia, da Universidade
Estadual Vale do Acaraú, como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre
em Zootecnia.**

Área de concentração: Produção Animal

ORIENTADOR:

PROF. DR. RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO

SOBRAL – CE
FEVEREIRO – 2010

B732a

Santiago, Lauana Borges

Avaliação *in vitro* e *in vivo* de antissépticos e desinfetantes no controle da linfadenite caseosa / Lauana Borges Santiago. -- Sobral: UVA / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, 2010.
94 f.

Orientador: Raymundo Rizaldo Pinheiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas / Mestrado em Zootecnia, 2010.

1. Abscesso. 2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 3. Curva de crescimento. 4. Sensibilidade. 5. Ovino – enfermidade – tratamento. I. Pinheiro, Raymundo Rizaldo. II. Universidade Estadual Vale do Acaraú, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas. IV. Título.

CDD 636.089692

LAUANA BORGES SANTIAGO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES
NO CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA**

Dissertação defendida e aprovada em 26 de fevereiro de 2010 pela Comissão
Examinadora:

**DR. FRANCISCO SELMO FERNANDES ALVES
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS**

**DRA. LEA CHAPAVAL
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS**

**PROF. DRA. SUZANA APARECIDA COSTA DE ARAÚJO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**PROF. DR. RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ/EMBRAPA
COORDENAÇÃO DE ZOOTECNIA**

SOBRAL – CE
FEVEREIRO – 2010

Ao meu pai, por me mostrar os verdadeiros valores da vida, pela confiança, pelo apoio e por ter sempre a certeza de que eu sou capaz.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me guiar, mostrando o caminho da bondade e da fé e dando forças para percorrê-lo.

A toda minha família, em especial ao papai, mamãe, Naiara e Pablo, agradeço por estarem do meu lado, nos momentos bons e nos momentos difíceis, me apoiando, me incentivando e sempre acreditando plenamente em minha capacidade. Ao Marcelo, agradeço pelo carinho, respeito, amizade, cumplicidade, por ter me apoiado e por ter me auxiliado ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Serei eternamente grata aos meus orientadores, Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro e Dr. Francisco Selmo Fernandes Alves, por me receberem de braços abertos, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, orientação, disponibilidade e por contribuírem fundamentalmente para minha formação profissional.

À Ismênia pela amizade, paciência, compreensão e companheirismo, além da ajuda nas atividades de campo e laboratoriais. Amiga como você é para sempre.

Agradeço sinceramente ao Prof. Emerson Moreira e à Tamar por toda atenção dispensada, essencial ajuda, fundamental amparo e orientação, desde o momento em que cheguei à cidade de Sobral até o dia de hoje.

À Samara e sua família, agradeço profundamente por terem carinhosamente me acolhido e pela bondade existente no coração de vocês, tornando esta minha jornada bastante prazerosa e agradável.

Sou profundamente grata à minha excepcional equipe de trabalho, composta por Vanderlan dos Santos, Apoliana Rodrigues, Ana Milena Lima e José Maria Martins, pela dedicação, afeto, eficiência, qualidade, vontade e capacidade. Vocês também são responsáveis pela execução e conclusão de todo este trabalho.

Da mesma forma, agradeço aos funcionários da Embrapa que me ajudaram e muito me ensinaram, ao longo de toda a parte experimental de meu estudo, como Fábio, Evaristo, Chiquinho Teixeira, Mascote, Zé Leão, toda a equipe do DNOCS, em especial Luizão, Carlinhos e Adalto, demonstrando total disponibilidade, prazer em ajudar e apresentando, sempre, ao invés dos problemas, as soluções.

Faço um agradecimento especial a Fernando Henrique Andrade M. R. Albuquerque e Eduardo Luiz de Oliveira, pelas orientações, sugestões e fundamental ajuda na elaboração e execução deste experimento, além da grande torcida que sei que existiu.

Além de minha equipe oficial de trabalho, agradeço imensamente a todas as pessoas que estiveram sempre disponíveis a ajudar nos momentos críticos do experimento, como Felipe, Ronaldo, Kamila, Roberta, Alexsandro, Camila, Leonardo, Amanda e Darly e assim, contribuíram muito para a conclusão deste estudo.

Agradeço aos laboratoristas da Embrapa que muito colaboraram ao longo de todo o período que estive no Centro, como João Ricardo, Tia Helena, Nóbrega, Jorge Silvestre, Expedito Barbosa e, em especial, Osmarilda pela contribuição em análises essenciais contidas neste estudo.

Ao Dr. Luís da Silva Vieira, à Prof^a. Fátima Révia Granja Lima, à Dr^a. Hévila Oliveira Salles e à Prof^a. Suzana A. Costa de Araújo pelas orientações, sugestões e atenção dispensada, visando o aprimoramento deste trabalho.

À Dr^a. Lea Chapaval pela orientação e acompanhamento e à Geovânia Canafístula de Sousa pela grande amizade e ajuda na execução de várias tarefas.

Pelo convívio diário prazeroso, momentos de descontração e contribuição, agradeço ao pessoal da Parasitologia, da Reprodução, da Virologia, da Bacteriologia e

da Gestor, em especial Rosalba, Camila, Nadiana, Dr. Cézar Cavalcante, Dr^a. Ângela Eloy, Kamila, Dr^a. Lúcia Sider, Kelma, Dr^a. Alice Andrioli, Dr. Diônes, Roberta Lomonte, Ronaldo, Samily, Flávio, Diogo, Flávia, Dr^a. Karina, Ana Paula, Alan, Maria e Toinho.

Às amizades que cativei em Sobral, além das já citadas, Roberta e Leandro, Vinícius e Patrícia, Eduardo e Érica, Fernando Henrique e Eveline, Gil Mário e Fabiana e Henrique e Lilian sou grata pelos momentos agradáveis e convívio prazeroso.

Finalmente, expresso meus sinceros agradecimentos a todos os funcionários e estagiários da Embrapa Caprinos e Ovinos e da Universidade Estadual Vale do Acaraú, que sempre torceram por mim e fazem parte, portanto, desta conquista. Cativei, nesta cidade, amigos que levarei, sem dúvida, para o resto da vida.

“A gratidão de quem recebe um benefício é bem menor do que o prazer de quem o faz”

(Machado de Assis)

“Ninguém é digno de ser uma autoridade, inclusive científica, se não reconhece seus limites e suas fragilidades”

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XV
RESUMO GERAL.....	XVII
GENERAL ABSTRACT.....	XVIII
 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	 01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	03
 1. CAPÍTULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	 06
1.1. AGENTE ETIOLÓGICO.....	07
1.2. OCORRÊNCIA E PERDAS ECONÔMICAS.....	12
1.3. TRANSMISSÃO.....	17
1.4. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	20
1.5. IMUNOLOGIA.....	24
1.6. DIAGNÓSTICO.....	27
1.7. TRATAMENTO.....	32
1.8. CONTROLE E PROFILAXIA.....	33
1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
 2. CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA SENSIBILIDADE DA <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> FRENTE A DIFERENTES TIPOS DE ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES.....	 54
2.1. RESUMO.....	55
2.2. ABSTRACT.....	56
2.3. INTRODUÇÃO.....	57
2.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.4.1. AMOSTRAS BACTERIANAS.....	59
2.4.2. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>C.</i> <i>PSEUDOTUBERCULOSIS</i>	 59
2.4.3. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA SENSIBILIDADE DA <i>C.</i> <i>PSEUDOTUBERCULOSIS</i> FRENTE AOS ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES.....	 60
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
2.6. CONCLUSÕES.....	68
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
 3. CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES NO CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA: ACOMPANHAMENTO CLÍNICO, HEMATOLÓGICO, SOROLÓGICO E MICROBIOLÓGICO.....	 72
3.1. RESUMO.....	73
3.2. ABSTRACT.....	74
3.3. INTRODUÇÃO.....	75
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	77

3.4.1.	LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL.....	77
3.4.2.	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	77
3.4.3.	TRATAMENTO E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO, MICROBIOLÓGICO E HEMATOLÓGICO.....	78
3.4.4.	ACOMPANHAMENTO SOROLÓGICO (IHS).....	79
3.4.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	81
3.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
3.6.	CONCLUSÕES.....	91
3.7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
CAPÍTULO 1	
01. REDUÇÃO DO NITRATO E TIPO DE MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA INFECÇÃO DE ACORDO COM A ESPÉCIE ANIMAL AFETADA PELA <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i>	10
02. EFETIVO MUNDIAL DO REBANHO DE CAPRINOS E OVINOS.....	12
03. DISTRIBUIÇÃO REGIONAL BRASILEIRA DO EFETIVO DO REBANHO CAPRINO.....	14
04. DISTRIBUIÇÃO REGIONAL BRASILEIRA DO EFETIVO DO REBANHO OVINO.....	14
CAPÍTULO 2	
01. DENSIDADE ÓPTICA DO MEIO DE CULTURA E NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS POR ML DE <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> INOCULADA EM BHI+T AO LONGO DE 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A 37°C.....	63
02. VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÕES DA MEDIDA (MM) DOS HALOS DE INIBIÇÃO E DE REDUÇÃO DE CRESCIMENTO DA <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> FRENTE TINTURA DE IODO A 10%, HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2,5%, PERMANGANATO DE POTÁSSIO A 5%, ASEPTOL®, ÁLCOOL ETÍLICO ABSOLUTO (99,8%) E SOLUÇÃO SALINA ESTÉRIL.....	66
CAPÍTULO 3	
01. VALORES MÉDIOS DO VOLUME GLOBULAR, HEMOGLOBINA, LEUCÓCITOS E MÉDIOS ABSOLUTOS DE NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS, BASTONETES, LINFÓCITOS E MONÓCITOS DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS TRATADOS COM TINTURA DE IODO A 10%, HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2,5% E DO GRUPO CONTROLE, NOS MESES INICIAL E FINAL DO EXPERIMENTO.....	88
02. MÉDIAS DOS TÍTULOS SOROLÓGICOS (LOG 2) PELO IHS DOS GRUPOS TRATADOS COM TINTURA DE IODO A 10%, HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2,5% E DO GRUPO SOB TRATAMENTO CONVENCIONAL, AO LONGO DE CINCO MESES.....	90

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
CAPÍTULO 1	
01. <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> EM MATERIAL PURULENTO DRENADO DE UM ABSCESSO DE UM CAPRINO (COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM EM AUMENTO DE 100 VEZES EM MICROSCOPIA ÓTICA.....	07
02. PROVAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i>	09
03. CRESCIMENTO DE <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> EM PLACA DE ÁGAR SANGUE, APRESENTANDO COLÔNIAS DE COLORAÇÃO BRANCA E ASPECTO SECO.....	10
04. CRESCIMENTO DA <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> EM MEIO LÍQUIDO DE BHI COM FORMAÇÃO DE PELÍCULA NA SUPERFÍCIE.....	11
05. ESQUEMA DA EVOLUÇÃO DA PATOGENIA DA LINFADENITE CASEOSA.....	21
06. ABSCESSOS INTERNOS E ADERÊNCIAS CAUSADAS PELA LINFADENITE CASEOSA: ABSCESSOS PULMONARES E ABSCESSOS HEPÁTICOS.....	22
07. ABSCESSO EXTERNO DE LINFADENITE CASEOSA COM LOCALIZAÇÃO MANDIBULAR.....	23
08. IDENTIFICAÇÃO DA <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> ATRAVÉS DA REALIZAÇÃO DE PROVAS BIOQUÍMICAS.....	28
CAPÍTULO 2	
01. CURVAS DE CRESCIMENTO DA <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> EM MEIO BHI+T, EM FUNÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PARA DENSIDADE ÓPTICA E DO LOGARITMO NA BASE 10 DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS POR ML, AO LONGO DE 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A 37°C.....	64
CAPÍTULO 3	
01. EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DOS LINFONODOS DOS ANIMAIS DO GRUPO TRATADO COM TINTURA DE IODO A 10%, AO LONGO DO TEMPO.....	82
02. EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DOS LINFONODOS DOS ANIMAIS DO GRUPO TRATADO COM HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2,5%, AO LONGO DO TEMPO.....	82
03. EVOLUÇÃO DO DIÂMETRO DOS LINFONODOS DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE, AO LONGO DO TEMPO.....	83
04. EVOLUÇÃO DAS MÉDIAS DOS DIÂMETROS DOS LINFONODOS DOS ANIMAIS PERTENCENTES AOS GRUPOS TRATADOS COM TINTURA DE IODO A 10%, HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2,5% E DO GRUPO SOB TRATAMENTO CONVENCIONAL, AO LONGO DO TEMPO.....	83

05. EXSUDATO FIBRINOSO E ENCAPSULADO AUSENTE DE <i>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</i> VIÁVEL E EXSUDATO DE ASPECTO CASEOSO TÍPICAMENTE OBSERVADO NOS CASOS DE LINFADENITE CASEOSA.....	84
06. EFICÁCIA (%) DOS TRATAMENTOS COM TINTURA DE IODO A 10%, HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2,5% E DO TRATAMENTO CONVENCIONAL.....	86
07. EDEMA ACENTUADO NA REGIÃO DO LINFONODO TRATADO E LESÃO DE GRANDE EXTENSÃO NOS ANIMAIS TRATADOS COM TINTURA DE IODO A 10% E HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2,5%.....	87
08. MÉDIAS DOS TÍTULOS SOROLÓGICOS (LOG 2) PELO IHS DOS GRUPOS TRATADOS COM TINTURA DE IODO A 10%, HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2,5% E DO GRUPO SOB TRATAMENTO CONVENCIONAL, AO LONGO DE CINCO MESES.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ANOVA	Análise de Variância
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
BHI+T	Infusão de Cérebro e Coração incluída de Tween 80®
CBM	Células Bacterianas Mortas
CNPC	Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos e Ovinos
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Grupo submetido ao Tratamento Convencional
CTLA-4	Linfócito T Citotóxico associado à Proteína 4
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
g	Grama
HS	Grupo tratado com Hipoclorito de Sódio a 2,5%
IFN-gama	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IHS	Inibição da Hemólise Sinérgica
kDa	Quilodaltons
LB	Linfócito B
LC	Linfadenite Caseosa
Log 2	Logaritmo de base 2
Log 10	Logaritmo de base 10
LT	Linfócito T
LT CD4+	Linfócito T apresentando a molécula CD4+ na superfície
LT CD8+	Linfócito T apresentando a molécula CD8+ na superfície
LT gama-delta	Linfócito T expressando cadeias gama e delta em seus receptores
MDP	Adjuvante Sintético Dipeptídeo Muramil
MG	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mPCR	Reação em Cadeia de Polimerase Multiplex
Nº	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	<i>National Commitee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	Nanômetro
p/p	Peso por peso
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
R ²	Coeficiente de Determinação
RNA	Ácido Ribonucléico

RPM	Rotações por minuto
Th1	Células T auxiliaadoras do tipo 1
TI	Grupo tratado com Tintura de Iodo a 10%
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral alfa
TPP	Técnica de Separação em Três Fases
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WB	<i>Western Blot</i>

RESUMO GERAL

Corynebacterium pseudotuberculosis é um bacilo Gram positivo causador da Linfadenite Caseosa (LC) nos pequenos ruminantes. O tratamento atualmente preconizado para esta enfermidade consiste na drenagem e cauterização química dos abscessos em estágio avançado de evolução, apesar deste procedimento representar grande risco de contaminação ambiental. Objetivou-se com este estudo descrever a curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis* (1), avaliar o efeito *in vitro* de cinco antissépticos e desinfetantes contra a *C. pseudotuberculosis* (2) e determinar a eficácia *in vivo* da aplicação dos dois produtos com maior poder bactericida *in vitro* contra a *C. pseudotuberculosis*, no interior do abscesso de animais acometidos pela LC. Os produtos avaliados *in vitro* foram: tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5%, permanganato de potássio a 5%, sabonete líquido antisséptico Aseptol® e álcool etílico absoluto (99,8%), utilizando-se quatro repetições e o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias. A curva de crescimento foi obtida a partir da medição da massa celular e contagem de UFC/mL. Para a obtenção de uma concentração de *C. pseudotuberculosis* de 1200×10^5 células viáveis/mL, o inóculo foi mantido sob incubação a 37°C por 28 a 40 horas. A tintura de iodo a 10% e o hipoclorito de sódio a 2,5% foram os dois produtos com maior poder bactericida *in vitro* contra a *C. pseudotuberculosis*. Para o estudo *in vivo*, foram utilizadas 18 fêmeas ovinas, divididas em três grupos: o primeiro grupo foi tratado com tintura de iodo a 10% (TI), o segundo grupo com hipoclorito de sódio a 2,5% (HS) e o último grupo submetido ao tratamento convencional (CT). Os dados hematológicos e sorológicos foram analisados pelos testes de Lilliford e Dunnet ($p < 0,05$). O tratamento convencional foi mais eficaz que os grupos TI e HS, no que diz respeito ao controle da contaminação ambiental pela *C. pseudotuberculosis*. Não foi detectada diferença ($p < 0,05$) nos parâmetros hematológicos em decorrência dos tratamentos avaliados. Quanto ao acompanhamento sorológico, a análise estatística comparativa entre os meses, dentro de cada grupo, mostrou que os meses 1, 2, 3 e 4 foram diferentes ($p < 0,05$) do mês 0 para os grupos TI e HS. No grupo CT, não houve diferença ($p < 0,05$) entre os meses de 1 a 5 e o mês 0.

Palavras-chave: abscesso, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, curva de crescimento, sensibilidade, ovino, tratamento

GENERAL ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is a positive Gram rod that causes Caseous Lymphadenitis (LC) in small ruminants. The current and recommended treatment is the drainage and chemical cauterization of the abscesses at the final stage of development, although it can represent high risks of environmental contamination. The aim of this study was to define the growth curve of *C. pseudotuberculosis* (1), to evaluate the *in vitro* effect of five antiseptics and disinfectants against *C. pseudotuberculosis* (2) and to determine the efficacy of *in vivo* application of the both products with the major bactericidal *in vitro* effect against *C. pseudotuberculosis*, inside the abscesses of animals affected by LC (3). The products tested were: 10% iodine, 2,5% sodium hypochlorite, 5% potassium permanganate, liquid soap Aseptol® and absolute alcohol ethylic (99,8%), with four repetitions and means compared by Tukey's test ($p < 0,05$). The growth curve was obtained by cell mass evaluation and UFC/mL counting. To reach the concentration of *C. pseudotuberculosis* of 1200×10^5 viable cells/mL, the inoculum was maintained at 37°C incubation for a 28-40 hours period. The 10% iodine and 2,5% sodium hypochlorite were the products with the most bactericidal *in vitro* effect against *C. pseudotuberculosis*. For the *in vivo* experiment, 18 ovine females were assorted in three groups: the first one was treated with 10% iodine (TI), the second one with 2,5% sodium hypochlorite (HS) and the third group was conventionally treated (CT). Hematological and serological results were submitted to Lilliford's and Dunnet's tests ($p < 0,05$). The conventional treatment was more effective than TI and HS groups, considering the prevention of environment contamination by *C. pseudotuberculosis*. No difference ($p < 0,05$) was detected in hematological parameters due to treatments evaluated. Considering the serological monitoring, the comparative statistical analysis between months, inside the groups, showed that months 1, 2, 3 and 4 were different ($p < 0,05$) of month 0, for TI and HS groups. For CT group, no difference ($p < 0,05$) between month 0 and months from 1 to 5 was detected.

Keywords: abscess, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, growth curve, ovine, sensibility, treatment

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O agronegócio de caprinos e ovinos no Brasil está criando novas possibilidades comerciais e industriais, promovendo, assim, o desenvolvimento do país. A produção das carnes ovina e caprina vem respondendo por uma parcela do mercado mundial, e apresentou entre 2003 e 2004 um incremento de 2,5% (12,3 milhões de toneladas para 12,6 milhões de toneladas). No Brasil, a produção de derivados em geral de caprinos e ovinos, entre os anos de 2000 e 2004, também aumentou, o que gerou expectativas de demandas quanto ao uso de tecnologias e de modelos de sistemas de produção, visando o bem-estar animal e ambiental, a saúde dos animais e a qualidade dos alimentos (ALVES e PINHEIRO, 2005). Alguns dos entraves relacionados à produção de caprinos e ovinos têm sido a utilização de manejos inadequados e a grande ocorrência de doenças, sendo uma delas a Linfadenite Caseosa (LC).

A LC é uma enfermidade crônica que acomete os pequenos ruminantes, caracterizada pela formação de granulomas em linfonodos superficiais, internos e em outros órgãos, cujo agente etiológico é uma bactéria pertencente à família *Actinomycetae*, denominada *Corynebacterium pseudotuberculosis* (BURRELL, 1981).

A *C. pseudotuberculosis* é um bacilo Gram positivo, imóvel, não esporulado e anaeróbio facultativo, que possui dimensões que variam de 0,5 a 0,6 µm de diâmetro e de 1,0 a 3,0 µm de comprimento. Pode se apresentar individualmente, em pares ou em paliçada e assumir as formas cocoides, bacilares ou filamentosas (BENHAM et al., 1962; BIBERSTEIN et al., 1971; MERCHANT e PACKER, 1975; BATEY, 1986; QUINN et al., 1994). Como principais fatores de virulência são citados os lipídeos da parede celular e uma exotoxina, denominada fosfolipase D (WALKER et al., 1994; PÉPIN et al., 1999).

As perdas econômicas atribuídas à LC estão relacionadas a quedas na produtividade em geral dos rebanhos, elevação nas taxas de descarte, condenação de peles e carcaças e aumento nos gastos com mão de obra e medicamentos (FIGUEIREDO et al., 1982; STOOPS et al., 1984; PATON et al., 1994; STANFORD et al., 1998; PINHEIRO et al., 2002; PATON et al., 2003). Além disso, existem vários relatos na literatura descrevendo a LC como uma zoonose ocupacional (MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997; JOIN-LAMBERT et al., 2006).

A infecção se instala no organismo animal, principalmente, através de abrasões ou soluções de continuidade na pele. O microrganismo livre ou no interior de fagócitos alcança o gânglio linfático regional e, através da multiplicação intracelular, promove a morte das células do organismo hospedeiro (JOLLY, 1965; HARD, 1969; BATEY, 1986). A *C. pseudotuberculosis* liberada no meio ambiente a partir da ruptura de abscessos superficiais persistem por um longo tempo, se tornando uma fonte de infecção constante para os outros animais (PÉPIN et al., 1999). A infecção subclínica associada à falha no diagnóstico precoce resulta em altos níveis de transmissão da enfermidade dentro do rebanho (BROWN et al., 1987; ELLIS et al., 1987).

O tratamento terapêutico da LC é ineficaz já que a *C. pseudotuberculosis* possui localização intracelular e a espessa cápsula que envolve os abscessos dificulta o acesso das drogas no interior da lesão. Atualmente, a drenagem cirúrgica do linfonodo acometido é considerada o único tratamento viável para a LC, apesar de representar altos riscos de contaminação ambiental (NAIRN e ROBERTSON, 1974).

Considerando a inexistência de uma técnica que atue concomitantemente no tratamento e no controle da LC, dois experimentos foram desenvolvidos. O objetivo do primeiro experimento foi selecionar, através de análises *in vitro*, dois antissépticos ou desinfetantes que apresentem alto poder bactericida contra a *C. pseudotuberculosis*. No segundo experimento, os dois produtos selecionados foram aplicados diretamente no interior de linfonodos acometidos pela *C. pseudotuberculosis*, visando evitar a contaminação ambiental e, conseqüentemente, reduzir a transmissão horizontal da enfermidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. A importância da saúde animal no agronegócio da caprino-ovinocultura. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA, 9, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Federação da Agricultura e Pecuária do Estado do Ceará, 2005, v. 1. p. 10-22.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 9, p. 269-272, 1986.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in disease of animals. **Commonwealth Bureau of Animal Health**, n. 32, p. 645-657, 1962.

BIBERSTEIN, E. L.; KNIGHT H. D.; JANG S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Record**, v. 89, n. 26, p. 691-692, 1971.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES, F. S. F. Synergistic hemolysis inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. **Canadian of Journal Veterinary Research**, v. 51, n. 1, p. 46-49, 1987.

BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 3, p. 105-110, 1981.

ELLIS, T. M., SUTHERLAND, S. S., WILKINSON, F. C., MERCY, A. R., PATON, M. W. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. **Australiana Veterinary Journal**, v. 64, p. 261-263, 1987.

FIGUEIREDO, E. A. P.; SHELTON, M.; PANT, K. P. **Goats skins**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., Tucson. **Proceedings...** Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p. 488-490.

HARD, G. C. Electron Microscopic Examination of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1480-1485, 1969.

JOIN-LAMBERT, O. F.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J.; BLANCHE, S.; BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing

lymphadenitis in a twelve-year-old patient. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, p. 848–851, 2006.

JOLLY, R. D. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 13, n. 6, p. 141-147, 1965.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A. **Bacteriología e Virología Veterinarias**. 3 ed. Zaragoza: Aciribia, 1975.

MILLS, A. E.; MITCHELL, R. D.; LIM, E. K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. **Pathology**, v. 29, n. 2, p. 231-233, 1997.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep: role of skin lesions and dipping fluid. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 12, p. 537-342, 1974.

PATON, M. W.; ROSE, I. R.; HART, R. A.; SUTHERLAND, S. S.; MERCY, A. R.; ELLIS, T. M.; DHALIWAL, J. A. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, n. 2, p. 47-49, 1994.

PATON, M. W.; WALKER, S. T.; ROSE, I. R.; WATT, G. T.; MERCY, A. R. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. ½, 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, n. 2, p. 185-191, 1997.

PÉPIN, M.; SANCHIS, R.; PATON, M. La lymphadénite caséuse des ovins et des caprins. **Point Veterinaire**, v. 30, p. 33-40, 1999.

PINHEIRO, R. R.; ALVES F. S. F.; ANDRIOLI, A. Diagnóstico precoce de doenças e sua importância na produção de caprinos e ovinos. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA, 6.; SEMANA DA CAPRINOVINOCULTURA BRASILEIRA, 3.; FEIRA DE PRODUÇÃO E SERVIÇOS AGROPECUÁRIOS, 6., 2002, Fortaleza. **Palestras técnicas**. Fortaleza: Federação da Agricultura do Estado do Ceará, 2002. p.7-21.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publishing Company, 1994.

STANFORD, K.; BROGDEN, K. A.; McCLELLAND, L. A.; KOZUB, G. C.; AUDIBERT, F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 38-43, 1998.

STOOPS, S. G.; RENSHAW, H. W.; THILSTED, J. P. Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 557–561, 1984.

WALKER, J.; JACKSON, H.; EGGLENTON, D. E.; MEEUSEN, E.; WILSON, M. J.; BRANDON, M. R. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2562-2567, 1994.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

AGENTE ETIOLÓGICO

A *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da Linfadenite Caseosa (LC), foi descrita pela primeira vez por Edward Nocard, no ano de 1888 (NOCARD, 1896), a partir de um caso de linfangite bovina. Sua nomenclatura atual foi adotada em 1948, na 6ª edição do *Bergey's Manual*. No entanto, a designação *Corynebacterium ovis* ainda foi usada como sinônimo até por volta da década de 1980 (ALVES et al., 1997).

A *C. pseudotuberculosis* caracteriza-se como um bacilo Gram positivo curto e irregular, medindo, aproximadamente, 0,5 a 0,6 µm de diâmetro por 1,0 a 3,0 µm de comprimento, podendo apresentar aspecto cocoide, mostrando-se isolado ou formando grupamentos irregulares ou em paliçada (Figura 1). São imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos e não formam esporos, como afirmam Benham et al. (1962), Merchant e Packer (1975), Batey (1986) e Quinn et al. (1994).

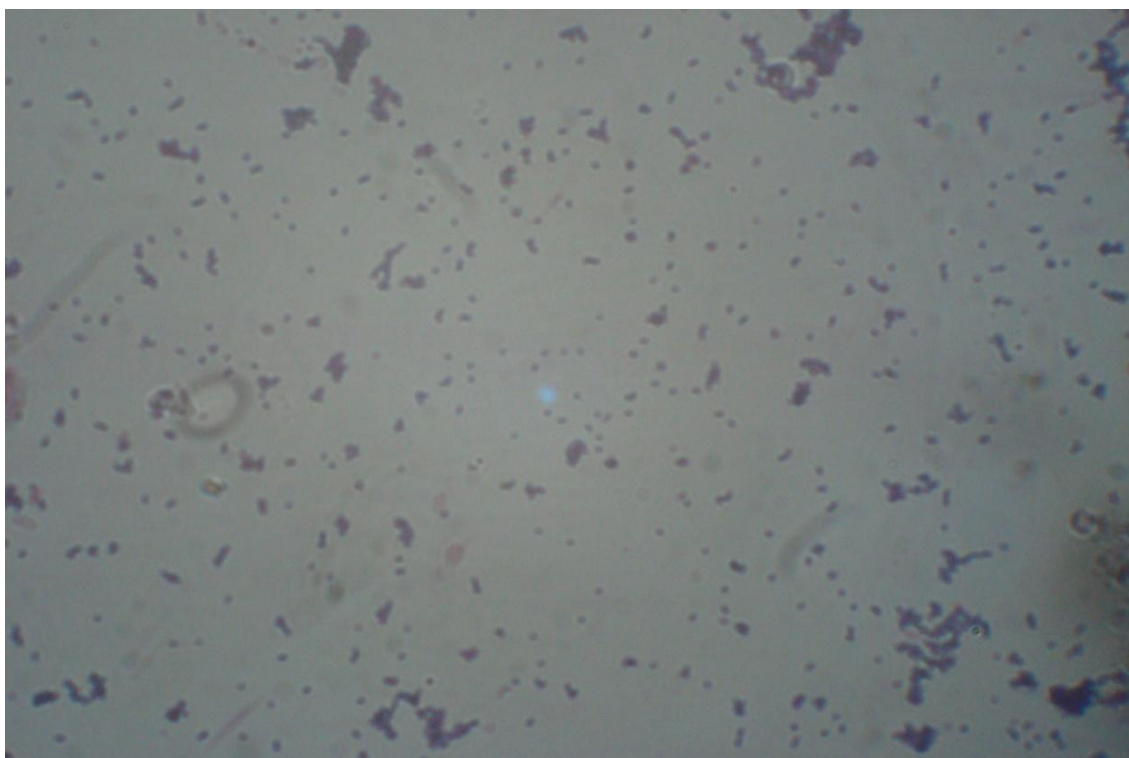


Figura 1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* em material purulento drenado do abscesso de um caprino. Coloração pelo método de Gram em aumento de 100 vezes em microscopia ótica.

Foto: Lauana Santiago e Francisco Selmo Alves.

Hard (1969) examinou a *C. pseudotuberculosis* através de microscopia eletrônica e observou que o microrganismo exibia uma estrutura similar às outras espécies do gênero, com relação à aparência de sua parede celular, membrana plasmática, material genético, matriz citoplasmática e complexidade dos sistemas de membrana intracitoplasmática. Uma importante característica encontrada foi uma camada densa, externa à parede celular, que demonstrou ser composta por lipídeos.

Baseado no conteúdo lipídico da parede celular, bactérias do gênero *Corynebacterium* são agrupadas com outras do gênero *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, formando o complexo “CMNR” conforme aponta Barksdale (1981). Os representantes deste grupo possuem a parede celular rica em componentes lipídicos similares, sendo o ácido micólico, o mais caracterizado dentre eles.

Os lipídeos associados à parede celular da *C. pseudotuberculosis* correspondem a 11,3% do peso seco da célula bacteriana (JOLLY, 1966; IONEDA e SILVA, 1979) e exercem um importante papel na virulência do microrganismo (JOLLY, 1966).

Takahashi et al. (1997) demonstraram a relação filogenética entre várias espécies de *Corynebacterium*, baseados na estrutura do gene *16S rRNA*. Neste estudo, a posição filogenética da *C. pseudotuberculosis* foi relacionada com a da *Corynebacterium ulcerans* e da *Corynebacterium seminale*.

Assim como outras corinebactérias, a *C. pseudotuberculosis* é capaz de produzir uma potente exotoxina, primeiramente descrita por Carne (1940). A fosfolipase D é encontrada no citoplasma e, em menores quantidades, na parede celular bacteriana. Seu peso molecular varia de 14,5 a 31,0 kDa, conforme afirmam Onon (1979) e Bernheimer et al. (1985). É inativada pelo calor (60°C por 10 minutos, 37°C por 2 semanas ou 25°C por três meses), pela acidez (pH abaixo de 5), ou pela formalina (CARNE, 1940). Todas as cepas e os dois biotipos sugeridos da *C. pseudotuberculosis*, que serão detalhados a seguir, produzem esta exotoxina (CARNE, 1940; BURRELL, 1978; MUCKLE e GYLES, 1982). Outras características da fosfolipase D são descritas, como a atividade hemolítica em sinergia com a colesterol-oxidase e a fosfolipase C da *Rhodococcus equi* e a resistência à hemólise pela toxina β estafilocócica (SONGER et al., 1988; SONGER, 1997; COSTA, 2002). Tais propriedades representam a base de dois testes sorológicos que detectam anticorpos anti-exotoxina, como o teste da inibição da hemólise sinérgica (IHS) e o teste da inibição da ação anti-hemolisina (ZAKI, 1968; KNIGHT, 1978). A *C. pseudotuberculosis* é identificada por provas bioquímicas como: produção de catalase, urease, fermentação de carboidratos sem produção de gás, como glicose, ribose, trealose

e apresentam-se variáveis quanto à fermentação de maltose e lactose (MUCKLE e GYLES, 1982; SONGER et al., 1988). Além disso, caracteriza-se por não possuir atividade proteolítica e ser β -hemolítica, conforme afirmam Merchant e Packer (1975), Quinn et al. (1994) e Sutherland et al. (1996) (Figura 2). Carne (1940) relatou variação na fermentação de carboidratos entre 50 cepas de *C. pseudotuberculosis*.

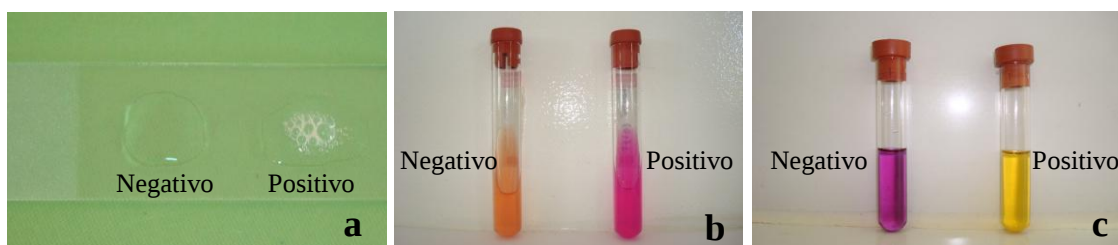


Figura 2. Provas bioquímicas para identificação da *Corynebacterium pseudotuberculosis*: a) catalase; b) urease; c) fermentação de carboidratos.

Foto: Lauana Santiago e Francisco Selmo Alves

Em relação à redução do nitrato, Biberstein et al. (1971) sugeriram a separação em dois biotipos diferentes. Songer et al. (1988) confirmaram a existência de duas biovariedades de *C. pseudotuberculosis*, após realização de um estudo, no qual foram avaliadas 94 amostras do microrganismo, obtidas a partir de ovinos, caprinos, eqüinos e bovinos e realizadas provas bioquímicas e análises de DNA. Não foram observadas diferenças significativas em relação à fermentação de carboidratos, produção de urease, catalase e fosfolipase D entre as amostras. Entretanto, as amostras obtidas a partir de eqüinos foram capazes de reduzir o nitrato, ao contrário das amostras provenientes de ovinos e caprinos. Os bovinos são infectados tanto por cepas nitrato positivas, quanto por cepas nitrato negativas (Tabela 1). Além disso, os autores sugerem que o biotipo que infecta eqüinos seja denominado *equi*, e que o biotipo que infecta caprinos e ovinos, seja denominado *ovis*. A análise através de enzimas de restrição confirmou a diferença entre os dois biotipos.

Em condições aeróbicas e anaeróbicas, observa-se o crescimento da *C. pseudotuberculosis* na faixa de temperatura entre 14 e 40°C, porém seu crescimento ótimo se dá em uma temperatura de 37°C e em pH de 7,0 a 7,8. Alguns autores relacionam um melhor crescimento do microrganismo em atmosfera de 5% de CO₂, como Benham et al. (1962) e Muckle e Gyles (1982). Uma taxa ótima de crescimento em pH de 7,0 a 7,5 pode ser obtida através da adição de Tween 80® ao meio de cultura (BATEY, 1986).

Tabela 1. Redução do nitrato e manifestação clínica da infecção de acordo com a espécie animal afetada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Espécie Animal Afetada	Redução do Nitrato	Manifestação Clínica
Caprinos e Ovinos	-	Linfadenite Caseosa
Eqüinos	+	Linfangite Ulcerativa
Bovinos	+/-	Lesões Piogênicas e Supurativas

A *C. pseudotuberculosis* cresce bem em meios enriquecidos como ágar sangue, ágar BHI (infusão de cérebro e coração) ou caldo BHI, ou enriquecidos com soro animal ou proteínas vegetais. Uma melhora em seu crescimento é obtida através da adição de extrato de levedura, triptona ou lactalbumina (CAMERON e SWART (1965). No ágar sangue, formam-se colônias pequenas de coloração branco-acinzentada, opacas e friáveis, após um período de 24 a 48 horas (BROWN, 1985) (Figura 3). Após alguns dias de incubação, as colônias podem alcançar 3 mm de diâmetro, tornando-se amarelo-esbranquiçadas, conforme afirmam Quinn et al. (1994).

Figura 3. Crescimento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em placa de ágar sangue, apresentando colônias de coloração branca e aspecto seco.
Foto: Lauana Santiago e Francisco Selmo Alves.



Em meio líquido como o caldo BHI, ocorre formação de uma frágil película na superfície, com leve turvação do meio (Figura 4). Com agitação, desfaz-se a película e formam-se os flocos (CARNE, 1939; MERCHANT e PACKER, 1975; MUCKLE & GYLES, 1982). Esta película é atribuída aos lipídios de superfície e está diretamente relacionada à virulência da linhagem (JOLLY, 1966).



Figura 4. Crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis* em meio líquido de BHI com formação de película na superfície.

Foto: Lauana Santiago e Francisco Selmo Alves.

Costa et al. (2002) descreveram um meio quimicamente definido para o cultivo da *C. pseudotuberculosis*, composto por 72% de fosfato dibásico, 4% de vitaminas e 1% de aminoácidos. Este meio foi usado para a produção de complexo antigênico secretado por *C. pseudotuberculosis*, que mostrou ser capaz de induzir a produção de Interferon-gama (IFN-gama) por células do sangue periférico de caprinos com sinais clínicos da LC (REGIS, 2001). Livre de macromoléculas na sua composição, o meio quimicamente definido permitiu a obtenção de complexos antigênicos compostos apenas por proteínas da bactéria e abriu novas perspectivas para o estudo das proteínas secretadas (COSTA et al., 2002).

OCORRÊNCIA E PERDAS ECONÔMICAS

A LC possui distribuição cosmopolita, sendo descrita em todos os países que possuem significativa população de caprinos e ovinos (ANDERSON e NAIRN, 1984). Em relação à distribuição mundial destas espécies, a China é a detentora do maior rebanho de pequenos ruminantes do mundo, seguida pela Índia e pelo Sudão. O Brasil encontra-se em 15º lugar, totalizando um rebanho de, aproximadamente, 26.000.000 cabeças de caprinos e ovinos (FAO, 2008) (Tabela 2).

Tabela 2. Efetivo mundial do rebanho de caprinos e ovinos

Países	Nº Cabeças
China	285.812.950
Índia	190.721.000
Sudão	94.200.000
Nigéria	87.674.700
Paquistão	83.853.000
Austrália	79.518.024
Irã	79.100.000
Bangladesh	58.044.000
Etiópia	46.901.442
Mongólia	38.331.700
Nova Zelândia	34.183.595
Reino Unido	33.226.000
África do Sul	31.973.912
Turquia	29.568.160
Brasil	26.000.000
Mundo	1.940.080.777

Fonte: FAO (2008)

Alguns autores sugerem que as origens da LC podem estar na Europa e que a disseminação da *C. pseudotuberculosis* pelo mundo ocorreu através de exportações de ovinos realizadas durante o século XVIII. A raça Merino, originária da Espanha e de extremo valor pela sua dupla aptidão, foi extensivamente exportada neste período para

África do Sul e, posteriormente, para Austrália e para as Américas (PATON, 2000; BAIRD e FONTAINE, 2007).

Estudos relacionados à prevalência e incidência da LC nos rebanhos mundiais de caprinos e ovinos têm sido realizados, com o intuito de avaliar a sua distribuição e como forma de prever as perdas relacionadas à enfermidade, na exploração econômica destas espécies. Entretanto, algumas dificuldades enfrentadas na realização deste tipo de estudo, como a forma subclínica de apresentação da doença e seu longo período de incubação, fazem com que esses dados ainda sejam escassos (BROWN, 1985).

Batey et al. (1986) avaliaram um total de 2.920 caprinos encaminhados ao abate na região da Austrália Ocidental e estimaram a prevalência de LC em $7,8\% \pm 0,9\%$. Lesões na cabeça, no corpo e nas vísceras estavam presentes, respectivamente, em 49,3%, 46,7% e 12,3% dos animais acometidos.

A prevalência da LC entre os anos de 1990 e 1999 foi estimada em uma investigação através de questionários enviados a cirurgiões veterinários e produtores de ovinos no Reino Unido (BINNS et al., 2002). Dos veterinários que responderam ao questionário, 18% já haviam presenciado pelo menos um caso de LC, e 45% dos produtores já haviam observado a presença de abscessos nos animais de seus rebanhos. Poucos produtores investigaram a causa dos abscessos. Entretanto, 24 dos 32 produtores que coletaram e enviaram material ao laboratório para investigação tiveram a enfermidade confirmada em seus rebanhos.

Um estudo realizado por Çetinkaya et al. (2002), desenvolvido no período de setembro a dezembro do ano de 2000, estimou a prevalência de LC em caprinos e ovinos abatidos no frigorífico da região de Elazig, no leste da Turquia. Cepas de *Corynebacterium* spp. foram isoladas em 81,4% dos abscessos encontrados, resultando em uma prevalência total de LC nesta região igual a 2,2%, sendo 3,5% em ovinos e 1,1% em caprinos.

Paton et al. (2003) estimaram a prevalência da LC em 223 rebanhos ovinos localizados em três estados da Austrália: Nova Gales do Sul, Vitória e Austrália Ocidental. A prevalência média de LC em ovinos adultos foi de 26%, variando de 20% na Austrália Ocidental a 29% em Nova Gales do Sul. De todos os rebanhos analisados, 95% tinham, pelo menos, um animal acometido pela LC.

Arsenault et al. (2003) realizaram um estudo para estimar a prevalência de algumas enfermidades que acometem caprinos e ovinos, em dois abatedouros em Quebec, no Canadá, entre elas a LC. A prevalência estimada para esta enfermidade foi

de 21%, sendo que os abscessos estavam presentes, em maior proporção, nos linfonodos da cavidade torácica.

Uma avaliação epidemiológica desenvolvida no Egito, no período de janeiro a dezembro de 2008, determinou uma prevalência de 19,23% de LC com base na apresentação clínica da enfermidade e de 17,32% de acordo com a confirmação bacteriológica da *C. pseudotuberculosis*, após a avaliação de 1466 caprinos e ovinos (AL-GAABARY et al., 2009).

No Brasil, a maior incidência da enfermidade é observada nos estados do Nordeste já que, aproximadamente, 91% da população de caprinos e 56% da população ovinos encontram-se nessa região (ALVES et al., 1997; IBGE, 2008) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Distribuição regional brasileira do efetivo do rebanho caprino

	Nº Cabeças	% do Rebanho Total
Norte	176.443	1,89
Nordeste	8.521.388	91,09
Sudeste	226.059	2,42
Sul	317.922	3,39
Centro-Oeste	113.408	1,21
Brasil	9.355.220	100

Fonte: IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal (2008)

Tabela 4. Distribuição regional brasileira do efetivo do rebanho ovino

	Nº Cabeças	% do Rebanho Total
Norte	534.478	3,21
Nordeste	9.371.905	56,36
Sudeste	764.971	4,60
Sul	4.846.667	29,15
Centro-Oeste	1.110.550	6,68
Brasil	16.628.571	100

Fonte: IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal (2008)

Moura-Costa et al. (1973) estudaram a distribuição geográfica da LC nos rebanhos caprinos no Estado da Bahia e relataram que a doença estava presente, particularmente, no Norte do Estado.

Um estudo da prevalência da LC em caprinos, realizado no município de Casa Nova, no Estado da Bahia (LIMA, 1980), mostrou uma estimativa da prevalência da presença de abscessos de 4,73% em machos e 4,67% em fêmeas, sendo que o grupo etário de machos com 15 a 25 meses de idade apresentou uma maior positividade (6,77%), assim como o grupo etário de fêmeas de 25 a 35 meses de idade (8,96%). Dos 90 abscessos encontrados, 41 estavam em condições de ser coletados e somente em 25 foi isolada e identificada a *C. pseudotuberculosis*. Em 41,11% dos casos, os abscessos se localizavam no pescoço, estando o restante distribuído nas outras partes do corpo do animal.

Num levantamento realizado no Estado do Ceará, 656 caprinos foram examinados por um período de quase dois anos. Constatou-se a presença de abscessos superficiais em 41,6% dos animais, estando a maioria deles, localizada na região anterior do corpo. Dos animais, 11,5% apresentaram abscessos nos órgãos internos, com maior porcentagem de localização nos pulmões e epidídimos. A *C. pseudotuberculosis* foi confirmada em 27,7% dos abscessos (UNANIAN et al., 1985).

Um estudo sorológico desenvolvido na Bahia demonstrou a presença de anticorpos séricos contra a *C. pseudotuberculosis* em 46,6% dos caprinos analisados (MEYER, 2004).

Durante os meses de fevereiro a julho de 1997, foi realizada uma coleta de 4712 soros de caprinos em 177 propriedades localizadas em diversos municípios do estado do Ceará. A soroprevalência da LC obtida para os animais foi de 26,3% e para as propriedades de 84,5% (CARMO et al., 2009).

Guimarães et al. (2009) conduziram um estudo epidemiológico no estado de Minas Gerais, onde foram coletadas 642 amostras de soro de ovinos provenientes de 97 diferentes propriedades no estado. A prevalência da infecção nos animais avaliados foi estimada em 70,9% e das propriedades infectadas em 95,9%.

Os prejuízos causados pela LC na produção de caprinos e ovinos estão relacionados a alguns aspectos da patogenia da enfermidade. Inicialmente, a presença de abscessos em linfonodos superficiais pode interferir na execução das funções normais do animal como pastear, mastigar, regurgitar e amamentar as crias. Já a forma visceral da doença pode acarretar consequências mais graves ao organismo, como debilitação do animal e disseminação dos abscessos no organismo com quedas na produção, problemas reprodutivos (KRISHNA et al., 1977; ALVES, 1988), condenação de carcaças e, até mesmo, morte de animais (BURRELL, 1981). A presença de abscessos superficiais é

responsável pela desvalorização das peles, sendo que um único abscesso na pele do animal pode depreciar seu valor em até 40% (FIGUEIREDO et al., 1982). Além disso, perdas econômicas estão relacionadas à produção de lã (PATON et al., 1994) e aos gastos com mão-de-obra (R\$0,19) e medicamentos (R\$3,30) no tratamento dos abscessos (PINHEIRO et al., 2002). Estudos realizados na Austrália indicam uma perda anual de \$12 a 15 milhões nos abatedouros de caprinos e ovinos relacionada a danos totais causados pela LC (PATON et al., 2003). Em relação à produção de lã, a LC é responsável por uma perda de \$17 milhões por ano, para a indústria australiana (PATON et al., 1994).

TRANSMISSÃO

A transmissão da LC em ovinos ocorre, principalmente, através de ferimentos na pele. Em caprinos, a forma de transmissão, provavelmente, seja a mesma (NAIRN e ROBERTSON, 1974). Unanian et al. (1985) sugeriram que a infecção através da pele é importante, particularmente em caprinos do Nordeste do Brasil, devido ao tipo de vegetação predominante na região (caatinga), caracterizada por pequenas árvores contendo espinhos que podem causar ferimentos superficiais. Em estudos sobre indução experimental da LC em cabras, demonstrou-se que 100% dos animais infectados por inoculação subgengival apresentaram granulomas mandibulares (ASHFAQ e CAMPBELL, 1980). A aspiração de aerossóis também é citada como forma de contágio desta enfermidade (CHAPLIN et al., 1999).

A porta de entrada da *C. pseudotuberculosis* no organismo do animal ainda não está bem esclarecida, porém alguns autores afirmam que a infecção ocorre através da pele ou mucosa e a partir daí, atinge os linfonodos locais (BURRELL, 1981; BATEY, 1986). A porta de entrada e distribuição dos abscessos no corpo diferem entre caprinos e ovinos, por ocasião da tosquia e diferentes comportamentos entre as espécies conforme dados fornecidos por Nairn e Robertson (1974), Ashfaq e Campbell (1979) e Paton et al. (1995).

Lesões pulmonares clinicamente não diagnosticadas em ovinos seriam responsáveis pela liberação das bactérias em aerossóis, atuando como fonte de infecção para os animais (PATON et al., 1995). Pelo fato do microrganismo ser capaz de sobreviver por um longo período no ambiente, ele se torna uma constante fonte de infecção (WILLIAMS, 1980). Alguns autores afirmam que animais portadores de lesões pulmonares representam a principal fonte de infecção para rebanhos de ovinos infectados pela LC (PÉPIN et al., 1994a; WILLIAMSON, 2001). Este relato é baseado em estudos epidemiológicos desenvolvidos na Austrália que demonstram um rápido aumento na soroprevalência de LC em rebanhos de ovinos que não possuíam lesões superficiais (ELLIS et al., 1987; PATON et al., 1988).

A disseminação desta bactéria no meio ambiente ocorre através da ruptura dos abscessos e pela habilidade de sobrevivência desse microrganismo por longos períodos no solo e em materiais diversos. O exsudato purulento de uma lesão de LC apresenta uma concentração aproximada de 1×10^6 a 5×10^7 células bacterianas viáveis por grama

de material (BROWN e OLANDER, 1987), sendo que a *C. pseudotuberculosis* é capaz de sobreviver por vários dias nos cascos e em superfícies de madeira, e por várias semanas em fezes de caprinos e em fenos em temperatura entre 10 e 25°C (AUGUSTINE e RENSCHAW, 1986). Existem outras importantes maneiras de disseminação da enfermidade, como tatuagem, marcação, castração, vacinação, briga entre animais e compra de animais infectados ou em estado subclínico da doença.

Os fatores de risco relacionados à LC em ovinos incluem a raça (BRUERE e WEST, 1990; GUIMARÃES et al., 2009), a idade avançada (PÉPIN et al., 1994a; PATON et al., 1995; GUIMARÃES et al., 2009) e a existência de um ambiente contaminado (BRUERE e WEST, 1990). Entretanto, o principal fator de risco identificado na Austrália e em vários outros países do mundo é a ocorrência de pequenas lesões na pele de ovinos em decorrência da tosquia (SERIKAWA et al., 1993; AL RAWASHDEH e AL QUDAH, 2000).

Tanto em ovinos quanto em caprinos, os principais sítios da infecção são os linfonodos superficiais, sendo as lesões viscerais observadas em poucos animais. Entretanto, em ovinos, os abscessos internos e particularmente as lesões pulmonares ocorrem mais frequentemente do que em caprinos (AYERS, 1986; MUCKLE e MENZIES, 1993).

A infecção experimental por várias vias em ovinos, caprinos e animais de laboratório, tem mostrado que a LC pode ser facilmente reproduzida (NAIRN e ROBERTSON, 1974), através de lesões localizadas nos linfonodos periféricos e abscessos viscerais disseminados nos pulmões e linfonodos torácicos. Vários experimentos indicam que os principais determinantes da severidade da enfermidade na infecção experimental são a dose do inóculo e a via de inoculação. Entretanto, na ocorrência natural da doença, esses parâmetros não são reconhecidos (BROWN et al., 1986).

A infecção em humanos é rara, mas produz uma linfadenite recidivante e de curso longo (PEEL et al., 1997), com lesões caracterizando uma linfadenite granulomatosa (BATEY, 1986). Grande parte das infecções humanas está relacionada a pessoas envolvidas com o manejo dos animais e trabalhadores de frigoríficos. O primeiro caso de infecção pela *C. pseudotuberculosis* em humanos foi relatado por Lopez et al. (1966). O quadro clínico era caracterizado pela presença de mialgia, hepatomegalia e linfadenopatia localizada. A caracterização do microrganismo foi realizada pela identificação microbiológica do material coletado, através de aspiração e

incisão do linfonodo inguinal afetado. Ao exame anátomo-patológico do linfonodo, foram observadas áreas com foco de inflamação crônica e células epitelióides circundadas por reação fibroblástica, caracterizando linfadenite esclerótica crônica. Mills et al. (1997) relataram o caso de um jovem estudante com a presença de uma massa na axila. O paciente apresentava febre, dor, indisposição e estava exposto a ovelhas e bovinos. Os autores sugeriram que a infecção tenha ocorrido a partir do contato das fezes de um animal, com uma provável lesão na pele do jovem. Peel et al. (1997) descreveram um caso humano de infecção pela *C. pseudotuberculosis*, envolvendo a ingestão de carne *in natura* de caprinos e leite de vaca. Em torno de 25 casos de infecção pela *C. pseudotuberculosis* em humanos foram descritos na literatura, segundo Dorella et al. (2005). Na maioria dos casos, os pacientes receberam antibioticoterapia e os linfonodos afetados foram removidos cirurgicamente (MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997; LIU et al., 2005). Recentemente, foi descrito um caso de linfadenite necrosante em uma criança de 12 anos de idade, na França, que havia tido contato com ovinos durante seu período de férias (JOINT-LAMBERT et al., 2006). Para o tratamento da infecção foi necessária a remoção cirúrgica de todo o tecido afetado associada à antibioticoterapia endovenosa por quatro meses e oral durante seis meses. A LC, apesar de ocorrer com rara frequência em seres humanos e possuir um potencial de zoonose já demonstrado, não é caracterizada como uma doença zoonótica em sua definição. Uma boa higiene, quando se manuseia animais doentes e materiais contaminados com exsudato, é de suma importância para impedir a propagação da doença (PEEL et al., 1997).

PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A *C. pseudotuberculosis* possui dois fatores de virulência que estão diretamente relacionados com a patogenia da LC: a parede celular lipídica, por atuar como fator piogênico e a exotoxina, por promover a disseminação da bactéria no organismo (JOLLY, 1966; ZAKI, 1976).

A presença de lipídeos associados à parede celular bacteriana, além de atuar como fator piogênico, está relacionada ao aumento da virulência do microrganismo por impedir sua fagocitose pelas enzimas lisossômicas da célula hospedeira (JOLLY, 1966). Outros autores acreditam que estes lipídeos estejam relacionados à citotoxicidade (BATEY, 1986; SONGER et al., 1990).

Uma relação entre virulência e quantidade de lipídeos na parede celular da *C. pseudotuberculosis* foi evidenciada em infecções experimentais, tanto em camundongos quanto em ovinos (BURRELL, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983). Nos dois casos, foi observada uma alta relação entre o conteúdo lipídico das cepas testadas e sua capacidade de formar granulomas. Segundo Williamson (2001), os lipídeos celulares da bactéria têm característica piogênica e este fator de virulência está associado à formação de granulomas.

Já a fosfolipase D é responsável por causar supuração, dermonecrose e morte em diversas espécies de animais de laboratório e de animais domésticos (CARNE, 1940; JOLLY, 1965; LOVELL e ZAKI, 1966). Além disso, ela é capaz de agir como um fator de permeabilidade, promovendo a disseminação do agente do local infectado a outras partes do organismo animal, uma vez que as membranas das células dos mamíferos possuem altos teores de fosfolipídeos. Estudos *in vitro* com neutrófilos de ovinos, demonstraram que a fosfolipase D, quando no interior das células, tem a habilidade de destruí-las. Assim, a exotoxina pode aumentar a sobrevivência da *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro, devido à sua capacidade de destruir e escapar da ação destas células, como demonstram Yozwiak e Songer (1993). Os mesmos autores afirmam que a fosfolipase D atua na depleção do sistema do complemento, protegendo o microrganismo contra opsonização, além de reduzir a quimiotaxia de neutrófilos para o sítio inicial da infecção, evitando a fagocitose. Em um estudo conduzido por McNamara et al. (1994), linhagens mutantes com o gen da fosfolipase D deletado foram utilizadas para demonstrar que estes mutantes não são capazes de estabelecer uma infecção

primária ou formar granulomas nos linfonodos regionais, confirmando que a exotoxina está envolvida na persistência e disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro.

Burrell (1981) demonstrou, em ovinos, a presença de grande quantidade de prostaglandina, induzindo uma resposta inflamatória local, desencadeando um aumento da permeabilidade e um deslocamento de fagócitos para os linfonodos.

As atividades hemolítica, vasodilatadora e fosfolipásica da exotoxina são essenciais para a disseminação da bactéria no organismo animal (BENHAM et al. 1962; JOLLY, 1966; BURRELL, 1981; BATEY, 1986; SONGER, 1997).

Após atingir os linfonodos locais, a infecção evolui com fagocitose, multiplicação intracelular da *C. pseudotuberculosis*, desintegração e morte celular. Esse processo é cíclico e recorrente, causando as lesões crônicas típicas da LC em ovinos (ALVES et al., 1997). Através da via linfática, ocorre o acometimento de linfonodos torácicos e dos pulmões e, posteriormente, de outros órgãos causando debilitação progressiva do animal (BATEY, 1986; ALVES et al., 1997) (Figura 5).

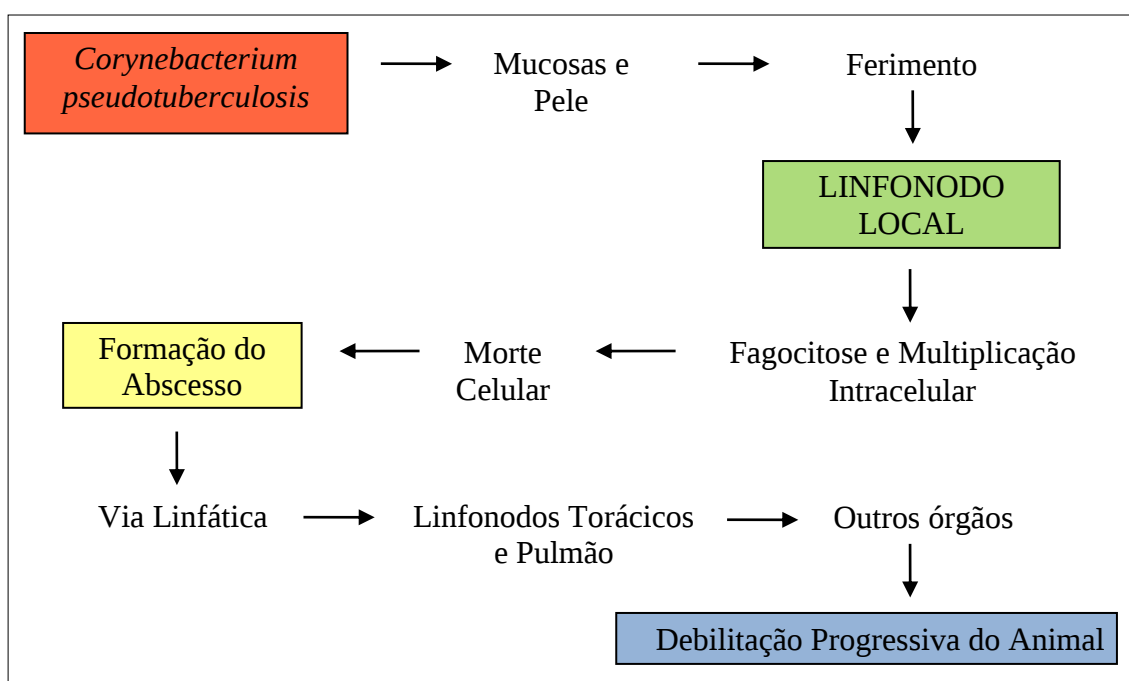


Figura 5. Esquema da evolução da patogenia da Linfadenite Caseosa.

Fonte: Alves et al. (1997), adaptado de Batey (1986).

Independente do local de instalação da *C. pseudotuberculosis*, seja nos linfonodos e/ou nos pulmões, ocorre formação de um exsudato caseoso denso, de coloração branco-amarelada, contido na cápsula fibrosa que pode assumir um grande diâmetro. Com a progressão da enfermidade, este exsudato torna-se seco e com

infiltrações de sais de cálcio. Em abscessos avançados, a secreção purulenta organiza-se em camadas concêntricas. Nos focos pulmonares primários, os abscessos confluem, gerando um aspecto lardáceo, de forma irregular. Lesões subpleurais ocasionam aderências da víscera à pleura parietal. Em alguns casos, o exsudato, que geralmente apresenta coloração creme, pode assumir uma coloração esverdeada ou acinzentada, pela contaminação por outras bactérias da flora normal (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

A disseminação hematógena do microrganismo resulta na formação de abscessos em órgãos, podendo ocorrer na ausência de lesões periféricas (RADOSTITS et al., 2002) (Figura 6). É relatado que 25% dos ovinos acometidos apresentam lesões somente nas vísceras torácicas (BROWN e OLANDER, 1987).

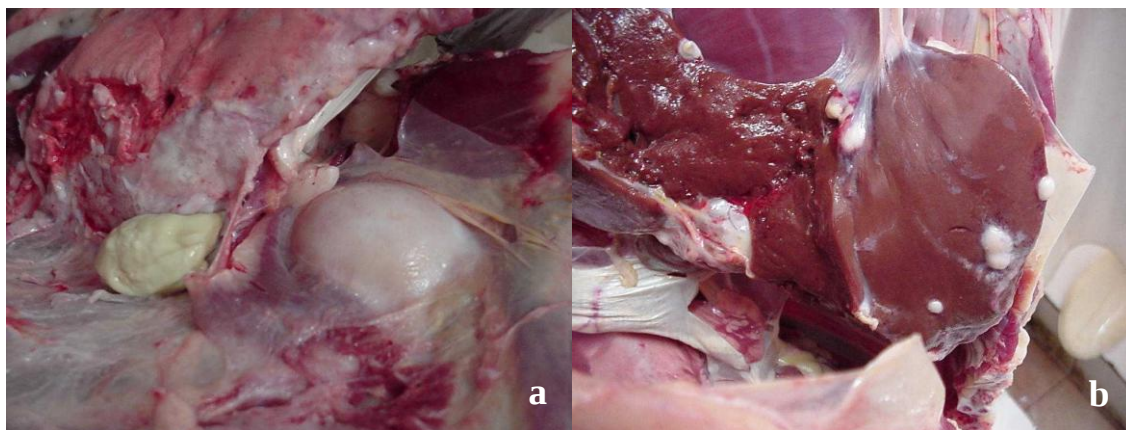


Figura 6. Abscessos internos e aderências ocasionadas pela Linfadenite Caseosa: a) abscessos pulmonares; b) abscessos hepáticos.

Foto: Raymundo Rizaldo Pinheiro e Francisco Selmo Alves.

No que diz respeito aos achados clínicos, a LC apresenta-se sob duas formas: a forma cutânea externa, caracterizada por linfadenopatia uni ou bilateral, e a forma visceral interna, com abscessos nos linfonodos internos, órgãos e vísceras. Os linfonodos externos mais comumente acometidos são os submaxilares, pré-escapulares, pré-crurais, supramamários e poplíteos. Os abscessos comumente se rompem, eliminando pus, cremoso a caseoso, sem odor (RADOSTITS et al., 2002). Os caprinos apresentam maior proporção de lesões nos linfonodos que drenam a cabeça, possivelmente relacionados a lesões superficiais da pele e mucosa oral, durante o pastoreio (BATEY, 1986). Os abscessos podem se desenvolver, subsequente, em outros linfonodos. Tanto nos ovinos quanto nos caprinos podem aparecer abscessos na pele e, particularmente, na face, com perda dos pêlos subjacentes (RADOSTITS et al., 2002) (Figura 7).

Uma condição debilitante observada em ovelhas adultas, comumente referida como “Síndrome da Ovelha Magra”, está associada à forma visceral da LC (GATES et al., 1977), promovendo a perda de peso e resultando em morbidade e deficiência reprodutiva dos animais. Em um reprodutor caprino portando LC crônica foram observados caquexia e comprometimento dos testículos e anexos, causando infertilidade (ALVES et al., 2004).

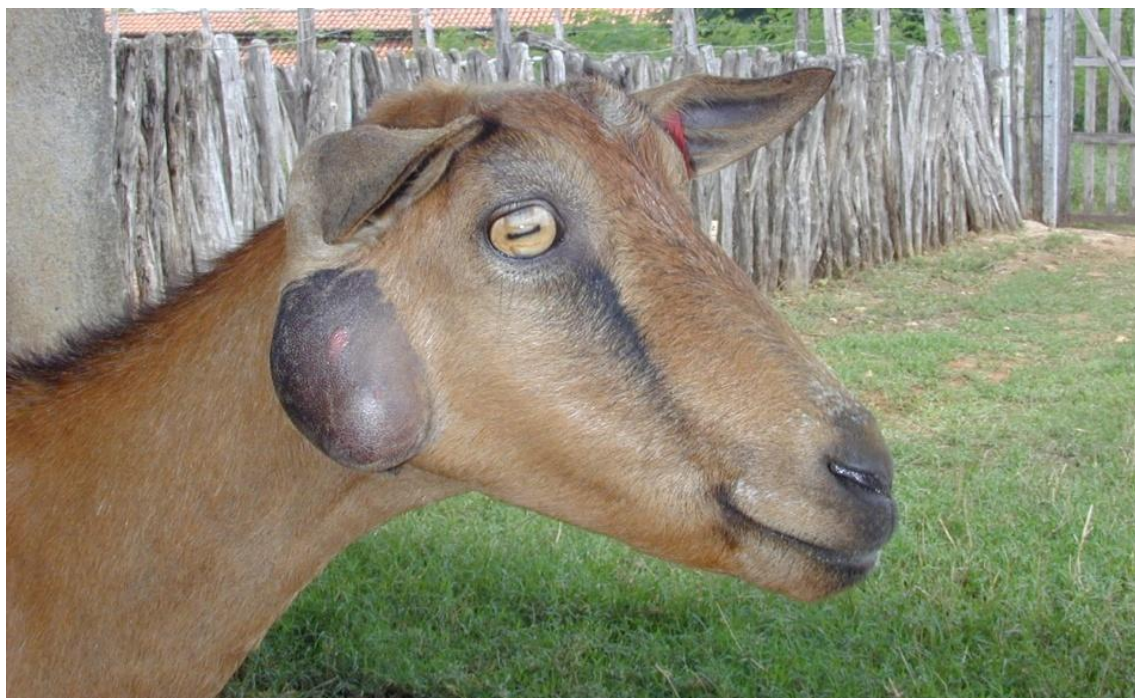


Figura 7. Abscesso externo de Linfadenite Caseosa com localização mandibular.
Foto: Raymundo Rizaldo Pinheiro e Francisco Selmo Alves.

IMUNOLOGIA

O principal mecanismo de defesa contra os microrganismos extracelulares e as toxinas por eles secretadas é a imunidade humoral, pois os anticorpos podem se ligar a esses elementos e auxiliar na sua eliminação. Ao contrário, os microrganismos intracelulares sobrevivem e se proliferam dentro dos fagócitos e de outras células do hospedeiro, ficando inacessíveis aos anticorpos circulantes. A defesa contra essas infecções está a cargo da imunidade celular, que funciona promovendo destruição dos microrganismos que residem nos fagócitos ou lisando as células infectadas (BURMESTER e PEZZUTO, 2003).

A resposta imune do hospedeiro promovida contra a *C. pseudotuberculosis* é complexa e envolve tanto a resposta imune mediada por células quanto a resposta imune humoral (ELLIS et al., 1990).

Cameron e Engelbrecht (1971) demonstraram a proteção desencadeada por anticorpos, através da imunização passiva de camundongos com soro de coelhos imunizados contra a *C. pseudotuberculosis*. Posteriormente, Yozwiak e Songer (1993) relataram que anticorpos anti-fosfolipase D, presentes antes da infecção, exercem um efeito protetor contra a disseminação da bactéria para os linfonodos. Em estudo de Muckle et al. (1992), anticorpos presentes em soros de animais infectados reagiram com várias frações protéicas em Western Blotting (WB), quando foram utilizados antígenos de parede celular, células inteiras mortas e sobrenadante de cultura da *C. pseudotuberculosis*. Entretanto, segundo Vale (2000), esta forte resposta humoral, por si só, não é capaz de eliminar a infecção.

A principal resposta imune protetora contra a *C. pseudotuberculosis* é a imunidade mediada por células. Ela consiste em dois tipos principais de reações: morte dos microrganismos fagocitados, devido à ativação dos macrófagos pela citocinas derivadas dos linfócitos, principalmente o IFN-gama, e lise das células infectadas, efetuada pelas células T citolíticas (CD8+) (VALE, 2000).

A fagocitose é o mecanismo de maior importância da imunidade natural contra microrganismos intracelulares (NORTH, 1978). Entretanto, bactérias intracelulares patogênicas são resistentes à degradação dentro dos fagócitos, razão pela qual estes microrganismos tendem a causar infecções crônicas, difíceis de serem erradicadas. Segundo Tashjian e Campbell (1983), a resistência da *C. pseudotuberculosis* à morte e à

digestão no interior dos fagócitos está relacionada aos lipídeos da parede celular bacteriana.

Os granulomas são formados por várias camadas, constituídos por um centro necrótico, seguido de uma camada rica em macrófagos. Esta camada possui uma zona com predominância de LT CD4+, LT CD8+ e LT gama-delta (linfócitos T expressando as cadeias gama e delta em seus receptores) e outra rica em LB limitada externamente por uma cápsula fibrótica (WALKER et al., 1991). Pépin et al. (1994b) relataram que nos estágios iniciais das lesões existe uma predominância de células T CD4+ e na fase crônica da infecção, a predominância passa a ser de células T CD8+ e T gama-delta.

A resistência às infecções causadas por bactérias intracelulares facultativas está relacionada às células T CD4+ e mais especificamente aos clones Th1, pelo aumento da atividade microbicida dos macrófagos, pela produção de INF-gama e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-alfa).

O papel das células T CD8+ na resistência deste tipo de infecção está relacionado à capacidade de produzir INF-gama e lisar as células infectadas (LAN et al., 1998; CARMINATI, 2005). O papel do IFN-gama no controle da infecção pela *C. pseudotuberculosis* foi observado em ratos, nos quais foi detectado um aumento no crescimento bacteriano após a administração de anticorpos monoclonais anti-IFN-gama (LAN et al., 1998). Além disso, estudos em animais que apresentam deleção do gene que codifica esta citocina também demonstraram fundamental importância do IFN-gama para a proteção imune do hospedeiro (PÉPIN et al., 1997).

Paule et al. (2003) conduziram um estudo para avaliar as respostas imunes humoral e celular a partir de infecção experimental pela *C. pseudotuberculosis* em caprinos, no qual confirmaram o envolvimento de Imunoglobulinas G (IgG) e de IFN-gama na resposta imune. Neste experimento, os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a intensidade da resposta imune observada, mais relacionada à produção de IFN-gama, do que à resposta imune humoral. O primeiro grupo foi composto por animais com alta resposta e o segundo grupo por animais com resposta de média a baixa. Os dois grupos apresentaram uma resposta primária de curta duração no dia 5 após a infecção. Já a partir do 16º dia, uma forte resposta secundária e de longa duração foi observada no primeiro grupo. O teste ELISA indireto foi capaz de detectar títulos de anticorpos positivos contra a *C. pseudotuberculosis* entre o dia 6 e 11 após a infecção nos dois grupos. A afinidade pela IgG oscilou, inicialmente, em uma faixa de 15 a 45%, mostrando um incremento de 5% ao longo das 20 semanas de experimento.

Meyer et al. (2005) utilizaram a produção de IFN-gama para avaliar a resposta imune produzida contra antígenos secretados e antígenos somáticos de *C. pseudotuberculosis*. Os resultados demonstraram uma diferença significativa na habilidade dos dois antígenos em induzir uma resposta imune celular. A produção de IFN-gama foi alta em resposta aos antígenos secretados, ao contrário da resposta contra antígenos somáticos, em que a produção de IFN-gama foi baixa.

Os testes de diagnósticos que detectam a presença de anticorpos são incapazes de diferenciar animais infectados pela *C. pseudotuberculosis* de animais uma vez expostos a infecção, já que não existe correlação entre os títulos de anticorpos e a intensidade da infecção (ELLIS et al., 1990). Entretanto, a utilização do IFN-gama na detecção da resposta imune mediada por células contra a *C. pseudotuberculosis* tem mostrado um grande avanço nos testes de diagnóstico e nas estratégias de erradicação que propõem a eliminação dos animais positivos do rebanho.

DIAGNÓSTICO

A identificação dos animais infectados e sua remoção do rebanho são os métodos mais efetivos para o controle da LC. Essa identificação pode ser realizada, inicialmente, através do diagnóstico clínico, no qual se visualiza a presença de abscessos nos linfonodos superficiais do animal.

Além deste, pode ser realizada a identificação do agente etiológico através do exame bacteriológico do material caseoso drenado a partir dos abscessos (BAIRD e FONTAINE, 2007). As provas bioquímicas são métodos bastante simples utilizados para realizar o diagnóstico diferencial, em relação aos possíveis microrganismos que são encontrados no material purulento drenado a partir dos linfonodos de animais acometidos por outras enfermidades (Figura 8).

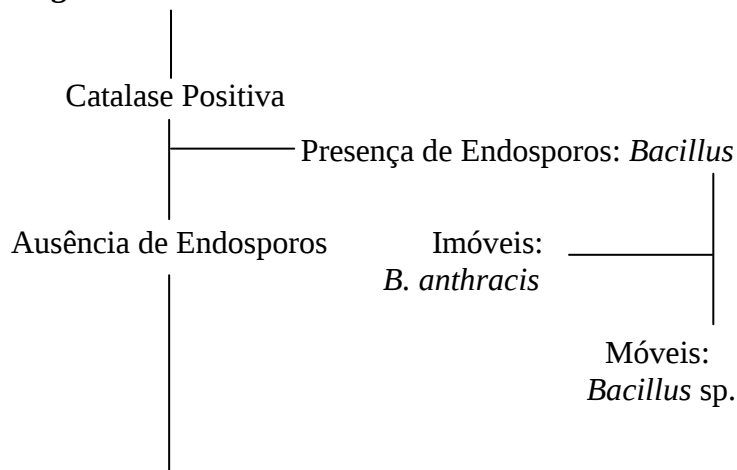
Estudos desenvolvidos recentemente demonstram a utilização da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) para detecção da *C. pseudotuberculosis* diretamente do material infectante, mostrando avanços no diagnóstico da LC. Em um estudo conduzido por Pacheco (2006), foi desenvolvido um ensaio de PCR-multiplex (mPCR) que amplifica, simultaneamente, três genes específicos da *C. pseudotuberculosis*: *16S rRNA*, *rpoB* e *pld*. Esse novo método permitiu a identificação de 40 isolados de campo de *C. pseudotuberculosis*, confirmada através de testes bioquímicos. Çetinkaya et al. (2002) propuseram um teste baseado na PCR para identificar isolados de *C. pseudotuberculosis* através da amplificação parcial da sequência do gene *16S rRNA*. Segundo Pacheco (2006), este teste apresenta algumas limitações, incluindo a inabilidade de distinguir da bactéria *Corynebacterium ulcerans* e a dependência de cultivo bacteriano prévio.

Ribeiro et al. (2001) citam a punção aspirativa com agulha fina como um método alternativo para diagnóstico citológico presuntivo do agente, antes da abscedação dos linfonodos acometidos, permitindo a adoção de medidas profiláticas e terapêuticas adequadas.

Em relação aos animais acometidos que não apresentam sintomatologia clínica, deve-se lançar mão dos testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o agente causador da infecção. Existe uma variedade de testes sorológicos estudados e validados, porém, apresentando diferentes graus de sensibilidade e especificidade, sendo eles: aglutinação indireta, hemo-aglutinação, teste de inibição da anti-hemolisina, testes de

neutralização em pele de coelho, teste de imunodifusão, teste de inibição de hemólise sinérgica (IHS), o “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) e o Dot-Blot (ALVES et al., 1997).

Microrganismos Gram Positivos



<i>Corynebacterium</i>											
	<i>Actinomyces</i> sp.	sp.	<i>Rodococcus equi</i>	<i>pseudodiphtheriticum</i>	<i>bovis</i>	<i>diphtheriae</i>	<i>renale</i>	<i>kutscheri</i>	<i>pseudotuberculosis</i>	<i>ulcerans</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Urease	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Glicose	d+	d-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Redução do Nitrato			+	+	-	+	d	-	d	-	-
Sacarose							-	+	d	-	d
Hemólise									+	+	+
Hidrólise do Amido									-	+	-
Motilidade											+
CAMP											+
											(25°C)

Figura 8. Identificação da *Corynebacterium pseudotuberculosis* através de provas bioquímicas (+/-: reação positiva/negativa em 90% dos casos ou mais, em 1 ou 2 dias; d+/-: diferentes tipos de reação, com predominância de reação positiva/negativa; d: diferentes tipos de reação, com menos de 90% dos casos com reação positiva ou negativa).

Fonte: Carter et al. (1986)

A sensibilidade de um teste é definida pela proporção de animais doentes que têm o resultado do teste positivo, ou seja, pela capacidade do teste de detectar os animais doentes de um rebanho. Já a especificidade de um teste é definida como a proporção de animais sadios que têm o resultado do teste negativo, ou seja, pela capacidade do teste em detectar os animais não doentes de um rebanho.

O teste de IHS foi, inicialmente, desenvolvido para o diagnóstico da *C. pseudotuberculosis* em eqüinos. Baseia-se na neutralização da fosfolipase D por anticorpos produzidos contra essa toxina, presentes no soro de caprinos e ovinos infectados pela *C. pseudotuberculosis*. A reação dos anticorpos com a exotoxina impede a ocorrência da hemólise sinérgica comumente observada entre as toxinas de *Rhodococcus equi* (fosfolipase C) e de *C. pseudotuberculosis*, em ágar sangue (KNIGHT, 1978). Este teste mostrou-se sensível, embora com pouca especificidade, uma vez que pode indicar resultados positivos em animais infectados por outros agentes etiológicos, como *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacterium pyogenes* e outros bacilos Gram positivos (BROWN et al., 1986; BROWN et al., 1987).

Dercksen et al. (2000) desenvolveram um teste ELISA sanduíche baseado no descrito por Ter Laak et al. (1992) para a detecção da *C. pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos, com o objetivo de obter uma melhora na sensibilidade. Constatou-se uma sensibilidade equivalente a 72% e uma especificidade de 99% em caprinos, e de 51% e 97%, respectivamente, em ovinos.

Kaba et al. (2001), utilizando como referência a técnica de WB, padronizaram um ELISA, obtendo uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 96%.

Em estudo recente, Binns et al. (2007) desenvolveram e validaram um teste ELISA com especificidade de 100% e sensibilidade de 83% na detecção de IgG contra *C. pseudotuberculosis*. Além deste, um teste ELISA para detecção de IFN-gama, como marcador de imunidade celular mediada contra a *C. pseudotuberculosis* foi desenvolvido por Prescott et al. (2002) e demonstrou não ter seus resultados influenciados pela vacinação. Vaiseh (1990) desenvolveu um teste de diagnóstico sorológico (Dot-Blot) utilizando a toxina da *C. pseudotuberculosis* com sensibilidade de 94% e especificidade de 99%.

Prodhan et al. (1993) realizaram um experimento para comparar o teste de IHS com o Dot-Blot. Das 145 amostras testadas, 36 foram detectadas como positivas a partir do IHS, diferentemente do Dot-Blot, que detectou apenas 27 amostras como positivas. As nove amostras que apresentaram resultado positivo apenas para o IHS foram

consideradas falso-positivas, devido à reação cruzada com alguma outra bactéria Gram positiva. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que o teste Dot-Blot é mais confiável para detecção da *C. pseudotuberculosis*, quando comparado com o teste IHS.

Um estudo desenvolvido por Carminati (2005) avaliou a sensibilidade e a especificidade de quatro ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando, como padrão ouro, o isolamento microbiológico confirmado por PCR. Foram utilizados dois antígenos, sendo o primeiro o sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* em meio BHI e o outro obtido a partir do fracionamento em três fases (TPP) do sobrenadante de cultura de *C. pseudotuberculosis*, em mesmo meio. Tanto a sensibilidade quanto a especificidade do ELISA indireto BHI foram de 98%, enquanto para o ELISA indireto TPP foi de 100%. Para o ELISA sanduíche BHI, a sensibilidade e especificidade foram de 86% e 84%, respectivamente, e para o ELISA sanduíche TPP de 74% e 72%, respectivamente.

Alguns autores questionam a utilização isolada de métodos sorológicos para o diagnóstico da LC e defendem o seu uso, principalmente, para estudos epidemiológicos (STING et al., 1998). Segundo eles, a utilização de métodos sorológicos na tentativa de erradicar a LC é bastante controversa. Entretanto, pesquisadores como Ter Laak et al. (1992) e Dercksen et al. (2000) preconizam a utilização destes testes em programas de erradicação para a eliminação dos animais com sorologia positiva do rebanho. Os mesmos autores defendem o uso da técnica de WB para confirmação dos casos suspeitos (TER LAAK et al., 1992) ou a repetição do teste de ELISA após quatro semanas (DERCKSEN et al., 2000).

Além dos testes sorológicos citados, existe um teste de pele que detecta a resposta mediada por células, através de uma reação dérmica que também pode ser utilizado para o diagnóstico da LC (BROWN et al., 1986). Um alérgeno conhecido como “linfadenina”, constituído por proteína hidrossolúvel extraída a partir de células lavadas da *C. pseudotuberculosis*, foi utilizado por Langenegger et al. (1987). Utilizando o alérgeno em grupos de caprinos portadores e em grupos de caprinos saudáveis, diferenças foram encontradas entre as respostas dos animais doentes e saudáveis, mostrando assim, resultados promissores em relação ao teste. Alves e Olander (1999) utilizaram células fragmentadas, formolizadas da *C. pseudotuberculosis*, como teste de pele. As células foram inoculadas em um grupo de caprinos vacinados com toxóide a 3% e em outro grupo de caprinos vacinados com uma bacterina, e então desafiados com

C. pseudotuberculosis. Não foi observada reação antes da infecção. Entretanto, após o desafio, todos os animais apresentaram reação ao teste. Esses resultados sugerem que o teste de pele é capaz de estimular a resposta imunocelular em animais previamente expostos a *C. pseudotuberculosis* sendo, portanto, útil no diagnóstico de casos subclínicos da LC. Entretanto, os mesmos autores afirmam que para elevar a confiabilidade do teste é necessária a purificação do antígeno utilizado.

TRATAMENTO

A *C. pseudotuberculosis* é sensível, *in vitro*, a vários antibióticos, entre eles penicilina, ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina e tetraciclina (CAMPBELL et al., 1982). Contudo, sua utilização para o tratamento *in vivo* da infecção pela *C. pseudotuberculosis* não é eficaz por diversas razões, sendo uma delas, o baixo nível do antibiótico no interior do abscesso, devido à cápsula fibrosa e a presença de pus. Além disso, a localização intracelular do microrganismo nas células fagocíticas impede seu contato com quantidades substanciais de antibiótico (ASHFAQ e CAMPBELL, 1979; WILIAMSON, 2001).

O tratamento convencional da doença consiste na drenagem e cauterização química dos abscessos, utilizando-se solução de iodo a 10%. Cuidados especiais devem ser tomados para evitar a contaminação ambiental prevenindo a disseminação do agente (ALVES et al., 1997) e para evitar a transmissão ao homem uma vez que existem relatos na literatura de infecção humana causada pela *C. pseudotuberculosis*.

Bulgin (1998) descreveu a utilização de solução de formalina a 10% como técnica alternativa para o tratamento da LC. Porém, o uso de “autovacinas” em animais destinados ao consumo humano é controverso devido ao risco da formalina ser introduzida na cadeia alimentar.

Um recente estudo descreveu a utilização de uma combinação de antibióticos (rifamicina e oxitetraciclina) para o tratamento de ovinos acometidos pela LC (SENTURK e TEMIZEL, 2006). Foi relatada a resolução da infecção devido à redução das dimensões das lesões superficiais dos animais. Entretanto, ao final do experimento não foi realizada necropsia dos animais experimentais para avaliar a existência de lesões nos linfonodos após o tratamento assim como não foi informado no estudo por quanto tempo os animais permaneceram sem a apresentação clínica da enfermidade (BAIRD e FONTAINE, 2007). Portanto, novos estudos necessitam ser realizados para que o tratamento de lesões causadas pela LC seja recomendado ao invés do descarte de animais infectados (BAIRD, 2006).

CONTROLE E PROFILAXIA

O principal aspecto relacionado ao controle da LC está no isolamento imediato dos animais afetados e na remoção do material infectivo antes do rompimento do abscesso e da contaminação ambiental. Deve-se dar uma importância especial aos cuidados utilizados na drenagem cirúrgica dos abscessos e adequada eliminação do material, prevenindo a contaminação ambiental. Os animais tratados só devem retornar ao rebanho depois da completa cicatrização da lesão. No caso de animais com abscessos reincidentes, sugere-se que sejam eliminados do plantel (ALVES et al., 1997).

Pelo fato do microrganismo infectante ser capaz de sobreviver e persistir no meio ambiente por um longo período de tempo, sendo uma constante fonte de infecção para os animais (WILLIAMS, 1980), a conscientização em relação às práticas de manejo adotadas para evitar sua disseminação é fundamental para o controle eficaz desta enfermidade. Essas práticas incluem a desinfecção dos instrumentos utilizados no manejo dos animais como, por exemplo, na caudectomia e na reutilização dos brincos de orelha e tesouras de tosquia. Devem ser feitas limpeza e higienização das instalações, assim como dos bebedouros e comedouros. Em relação à tosquia, os grupos mais jovens devem ser tosquiados em primeiro lugar e qualquer ovino com lesões palpáveis deve ser tosquiado posteriormente. A secreção purulenta presente nas instalações deve ser removida e a área desinfetada. O contato íntimo dos animais após a tosquia deve ser evitado. O banho após a tosquia não é recomendado em rebanhos gravemente acometidos. É digna de consideração a adição de agente bactericida eficiente no líquido do banho (RADOSTITS et al., 2002). A aplicação de penicilina no momento da tosquia, associada à desinfecção das lesões e dos instrumentos utilizados parece reduzir substancialmente a ocorrência da enfermidade (AL-GAABARY et al., 2009). O estábulo não deve conter objetos que possam provocar lesões cutâneas nos animais, assim como deve ser realizado um controle de parasitos externos, com o intuito de controlar o prurido. Deve ser realizada esterilização do material cirúrgico e utilizadas agulhas e seringas descartáveis.

Entretanto, devido à fácil disseminação deste microrganismo no meio ambiente e contaminação dos animais, a prevenção quanto à introdução de animais infectados no rebanho é o melhor método de controle da enfermidade. Recomenda-se que a aquisição de animais seja feita somente a partir de rebanhos livres de LC, sendo estes mantidos

longe dos animais infectados. Segundo Batey (1986), pelo fato desta enfermidade apresentar um longo período de incubação, a separação de animais infectados dos animais não infectados se torna bastante difícil pela própria condição da doença que, em determinados momentos, apresenta-se com abscessos visíveis e em outros, com abscessos internos ou sem sinais. A introdução de um animal infectado em um rebanho leva ao aparecimento de abscessos nos animais em um período de dois a três anos (AYERS, 1977; ALVES e OLANDER, 1998).

Muitos estudos vêm sendo realizados para obtenção de vacinas que induzam nível de proteção aos animais, contra a LC. Estas vacinas podem ser constituídas por células bacterianas mortas (bacterinas), células bacterianas vivas, pela toxina inativada (toxóide) da *C. pseudotuberculosis* ou pela associação destes componentes, utilizando ou não algum tipo de adjuvante. Além dessas, recentemente vêm sendo desenvolvidas vacinas a partir de modificações no material genético do microrganismo, com intuito de obter avanços quanto à proteção imune, por elas oferecida. Para realizar uma devida avaliação das vacinas, a eficácia, a potência, a segurança, a viabilidade e outros aspectos devem ser levados em consideração para uma boa análise.

Eggleton et al. (1991) realizaram um experimento comparando a eficácia de vacinas preparadas a partir de toxóides com a presença e ausência de células bacterianas da *C. pseudotuberculosis* mortas pela formalina. A partir dos resultados obtidos, concluíram que o potencial de proteção vacinal não foi alterado devido a inclusão de células bacterianas mortas.

Paton et al. (1991) verificaram a eficácia de uma vacina que continha uma associação de bacterina e toxóide da *C. pseudotuberculosis* e ainda, toxóide de *Clostridium perfringens* tipo D e de *Clostridium tetani* ("Caseous D-T"). Foi observada uma média de $1,2 \pm 2$ no número de abscessos externos no grupo de animais vacinados, contra uma média de $26,8 \pm 23,8$ no grupo de animais controle. Em relação aos abscessos internos, foi obtida uma média de $0,1 \pm 0,3$ no grupo de animais vacinados, contra uma média de $6,8 \pm 5,9$ no grupo de animais controle. Os autores afirmam que a eficácia de uma vacina contendo tanto a bacterina quanto o toxóide da *C. pseudotuberculosis* tende a ser maior do que vacinas que contenham apenas células bacterianas mortas. A partir dos resultados deste experimento, supõe-se ainda que os anticorpos produzidos contra as células bacterianas mortas ajudam a eliminar a *C. pseudotuberculosis* do local inicial da infecção e que anticorpos produzidos contra a

exotoxina inativada ajudam a prevenir a disseminação da infecção a partir de seu sítio original.

Um estudo realizado por Stanford et al. (1998) avaliou a eficácia de duas vacinas comerciais (“Glanvac-6” e “Case-Vac”) e uma experimental contendo células bacterianas inativadas associadas a um adjuvante sintético (MDP) contra LC, em Alberta, no Canadá. A vacina “Case-Vac” e a vacina experimental induziram títulos significativos de anticorpos contra a *C. pseudotuberculosis*, em cordeiros, por um período de 12 meses após a vacinação, sendo que os títulos produzidos pela vacina experimental se mantiveram mais elevados do que os produzidos pela “Case-Vac”, neste período. Os títulos de anticorpos produzidos pela “Glanvac-6” em cordeiros não diferiram do grupo controle. O número de reações locais foi mais elevado em cordeiros vacinados pela “Glanvac-6”, em comparação aos cordeiros imunizados pela vacina experimental, sem haver diferença significativa entre as duas vacinas em relação ao tamanho da reação.

Através de um estudo realizado por Alves e Olander (1998), a eficácia de uma vacina de toxóide a 3% foi avaliada contra LC em caprinos. Dos 15 animais da raça Alpina com 10 semanas de idade, 10 foram vacinados, pela via subcutânea. Duas aplicações foram realizadas, com um intervalo de 14 dias. Os animais eram avaliados diariamente quanto à apresentação de aumento dos linfonodos e, semanalmente, amostras de sangue eram coletadas para avaliação sorológica. Lesões no local de inoculação foram observadas em quatro dos cinco animais do grupo controle, e em sete dos 10 animais vacinados, demonstrando baixa proteção vacinal. Entretanto, as lesões não se disseminaram para outras partes do corpo no caso dos animais vacinados, ao contrário do que ocorreu com os animais do grupo controle.

Paton et al. (1995) em uma análise da eficácia de um composto de toxóide vacinal contra LC, relatou uma redução no número, no tamanho dos abscessos pulmonares e na disseminação da enfermidade no rebanho. Em estudo realizado posteriormente, Paton et al. (2003) avaliaram a eficácia da vacinação contra LC, em rebanhos ovinos de Nova Gales do Sul, Vitória e Austrália Ocidental. Foi observado que, somente 10% a 15% dos produtores estavam obtendo sucesso no controle da LC a partir dos programas de vacinação recomendados. Além disso, os autores afirmaram que, embora 43% dos criadores utilizassem vacina contra LC, apenas 12% deles utilizavam-na corretamente. Com isso, concluíram que ajustes nos programas de vacinação iriam reduzir drasticamente os índices de prevalência da LC nos rebanhos.

Recentemente, Fontaine et al. (2006) avaliaram a eficácia de vacinas contendo um derivado recombinante da fosfolipase D, células bacterianas mortas pela formalina e uma outra contendo a associação desses dois componentes. Foi observado que as vacinas que continham separadamente a fosfolipase D e células bacterianas mortas conferiram proteção significativa contra a infecção. Mais importante que isso, a vacina que continha a combinação dos dois componentes promoveu proteção absoluta contra a infecção. Neste mesmo experimento, foi avaliada a eficácia de uma vacina não licenciada disponível comercialmente na União Européia. Observou-se uma proteção significativa contra a infecção, embora a disseminação da infecção através do sítio de inoculação não tenha sido restrito, como nas outras vacinas testadas. Entretanto, nenhum animal imunizado por esta vacina apresentou abscessos pulmonares, eliminando, então, uma importante via de disseminação do microrganismo no rebanho.

Uma vacina viva atenuada contra LC (1002), produzida pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA foi licenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no ano de 2000, para sua produção e comercialização em todo o território nacional brasileiro. A vacina está disponível sob a forma líquida e deve ser administrada pela via subcutânea. Estudos preliminares realizados com o intuito de verificar a eficácia da vacina viva com a cepa 1002 da *C. pseudotuberculosis* demonstraram uma proteção de 83,3% contra a LC em caprinos (RIBEIRO et al., 1991). Entretanto, deve-se levar em consideração que o período pelo qual os animais são avaliados após o desafio, assim como a dose do inóculo para ele utilizada podem influenciar os resultados da pesquisa. Segundo Brogden et al. (1996), pelo fato de a LC ser uma enfermidade crônica, o sucesso da utilização da vacina não pode ser avaliado somente durante um ano, mas em extensos períodos de tempo de utilização. É importante ressaltar a necessidade de avaliação desta vacina em ambiente controlado, utilizando a mesma quantidade de bactérias no desafio, com acompanhamento dos animais por um período mais prolongado e que o mesmo experimento seja realizado em meio real, sem o desafio.

Existem duas vacinas comerciais contra LC licenciadas para sua utilização em ovinos, nos Estados Unidos da América. Uma delas é a “Case-Bac” que contém uma combinação de bacterina e toxóide de *C. pseudotuberculosis*. A outra vacina, a “Caseous D-T”, citada anteriormente no estudo de Paton et al. (1991), contém também toxóide de *C. tetani* e de *C. perfringens* tipo D. Berrier (2002) cita um procedimento a ser realizado, no caso de infecção pela *C. pseudotuberculosis* em caprinos, já que estas

duas vacinas não devem ser utilizadas nesta espécie animal. Segundo ele, inicialmente, deve ser feito o isolamento e identificação do agente, para confirmar se o agente causador dos abscessos no rebanho é a *C. pseudotuberculosis*. Posteriormente, o autor sugere a produção de vacinas autógenas para o controle da LC. A vacina autógena é preparada a partir de um microrganismo causador da doença em um animal ou rebanho e, posteriormente, utilizada nesse mesmo animal ou rebanho, para estimular a imunidade. Antes de utilizá-la em todos os animais do plantel, Berrier (2002) sugere que, inicialmente, a vacina seja testada em um número limitado de animais, para verificar a eficácia e a viabilidade de sua aplicação.

Brogden et al. (1990) conduziram um estudo para avaliação do efeito do dipeptídeo muramil (MDP) na resposta imune produzida por uma vacina contendo células bacterianas mortas (CBM) da *C. pseudotuberculosis*, em ratos e cordeiros. Em ratos, a proteção induzida pela vacina estava relacionada à concentração de CBM utilizada. Utilizando-se concentrações de 10 e 25 µg de CBM, a proteção vacinal desenvolvida foi baixa (54,7%), ao contrário da proteção desenvolvida com o uso de concentrações de 50, 100 e 150 µg (78,8%). Em altas concentrações de CBM, houve um pequeno aumento na proteção para 82,3%, quando associado com a utilização de altas concentrações de MDP (50 e 100 µg). Entretanto, um aumento significativo na proteção para 90%, foi observado com a utilização de baixas concentrações de MDP (5 e 10 µg). Em baixas concentrações de CBM, a utilização de altas concentrações de MDP ocasionou um decréscimo significativo para 32% na proteção. Porém, a utilização de baixas concentrações de CBM foi responsável por um aumento na proteção vacinal para 72,5%. A proteção induzida a partir de baixas concentrações de CBM e MDP foi, então, similar a altas concentrações de CBM sem a utilização de MDP. A proteção vacinal e a presença de abscessos nos locais de aplicação da vacina em cordeiros, também estavam relacionadas às concentrações de CBM e de MDP. Além disso, foi observado que em todos os cordeiros vacinados com 1 mg de CBM associado a 50 µg de MDP, não ocorreu o desenvolvimento de abscessos pulmonares ou nos locais da vacinação.

A partir dos estudos citados anteriormente, observa-se que uma série de vacinas produzidas a partir da inativação da fosfolipase D pela formalina vem sendo testada, ultimamente, já que este antígeno é considerado o principal fator de proteção contra a infecção pela *C. pseudotuberculosis*. Entretanto, a inativação genética da fosfolipase D (“Toxminus”) tem-se mostrado como uma alternativa para produção de novas vacinas contra a LC, apesar de ainda não existirem resultados concretos quanto a sua eficácia.

Um estudo realizado por Hodgson et al. (1999) testou a eficácia de uma vacina com a forma geneticamente inativada da fosfolipase D, em ovinos, com substituição da histidina-20 pela serina. Os resultados indicaram que a vacina alterada geneticamente conferiu uma proteção em somente 44% dos animais, contra uma proteção de 95% oferecida pela vacina com inativação da fosfolipase D pela formalina. Segundo os autores deste estudo, a razão para a variação observada entre as duas vacinas é desconhecida, já que não havia sido constatada diferença significativa em relação aos níveis de anticorpos produzidos pelos animais.

Moore et al. (1999) avaliaram a capacidade de atuação do “Toxminus” como vetor vacinal vivo, através da expressão de gens externos e indução de produção de anticorpos contra a *C. pseudotuberculosis*. Como resultados, os autores observaram que, em geral, os níveis de expressões gênicas foram baixos e, aparentemente, houve uma boa tolerância do “Toxminus” em relação às proteínas recombinantes produzidas. As expressões gênicas, entretanto, foram suficientemente altas para induzir níveis de anticorpos específicos contra as proteínas recombinantes, a partir da aplicação de uma dose única de “Toxminus”.

O gen *pld* que codifica a fosfolipase D e o gen *aro Q* da *C. pseudotuberculosis*, que codifica a enzima 3-desidroquinase tipo II também foram modificados com o intuito de induzir uma proteção vacinal em ovinos, em estudo de Simmons et al. (1998). Os autores observaram que mutantes *aro Q* foram incapazes de induzir a produção de IFN-gama em ovinos e foram responsáveis por uma baixa produção de anticorpos contra a *C. pseudotuberculosis* nesses animais. Entretanto, constatou-se uma redução na severidade da enfermidade após o desafio. Já os mutantes *pld*, induziram uma resposta imune relacionada à produção de IFN-gama pelos linfócitos e níveis relativamente altos de anticorpos.

Um estudo realizado por Chaplin et al. (1999) foi desenvolvido para avaliar a resposta imune humoral de ovinos a partir da utilização de vacinas de DNA contendo o domínio extracelular de bovino, CTLA-4 (linfócito T citotóxico associado à proteína 4). A função da utilização do CTLA-4 na produção de vacinas de DNA está relacionada à sua ligação ao antígeno de membrana B7 das células apresentadoras de antígeno (APCs), promovendo a fusão dos antígenos aos sítios de indução da resposta imune. Conforme os resultados obtidos neste trabalho, foi demonstrado um aumento significativo na velocidade, magnitude e longevidade da resposta humoral em comparação aos dados obtidos a partir da alteração genética do *pld*. Em conclusão, os

autores sugerem como uma nova estratégia para superar a fraca resposta imune que vem sendo associada às vacinas de DNA, a realização de alterações genéticas que promovam a ligação de antígenos às APCs, com conseqüente indução da resposta imune nos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL RAWASHDEH, O. F.; AL QUDAH, K. M. Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, p. 287–293, 2000.

AL-GAABARY, M. H; OSMAN, S. A; OREIBY, A. F. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Ruminant Research**, doi:10.1016/j.smallrumres.2009.10.008, 2009.

ALVES, F. S. F. **Immunokinetics of goats with *C. ovis* vaccination and infection**, 1988. 68 f. Tese (Mestrado em Patologia Comparada). University of California, Davis, 1988.

ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. J. Uso de uma vacina toxoide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 74-77, 1998.

ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. J. Teste de pele em caprinos vacinados e infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 1313-1318, 1999.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; COX, M.; ANDRIOLI, A.; AQUINO NETO, H. M.; SILVA, A. M. C. Epididimite-orquite causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 11-16, 2004.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; PIRES, P. C. **Linfadenite caseosa: patogenia, diagnóstico, controle**. Sobral: EMBRAPA-CNPQ, 1997. 16 p. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 27).

ANDERSON, M.; NAIRN, M. E. Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. **Colloques de LINRA**, v. 28, p. 605-609, 1984.

ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALARNEAU, J. R.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BELANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, n. 1, p. 67-81, 2003.

ASHFAQ, M. K.; CAMPBELL, S. G. A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. **Veterinary Medicine, Small Animal Clinician**, v. 74, p. 1161-1165, 1979.

ASHFAQ, M. K.; CAMPBELL, S. G. Experimentally induced caseous lymphadenitis in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n.11, p. 1789-1792, 1980.

AUGUSTINE, J. L; RENSCHAW, H. W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 713-715, 1986.

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

AYERS, J. L. **Caseous lymphadenitis**. In: Current Veterinary Therapy; Food Animal Practice, 2nd, J. L. HOWARD, ED., W.B (Edit.). Philadelphia: Saunders Company, 1986, p. 605-606.

BAIRD, G. J. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. **Veterinary Record**, v. 159, p. 500, 2006.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **The Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 179-210, 2007.

BARKSDALE, L. "The genus *Corynebacterium* in the Prokaryotes", v. 2. In: STARR, M. P.; STOLP, H.; TRUPER, H. G.; BALOWS, A.; SCHELEGEL, H. G. (Edits.) New York: Springer-Verlag, 1981.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 9, p. 269-272, 1986.

BATEY, R. G.; SPEED, C. M.; KOBES, C. J. Prevalence and distribution of lymphadenitis in feral goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 2, p. 33-36, 1986.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in disease of animals. **Commonwealth Bureau of Animal Health**, v. 32, p. 645-657, 1962.

BERNHEIMER, A. W.; CAMPBELL, B. J.; FORRESTER, L. J. Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Science**, v. 228, p. 590-591, 1985.

BERRIER, R. J. CLA in goats. **Veterinarian's Corner**, v. 2, n. 10, 2002. Disponível em: < <http://www.colorado-serum.com/vets.html>>. Acesso em: 9 jul. 2007.

BIBERSTEIN, E. L.; KNIGHT H. D.; JANG S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Veterinary Record**, v. 89, n. 26, p. 691-692, 1971.

BINNS, S. H.; BAIRLEY, M.; GREEN, L. E. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. **Veterinary Record**, v. 150, n. 9, p. 263-268, 2002.

BINNS, S. H.; GREEN, L. E.; BAIRLEY, M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 1/3, p. 169-179, 2007.

BROGDEN, K. A.; CHEDID, L.; CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; SACKS, J. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cells vaccines in mice and lambs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 2, p. 200-202, 1990.

BROGDEN, K. A.; GLENN, J.S.; EAST, N.; AUDIBERT, F. A. *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin with muramyl dipeptide induces antibody titers, increases the time of onset, and decreases naturally occurring external abscesses in sheep and goat. **Small Ruminant Research**, v. 19, n. 2, p. 161-168, 1996.

BROWN, C. C. **Caseous Lymphadenitis of goats**. 1985. 83 f. (Doctor of Philosophy Thesis) - University of California, Davis, 1985.

BROWN, C. C.; OLANDER H. J.; BIBERSTEIN E. L.; MORSE S. M. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, n. 5, p. 1116-1119, 1986.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 57, n. 1, 1987.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES, F. S. F. Synergistic hemolysis inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. **Canadian of Journal Veterinary Research**, v. 51, n. 1, p. 46-49, 1987.

BRUERE, A. N.; WEST, D. M. Caseous lymphadenitis. In: *The Sheep: Health, Disease and Production*. Palmerston North: Massey University Press, 1990.

BULGIN, M. S. Central nervous disorders of sheep. In: SYMPOSIUM ON SMALL RUMINANTS FOR THE MIXED ANIMAL PRACTITIONER WESTERN VETERINARY CONFERENCE, Las Vegas. **Proceedings...**, 1998.

BURMESTER, G. R.; PEZZUTO, A. **Color atlas of immunology**. Stuttgart: Thieme, 2003. 322 p.

BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 3, p. 105-110, 1981.

BURRELL, D. H. Vaccination against caseous lymphadenitis in sheep. In: 55TH ANNUAL CONFERENCE AUSTRALIAN VETERINARY ASSOCIATION. **Proceedings...**, 1978. p. 79-81.

CAMERON, C. M.; ENGELBRECHT, M. M. Mechanism of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Buchanan, 1911) in mice using inactivating vaccine. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 73-82, 1971.

CAMERON, C. M.; SWART, C. F. A new liquid medium for the cultivation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, v. 36, n. 2, p. 185-188, 1965.

CAMPBELL, S. G.; ASHFAQ, M. K.; TASHJIAH, J. J. Caseous lymphadenitis in goats in the U.S.A. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., Tucson. **Proceedings...** Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p. 449-454.

CARMINATI, R. **Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de Linfadenite Caseosa em caprinos**. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

CARMO, F. B.; GUIMARÃES, A. S.; PAULETTI, R. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, R. R.; PORTELA, R. W. D.; AZEVEDO, V. A. C.; HEINEMANN, M. B. Soroprevalência da linfadenite caeosa em caprinos em propriedades no Estado do Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25. **Anais...**, 2009. p. 1.

CARNE, H. R. A bacteriology study of 134 strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, n. 49, n. 2, p. 313, 1939.

CARNE, H. R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 51, n. 2, p. 199-212, 1940.

CARTER, G. R.; CLAUS, W.; RIKIHISA, Y. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 261 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, n. 1, p 75-83, 2002.

CHAPLIN, P. J.; DE ROSE, R.; BOYLE, J. S.; McWATERS, P.; KELL, J.; TENNENT, J. M.; LEW, A. M.; SCHEERLINCK, J.P. Y. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6434-6438, 1999.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 843 p.

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

COSTA, L. F. M.; MOURA-COSTA, L. F.; PAULE, B. J. A.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAEER, R.; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C.; MATOS, D. P.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; MEYER, R. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2002. Disponível em: < <http://www.rbspa.ufba.br/viewarticle.php?id=66>>. Acesso em: 9 jun. 2007.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K. V.; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for

the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 167-175, 2000.

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, 2005.

EGGLETON, D. G.; MIDDLETON, H. D.; DOIDGE, C. V.; MINTY, D. W. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 10, p. 317-319, 1991.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; HOLLER, L. D.; MILLS, K.W.; PRATT, D. L. Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 10, p. 1609-1613, 1990.

ELLIS, T. M.; SUTHERLAND, S. S.; WILKINSON, F. C.; MERCY, A. R.; PATON, M. W. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 64, p. 261-263, 1987.

FAO - Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2008. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor> >. Acesso em: 13 jan. 2010.

FIGUEIREDO, E. A. P.; SHELTON, M.; PANT, K. P. **Goats skins**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., Tucson. **Proceedings...** Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p. 488-490.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **Vaccine**, v. 24, n. 33/34, p. 5986-5996, 2006.

GATES, N. L.; EVERSON, D. O.; HULET, C. V. Effects of thin ewe syndrome on reproductive efficiency. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 12, p. 1266-1267, 1977.

GUIMARÃES, A. S.; SEYFFERT, N.; BASTOS, B. L.; PORTELA, R. W. D.; MEYER, R.; CARMO, F. B.; CRUZ, J. C. M.; MCCULLOCH, J.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, doi:10.1016/j.smallrumres.2009.09.027, 2009.

HARD, G. C. Electron Microscopic Examination of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1480-1485, 1969.

HODGSON, A. L.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L. A.; McCOLL, M.; CAMERON, A. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Vaccine**, v. 17, p. 802-808, 1999.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal, 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=23&i=P>>. Acesso em: 11 jan. 2010.

IONEDA, T.; SILVA, C. L. Purification of 1-monoacylglycerols containing alphasubstituted-beta-hydroxylated fatty acids from lipids of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 25, n. 1, p. 85-91, 1979.

JOIN-LAMBERT, O. F.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J.; BLANCHE, S.; BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, p. 848-851, 2006.

JOLLY, R. D. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 13, n. 6, p. 141-147, 1965.

JOLLY, R. D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 29, p. 189-196, 1966.

KABA, J.; KUTSCHKE, L.; GERLACH, G. F. Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. **Veterinary Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 155-163, 2001.

KNIGHT, H. D. A serological method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **Cornell Veterinarian**, v. 68, n. 2, p. 220-237, 1978.

KRISHNA, L.; KULSHRESTHA, S. B.; PALIWAL, O. P. Epididymo-Orchitis in ram due to *Corynebacterium ovis*. **Indian Veterinary Journal**, v. 54, n. 2, p. 517-519, 1977.

LAN, D. T.; TANIGUCHI, S.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon on resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology and Immunology**, v. 42, n. 12, p. 863-870, 1998.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; COSTA, S. G. Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 27-32, 1987.

LIMA, M. C. L. F. **Prevalência da Linfadenite Caseosa dos Caprinos no Município de Casa Nova-Bahia**. 1980. 53 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1980.

LIU, D. T.; CHAN, W. M.; FAN, D. S.; LAN, D. S. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **British Journal of Ophthalmology**, v. 89, p. 245-246, 2005.

LOPEZ, J. F.; WONG, F. M.; QUESADA, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: first case of human infection. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 5, p. 562-567, 1966.

LOVELL, R.; ZAKI, M. M. Studies on growth products of *Corynebacterium ovis*. I. The exotoxin and its lethal action on white mice. **Research in Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 302-306, 1966.

McNAMARA, P. J.; BRADLEY, G. A.; SONGER, J. G. Targetted mutagenesis of the phospholipase D gen results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 12, p. 921-930, 1994.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A. **Bacteriología e Virología Veterinarias**. 3 ed. Zaragoza: Aciribia, 1975.

MEYER, R. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: aspectos da prevalência, do diagnóstico e da imunidade**. 2004. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

MEYER, R.; REGIS, L. F.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREITE, S. M. *In vitro* IFN-gamma production by goat blood cells, after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 15, n. 34, p. 249-254, 2005.

MILLS, A. E.; MITCHELL, R. D.; LIM, E. K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. **Pathology**, v. 29, n. 2, p. 231-233, 1997.

MOORE, R. J.; ROTHEL, L.; KRYWULT, J.; RADFORD, A. J.; LUND, K.; ADRIAN L. M. HODGSON, A. L. M. Foreign gene expression in *C. pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. **Vaccine**, v. 18, n. 5/6, p. 487-497, 1999.

MOURA-COSTA, M. D.; CAMARA, J. Q.; ROCHA, J. V. N. da; MARTINEZ, T. C. N. Linfadenite Caseosa dos caprinos no estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v. 12, n. 1, p. 1-7, 1973.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 2, p. 206-208, 1982.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 1149-1153, 1983.

MUCKLE, C. A.; MENZIES, P. I. **Caseous lymphadenitis in sheep and goats**. In: Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice, 3rd ed. HOWARD, J. (Edit.), Philadelphia: Saunders, 1993, p. 537-541.

MUCKLE, C. A.; MENZIES, P. I.; LI, Y.; HWANG, Y. T.; VAN WESENBEECK, M. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 30, p. 47-58, 1992.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep: role of skin lesions and dipping fluid. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 12, p. 537-342, 1974.

NOCARD, E., 1896. **Annales d'Institut Pasteur**, v. 10, p. 609.

NORTH, R. J. The concept of the activated macrophage. **The Journal of Immunology**, v. 121, p. 806-809, 1978.

ONON, E. O. Purification and partial characterization of the toxin of *Corynebacterium ovis*. **Biochemical Journal**, v. 177, n. 1, p. 181-186, 1979.

PACHECO, L. G. C. **Desenvolvimento de um ensaio de PCR-multiplex para identificação de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e rápida detecção dessa bactéria em amostras clínicas**. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

PATON, M. W. Applying the experience of CLA in the southern hemisphere. In: MOREDUN RESEARCH INSTITUTE/SCOTTISH AGRICULTURAL COLLEGE/WORKSHOP ON CASEOUS LYMPHADENITIS. **Proceedings...**, 2000. p. 3-15.

PATON, M. W.; MERCY, A. R.; SUTHERLAND, S. S.; ELLIS, T. M.; DUDA, S. R. The effect of antibody to caseous lymphadenitis in ewes on the efficacy of vaccination in lambs, **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 4, p. 143-146, 1991.

PATON, M. W.; MERCY, A. R.; SUTHERLAND, S. S.; ELLIS, T. M. The influence of shearing and age on the incidence of caseous lymphadenitis in Australian sheep flocks. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 84, p. 101-103, 1988.

PATON, M. W.; ROSE, I. R.; HART, R. A.; SUTHERLAND, S. S.; MERCY, A. R.; ELLIS, T. M.; DHALIWAL, J. A. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, n. 2, p. 47-49, 1994.

PATON, M. W.; SUTHERLAND, S. S.; ROSE, I. R.; HART, R. A.; ELLIS, T. M. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, n. 7, p. 266-269, 1995.

PATON, M. W.; WALKER, S. T.; ROSE, I. R.; WATT, G. T.; MERCY, A. R.; Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. ½, p. 91-95, 2003.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C. R.; VALE, V. L. C.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAEER, R.; GOES, A. M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma

production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 129-139, 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, n. 2, p. 185-191, 1997.

PÉPIN, M.; PATON, M.; HODGSON, A. L. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Current Topics in Veterinary Research**, v. 1, p. 63-82, 1994a.

PÉPIN, M.; PITTET, J. C.; OLIVIER, M.; GOHIN, I. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, n. 5, p. 666-670, 1994b.

PÉPIN, M.; SEOW, H. F.; CORNER, L.; ROTHEL, J. S.; HODGSON, A. L.; WOOD, P. R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Veterinary Research**, v. 28, p. 149-163, 1997.

PINHEIRO, R. R.; ALVES F. S. F.; ANDRIOLI, A. Diagnóstico precoce de doenças e sua importância na produção de caprinos e ovinos. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA, 6.; SEMANA DA CAPRINOOVINOCULTURA BRASILEIRA 3.; FEIRA DE PRODUÇÃO E SERVIÇOS AGROPECUÁRIOS, 6. Fortaleza. **Palestras técnicas**. Fortaleza: Federação da Agricultura do Estado do Ceará, 2002. p.7-21.

PRESCOTT, J. F.; MENZIES, P. I.; HWANG, Y. T. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 287-297, 2002.

PRODHAN, M. A. M.; OLANDER H. J.; GARDNER I. A. A comparison of dot-blot assay with the synergistic haemolytic inhibition test in goats naturally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Research Communications**, v. 17, n.3, p. 193-196, 1993.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publishing Company, 1994.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

REGIS, L. **Aspectos da resposta celular de caprinos a antígeno somático e antígeno secretado de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2001. 70 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

RIBEIRO, M. G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A.C.; BARBOSA, P. G.; 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, O. C.; SILVA, J. H. da; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; FERNANDES, G. B. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 461-465, 1991.

SENTURK, S.; TEMIZEL, M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Record**, v. 159, p. 216-217, 2006.

SERIKAWA, S.; ITO, S.; HATTA, T.; KUSAKARI, N.; SENNA, K.; SAWARA, S.; HIRAMUNE, T.; KIKUCHI, N.; YANAGAWA, R. Seroepidemiological evidence that shearing wounds are mainly responsible for *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, p. 691-692, 1993.

SIMMONS, C. P.; DUNSTAN, S. J.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; HODGSON, A. L. M.; STRUGNELL, R. A. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 474-479, 1998.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 156-160, 1997.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, n. 49, v. 2, p. 223-226, 1988.

SONGER, J. G.; LIBBY, S. J.; IANDOLO, J. J.; CUEVAS, W. A. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, n. 58, n. 1, p. 131-136, 1990.

STANFORD, K.; BROGDEN, K. A.; McCLELLAND, L. A.; KOZUB, G. C.; AUDIBERT, F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 38-43, 1998.

STING, R.; STENG, G.; SPENGLER, D. Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzymelinked immunosorbent assay. **Zentralbl Veterinarmed B**, Berlim, v. 45, n. 4, p. 209-216, 1998.

SUTHERLAND, S. S.; HART, R. A.; BULLER, N. B. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. **Veterinary Microbiology**, v. 49, p. 1-9, 1996.

TAKAHASHI, T.; MORI, Y.; KOBAYASHI, H.; OCHI, M.; KIKUSCHI, N.; HIRAMUNE, T. Phylogenetic positions and assignments of swine and ovine corynebacteria isolated based on the 16S rDNA sequence. **Microbiology and Immunology**, v. 41, p. 649-655, 1997.

TASHJIAN, J. J.; CAMPBELL, S. G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 4, p. 690-693, 1983.

TER LAAK, E. A.; BOSCH, J.; BIJL, G. C.; SCHREUDER, B. E. C. Doubleantibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 7, p. 1125-1132, 1992.

UNANIAN, M. M.; FELICIANO SILVA, A. E. D.; PANT, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid North-east Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 17, n. 1, p. 57-62, 1985.

VAISEH, F. P. **Development of a dot-blot assay for sero-diagnosis of caseous lymphadenitis, using a purified exotoxin as antigen**. 1990. 65 f. Tese (Doctor of Philosophy). University of California, Davis.

VALE, V. L. C. **Reconhecimento de antígenos por caprinos naturalmente infectados e imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2000. 52 f.

Tese (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

WALKER, H.; JACKSON, H.; BRANDON, M. R.; MEEUSEN, E. Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 86, n. 1, p. 13-18, 1991.

WILLIAMS, C. S. F. Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 75, n. 7, p. 1165-1169, 1980.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 17, n. 1, p. 359-371, 2001.

YOSWIAK, M. L.; SONGER, J. G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 3392-3397, 1993.

ZAKI, M. M. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. **Research in Veterinary Science**, v. 9, n. 6, p. 489-493, 1968.

ZAKI, M. M. Relation between the toxigenicity and pyogenicity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infected mice. **Research in Veterinary Science**, v. 20, n. 2, p. 197-200, 1976.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SENSIBILIDADE DA *CORYNEBACTERIUM* *PSEUDOTUBERCULOSIS* FRENTE A DIFERENTES TIPOS DE ANTISSÉPTICOS E DESINFETANTES

RESUMO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma enfermidade crônica e debilitante causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caracterizada pela formação de piogranulomas nos gânglios linfáticos superficiais, internos e outros órgãos. O tratamento atualmente recomendado oferece grandes riscos de contaminação ambiental e baseia-se na drenagem e cauterização química dos linfonodos acometidos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de antissépticos e desinfetantes contra a *C. pseudotuberculosis* e descrever a curva de crescimento deste microrganismo em caldo de Infusão de Cérebro e Coração adicionado de 0,1% de Tween 80® (BHI+T), ao longo de 48 horas de incubação a 37°C. Foram avaliados tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5%, permanganato de potássio a 5%, sabonete líquido antisséptico Aseptol® e álcool etílico absoluto (99,8%), através da metodologia da disco-difusão. Um swab estéril foi imerso na suspensão bacteriana produzida e semeado em placa de ágar Mueller-Hinton. Discos estéreis foram embebidos em cada solução a ser testada e distribuídos na superfície do ágar. Os resultados foram obtidos de acordo com o diâmetro do halo produzido ao redor dos discos. Foram realizadas quatro repetições e suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para obtenção da curva de crescimento, colônias isoladas do microrganismo foram inoculadas em frasco contendo BHI+T. A cada quatro horas, 2 mL eram retirados para medição da massa celular em espectrofotômetro e 1 mL para realização das diluições seriadas, plaqueamento em ágar sangue e contagem de células viáveis. Observou-se que, para a obtenção de uma concentração máxima de *C. pseudotuberculosis*, próxima a 1200×10^5 células viáveis/mL, deve-se manter o inóculo sob incubação de 37°C por um período de 28 a 40 horas. Quanto à prova de sensibilidade, verificou-se que a tintura de iodo a 10%, seguida pelo hipoclorito de sódio a 2,5% e permanganato de potássio a 5%, foram os produtos com maior poder bactericida *in vitro* contra a *C. pseudotuberculosis*.

Palavras-chave: antibiograma, controle, curva de crescimento, Linfadenite Caseosa

ABSTRACT

Caseous Lymphadenitis (LC) is a chronic and debilitating disease caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, characterized by the abscessation of superficial and internal lymph nodes and other organs. The current and recommended treatment represents high risks of environmental contamination and it is based on the drainage and chemical cauterization of affected lymph nodes. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of antiseptics and disinfectants against *C. pseudotuberculosis*, and to define the growth curve of this same microorganism inoculated in Brain Heart Infusion Broth plus 0,1% of Tween 80® (BHI+T), for 48 hours of incubation. For sensibility test, it were evaluated 10% iodine, 2,5% sodium hypochlorite, 5% potassium permanganate, liquid soap Aseptol®, absolute alcohol ethylic (99,8%), beyond diffusion-disc methodology. An sterile swab was immersed in a bacterial suspension and plated in Mueller-Hinton agar. Sterile discs were immersed in each solution to be tested and distributed in agar surface. The results were obtained in accordance with the inhibition circle diameter formed around the disc. It were performed four repetitions end means compared by Tukey's test (5%). For the growth curve description, colonies were inoculated in a bottle containing BHI+T. Every four hours, 2 mL were withdrawn to evaluate the cell mass at a spectrophotometer and 1 mL to accomplish serial dilutions, blood agar base plating and counting of viable cells. It was observed that to reach the maximum concentration of *C. pseudotuberculosis*, near to 1200×10^5 viable cells/mL, the inoculum must be maintained at 37°C incubation for a 28-40 hours period. The sensibility test indicated that 10% iodine, followed by 2,5% sodium hypochlorite and 5% potassium permanganate were the products with the major bactericidal *in vitro* effect against *C. pseudotuberculosis*.

Keywords: antibiogram, Caseous Lymphadenitis, control, growth curve

INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa de ocorrência mundial, que acomete caprinos e ovinos, caracterizada pela formação de abscessos em gânglios linfáticos superficiais, podendo também acometer órgãos e linfonodos internos. Apresenta alta incidência em rebanhos caprinos da região Nordeste, a qual detém o maior contingente de animais (PINHEIRO et al., 2000). É uma enfermidade crônica e debilitante causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsável por causar grandes perdas econômicas na caprinocultura e ovinocultura (ALVES et al., 2007). A *C. pseudotuberculosis* caracteriza-se como um bacilo Gram positivo curto e irregular, que pode também apresentar aspecto cocoide, mostrando-se isolado ou formando grupamentos irregulares ou em paliçada. São imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos e não formam esporos (BATEY, 1986).

As perdas econômicas causadas pela LC em rebanhos caprinos e ovinos ocorrem através da diminuição da produção de carne, leite e lã, da condenação de peles e carcaças, da queda na eficiência reprodutiva e do aumento de gastos com medicamentos e mão-de-obra para o tratamento dos abscessos. A forma visceral da doença é a mais grave e preocupante, visto que o diagnóstico clínico é muito difícil e pode levar à debilitação do animal, disseminação de abscessos no organismo e, até mesmo, morte de indivíduos. As peles de caprinos e ovinos apresentam-se como um produto de alto valor no mercado nacional e internacional. Ressalta-se, portanto, a necessidade do controle da LC já que esta enfermidade atua como uma das principais causas de danos a estes produtos devido à presença dos abscessos (FIGUEIREDO et al., 1982; ALVES, 1988).

A ocorrência de ferimentos na pele dos animais é considerada a principal porta de entrada para a *C. pseudotuberculosis*, presente no meio ambiente devido à ruptura de abscessos de animais infectados pela doença (NAIRN e ROBERTSON, 1974).

O principal aspecto relacionado ao controle desta enfermidade, portanto, está no isolamento imediato dos animais acometidos e na drenagem cirúrgica do abscesso, antes do seu rompimento natural, já que o microrganismo é capaz de sobreviver e persistir no meio ambiente por um longo período de tempo, constituindo-se numa constante fonte de infecção para os animais (WILLIAMS, 1980).

O tratamento atualmente preconizado para a doença consiste na drenagem e cauterização química dos abscessos, utilizando-se solução de iodo a 10%, quando estes

encontram-se em estágio avançado de evolução. Dado este fato, tal procedimento representa grandes riscos de contaminação ambiental, seja através da ruptura espontânea inesperada do abscesso ou pela simples exposição ao meio externo de um material altamente contaminado. A aplicação de solução de formol a 10% diretamente no linfonodo já foi avaliada e constatou-se a morte da *C. pseudotuberculosis* no local, apesar do microrganismo permanecer viável em outros linfonodos e vísceras do animal. Entretanto, diversos problemas e transtornos têm sido observados com relação à utilização deste produto no abscesso, como o aparecimento de fibrose, evolução da necrose, destruição dos tecidos epitelial e muscular adjacentes e provável comprometimento do osso mais próximo (ALVES e PINHEIRO, 2003). Além disso, sabe-se que o formol apresenta efeitos teratogênico, mutagênico e carcinogênico em animais de laboratório, sendo também responsável por causar anomalias congênitas e outras reações adversas (PRODUTOS..., 2003).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de antissépticos e desinfetantes contra a *C. pseudotuberculosis* para, em estudos futuros, serem avaliados *in vivo*, através da aplicação no interior do linfonodo de animais acometidos pela LC. Entretanto, a determinação *in vitro* da eficácia bactericida de tais produtos exige o conhecimento de algumas informações relacionadas à *C. pseudotuberculosis*, que não encontram-se disponíveis na literatura, como por exemplo, o número de células bacterianas viáveis existentes no meio de cultura, após um determinado período de crescimento. Com isso, objetivou-se também descrever a curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis*.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS BACTERIANAS

A curva de crescimento bacteriano foi determinada a partir de uma cepa regional de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e o perfil de sensibilidade *in vitro* da *C. pseudotuberculosis* foi avaliado utilizando-se quatro isolados de casos de LC de animais pertencentes ao rebanho experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos (CNPC).

Para confirmação das cepas bacterianas, o material drenado do abscesso de animais suspeitos para LC foi plaqueado em ágar base enriquecido com 7% de sangue ovino e a placa mantida em estufa a 37°C por 48 horas. As colônias isoladas foram caracterizadas macroscopicamente, coradas pelo método de Gram e submetidas às provas da catalase, urease e fermentação de carboidratos para identificação do agente etiológico. Todas as análises foram desenvolvidas nos Laboratórios de Bacteriologia e de Proteoma do CNPC, localizado na cidade de Sobral-CE.

DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DA *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

Para determinação da curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis*, a quantificação celular foi estimada através da avaliação da densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm, e posterior contagem em placas (TORTORA et al., 2005). Cinco colônias isoladas do microrganismo foram transferidas da placa de ágar sangue para um frasco erlenmeyer contendo 75 mL de caldo BHI+T e incubado em estufa a 37°C. Quatro horas após a inoculação do meio, 2 mL foram retirados para medição da massa celular em espectrofotômetro e 1 mL para realização das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-9}) em solução salina (NaCl 0,95%), plaqueamento em ágar sangue e, após incubação a 37°C por 48 horas, contagem do número de células viáveis por mL. Esta etapa foi repetida sucessivamente, a cada quatro horas, ao longo das 48 horas de incubação do meio inoculado, a 37°C. Um frasco contendo BHI+T estéril foi utilizado

ao longo do experimento como controle para zerar o espectrofotômetro nos momentos de avaliação da densidade óptica. Para a montagem da curva do número de células viáveis por mL de meio de cultura, foram utilizados os valores das menores diluições que possibilitaram sua contagem. Ao final do experimento, foi realizada a confirmação microbiológica de pureza do microrganismo no meio de cultura.

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SENSIBILIDADE DA *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* FRENTE AOS ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES

Para a determinação do perfil de sensibilidade da *C. pseudotuberculosis* foi utilizada a metodologia do antibiograma de disco-difusão descrita por Bauer et al. (1966), seguindo as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS (2002). Foram utilizadas placas de petri de 150 mm de diâmetro preenchidas com 70 mL ágar Mueller-Hinton acrescido de 5% de sangue ovino. Cinco colônias de *C. pseudotuberculosis* foram transferidas de uma placa de ágar sangue para um tubo de ensaio contendo 2 mL de caldo BHI+T, o qual foi mantido sob incubação a 37°C, de forma a se obter um inóculo com uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. O período de incubação do inóculo foi determinado pelos resultados obtidos neste estudo, através da curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis*. Um swab estéril foi imerso na suspensão bacteriana produzida, com o cuidado de pressioná-lo contra as paredes do tubo para retirada do líquido em excesso e semeado, uniformemente, por estrias justapostas, nas placas de ágar Mueller-Hinton, em três direções e por toda a superfície do meio. O perfil de sensibilidade da *C. pseudotuberculosis* foi avaliado frente a cinco princípios ativos distintos de antissépticos e desinfetantes: tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5%, permanganato de potássio a 5%, sabonete líquido Aseptol®, e álcool etílico absoluto (99,8%). Para o preparo da solução de tintura de iodo a 10% foram utilizados 100 g de iodo ressublimado, 60 g de iodeto de potássio, 50 mL de água destilada e 950 mL de álcool absoluto. Quanto à solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, foi utilizado um produto comercial da marca Brilux®, à base de hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, água e teor de cloro ativo de 2,5% p/p. Discos estéreis de papel filtro, com 12,5 mm de diâmetro, foram embebidos em 75 µL de cada solução testada e da solução controle

(solução salina estéril, NaCl 0,95%) e mantidos em temperatura ambiente para secagem, durante um período de 10 minutos. Posteriormente, os discos foram distribuídos na superfície do ágar de maneira eqüidistante, com o auxílio de uma pinça estéril. Uma distância mínima de 24 mm foi mantida entre os centros dos discos na placa. Os resultados foram obtidos a partir da mensuração do diâmetro das zonas de inibição, onde se observava a ausência total de crescimento bacteriano. Após a realização das análises, foi realizada a confirmação microbiológica de pureza do microrganismo no ágar. Para a análise estatística foi considerado um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância (SAEG, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o crescimento bacteriano em meio de cultura líquido, as bactérias apresentam uma curva de crescimento padrão, quando este é expresso através do logaritmo do número de microrganismos ao longo do tempo. Segundo Koneman et al. (2001), esta curva é composta por quatro fases distintas de crescimento: fase de arranque, fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio. A partir do momento no qual um microrganismo é inoculado em um meio de cultura estéril, o crescimento não se inicia de imediato. Esta fase, conhecida como fase lag ou de arranque, ocorre pela necessidade das células de se adaptarem ao novo meio, até que possam dar início ao seu desenvolvimento (BROCK e BROCK, 1978). Já na fase logarítmica ou de crescimento exponencial, o número de células bacterianas aumenta em progressão geométrica na medida em que o tempo cresce em progressão aritmética. Na fase estacionária ou de equilíbrio, a contagem de microrganismos viáveis permanece constante em seu valor máximo, já que o número de bactérias neoformadas é compensado pelo daquelas que começam a morrer. Por último, segue a fase de declínio ou morte das bactérias (BIER, 1977; TORTORA et al., 2005).

Na Tabela 1 estão descritos os valores obtidos para densidade óptica e o número de células bacterianas viáveis existentes por mL de meio de cultura, ao longo de 48 horas de incubação. Na Figura 1, estão representadas as respectivas curvas de crescimento, com o número de células viáveis descrito em logaritmo na base 10.

A partir destes dados, observa-se que a *C. pseudotuberculosis* apresenta um crescimento relativamente lento em BHI+T, já que aproxima-se de sua fase equilíbrio, somente após 28 horas de crescimento. Depois de 40 horas de incubação, observa-se um grande declínio no número de células bacterianas viáveis. Assim, sugere-se que, para a obtenção de uma concentração máxima de *C. pseudotuberculosis* em meio BHI+T, próxima a 1200×10^5 células viáveis por mL, deve-se manter o inóculo sob incubação de 37°C por um período de 28 a 40 horas. A diminuição do número de células viáveis é justificada pelo esgotamento de nutrientes do meio de cultura e pelo aumento dos produtos tóxicos provenientes do próprio metabolismo bacteriano (ISCSS, 2009).

Além disso, nota-se que a avaliação da densidade óptica do meio de cultura pode ser considerada um método eficaz para estimar a quantidade de células viáveis de *C. pseudotuberculosis* em BHI+T, somente até 40 horas de crescimento, ou seja, até o final

da fase estacionária, já que a turbidimetria não é capaz de realizar a discriminação entre as células vivas e as células mortas no meio de cultura (Tabela 1 e Figura 1). A avaliação da densidade óptica é baseada no fato de as células microbianas dispersarem a luz, podendo assim, ser detectadas por medição da absorvância em um espectrofotômetro (ISCSS, 2009). Consiste em um método bastante simples e útil de se realizar a estimativa relativa da massa celular bacteriana. A turbidez do meio de cultura está diretamente relacionada ao número e ao peso das células bacterianas existentes naquela solução (BIER, 1977).

A partir da observação dos dados descritos na Figura 1 é possível obter, ao longo das primeiras 40 horas de crescimento da *C. pseudotuberculosis*, a correlação existente entre a turbidez do inóculo e o número de células microbianas viáveis existentes por mL de meio de cultura.

Tabela 1. Densidade óptica do meio de cultura e número de células viáveis por mL, de *Corynebacterium pseudotuberculosis* inoculada em BHI+T, ao longo de 48 horas de incubação a 37°C

Tempo (h)	Densidade Óptica*	Número de células viáveis (UFC/mL)
04	0,011	68 x 10 ⁵
08	0,046	82 x 10 ⁵
12	0,162	178 x 10 ⁵
16	0,459	306 x 10 ⁵
20	0,961	700 x 10 ⁵
24	1,366	900 x 10 ⁵
28	1,498	1050 x 10 ⁵
32	1,515	820 x 10 ⁵
36	1,519	1110 x 10 ⁵
40	1,537	1200 x 10 ⁵
44	1,508	140 x 10 ⁵
48	1,426	221 x 10 ⁵

*comprimento de onda de 600 nm

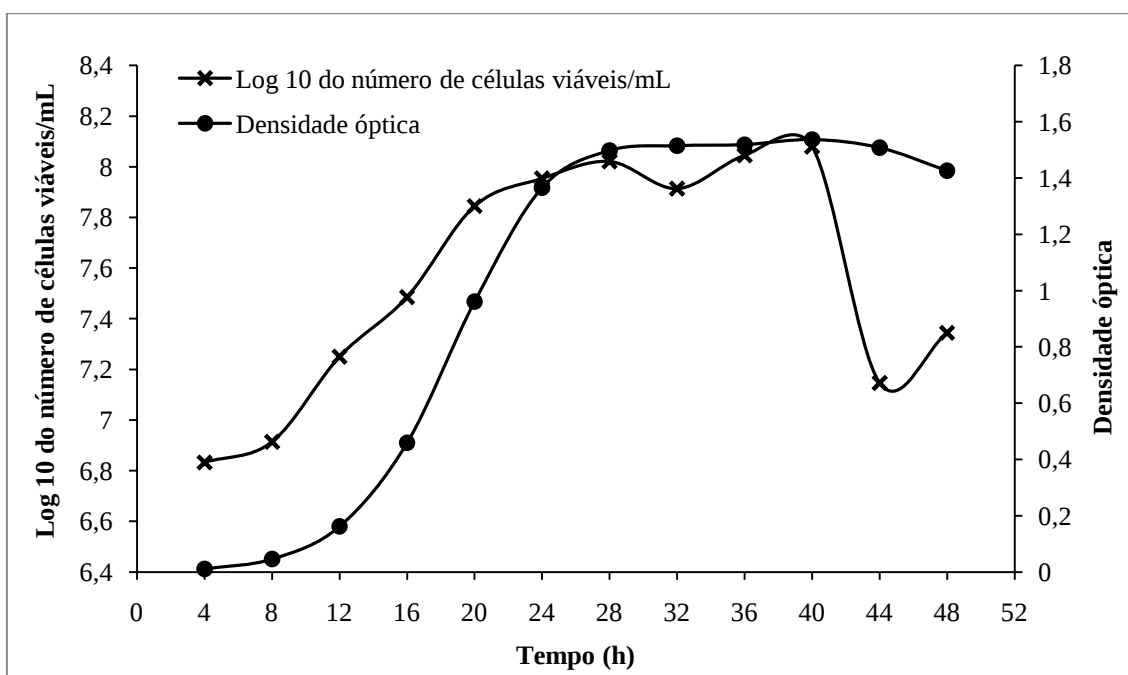


Figura 1. Curvas de crescimento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em meio BHI+T, em função dos valores obtidos para densidade óptica e do logaritmo na base 10 do número de células viáveis por mL, ao longo de 48 horas de incubação a 37°C.

Através da inserção de uma linha de tendência com regressão polinomial na curva do número de células bacterianas viáveis/mL, utilizando-se o Microsoft® Office Excel® 2007, parte do Microsoft Office Enterprise 2007 (MICROSOFT CORPORATION©, 2006), torna-se possível formular uma equação de terceiro grau ($R^2 = 0,809$) capaz de estimar a concentração do número de bactérias viáveis existentes em um determinado período de tempo, por mL de meio de cultura, sendo ela:

$$y = -0,081x^3 + 4,542x^2 - 32,34x + 95,84$$

A estimativa da concentração de células viáveis de *C. pseudotuberculosis*, a partir da análise das curvas de crescimento obtidas neste estudo, favorece o desenvolvimento de estudos relacionados à LC que exigem o conhecimento de tal informação, tornando sua execução mais prática e rápida.

Em conformidade com o NCCLS (2002), a realização de testes *in vitro* para a determinação do perfil de sensibilidade de microrganismos requer a utilização de uma cultura bacteriana com concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. De acordo com os resultados obtidos neste estudo relacionados à curva de crescimento da *C.*

pseudotuberculosis, a obtenção da concentração desejada foi alcançada a partir da incubação do inóculo a 37°C por um período entre 28 e 40 horas.

Existem vários estudos na literatura que descrevem a curva de crescimento de diversos microrganismos patogênicos, assim como avaliam os fatores externos que interferem no seu desenvolvimento (BUCHANAN et al., 1993; BUCHANAN e BAGI, 1994; BOVILL et al., 2000). Entretanto, não foram encontrados trabalhos que descrevessem, especificamente, a curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis*, para uma possível comparação dos resultados obtidos neste experimento.

As médias e desvios padrões dos diâmetros das zonas de inibição pela técnica de disco-difusão obtidos no teste *in vitro* estão dispostos na Tabela 2. Dentre os produtos analisados, observa-se que somente a tintura de iodo a 10%, o hipoclorito de sódio a 2,5% e o permanganato de potássio a 5% demonstraram atividade inibitória completa contra a *C. pseudotuberculosis*. O maior halo de inibição foi dado pela tintura de iodo a 10%, seguido pelo hipoclorito de sódio a 2,5% e, posteriormente, pelo permanganato de potássio a 5%. Um fato interessante observado foi a formação de um outro tipo de halo ao redor de alguns discos, onde não se observava a inibição completa de crescimento bacteriano mas sim, uma redução na quantidade de colônias de bactérias, quando comparada ao restante da placa. Este halo foi nomeado, neste estudo, como zona de redução de crescimento bacteriano e as médias de seus valores, obtidas para cada produto, também estão descritas na Tabela 2. Vale ressaltar que as colônias presentes no halo de redução também foram confirmadas como *C. pseudotuberculosis*. O permanganato de potássio a 5% foi o único produto que apresentou, além da zona de inibição completa, uma zona de redução de crescimento bacteriano. Em relação ao Aseptol® e ao álcool etílico absoluto não foi observada formação da zona de inibição completa e sim, apenas da redução de crescimento. Portanto, neste estudo, estes dois últimos produtos foram considerados como ineficazes no controle das cepas de *C. pseudotuberculosis* avaliadas. Vale ressaltar que os testes de sensibilidade *in vitro* realizados pelo método de disco-difusão sofrem interferência de alguns fatores incontroláveis que podem ser responsáveis por gerar resultados variáveis, como por exemplo, em decorrência de diferenças existentes entre os coeficientes de difusão dos produtos analisados (OSBALDISTON, 1973). Além disso, outros estudos devem ser realizados para avaliar a sensibilidade de outras cepas de *C. pseudotuberculosis* frente aos mesmos produtos.

Através da comparação estatística das médias de cada grupo avaliado, observou-se que existe diferença ($p < 0,05$) entre os três produtos que demonstraram exercer efeito bactericida sobre os isolados de *C. pseudotuberculosis* utilizados neste estudo. Sugere-se, portanto que a tintura de iodo a 10% seja o produto mais eficaz no controle deste microrganismo, seguido pelo hipoclorito de sódio a 2,5% e, posteriormente pelo permanganato de potássio a 5% (Tabela 2).

A determinação da tintura de iodo e do hipoclorito de sódio como produtos eficazes contra a *C. pseudotuberculosis*, encontra-se de acordo com os resultados obtidos por Pedrini e Margatho (2003). Entretanto, estes autores também avaliaram a atividade inibitória da clorexidina e do cloreto de benzalcônio, sendo que este último, em concentração de 1%, foi o produto que apresentou maior efeito bactericida contra a *Corynebacterium* sp. Vale ressaltar que no trabalho citado, não foi avaliada a tintura de iodo na concentração de 10% e sim, de 2%. Este fato explica a discrepância observada entre os halos de inibição produzidos pelo iodo nos dois estudos. Pedrini e Margatho (2003) descreveram um halo de 21 mm de diâmetro produzido pela tintura de iodo a 2%. O mesmo não foi observado com relação à solução de hipoclorito de sódio, já que os mesmos autores avaliaram o produto em uma concentração de 2%, semelhante à avaliada neste trabalho. Neste caso, foi relatado um halo de 18,5 mm de diâmetro.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrões da medida (mm) dos halos de inibição e de redução de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5%, permanganato de potássio a 5%, Aseptol®, álcool etílico absoluto (99,8%) e solução salina estéril

Produto	Zona de inibição completa (mm)	Zona de redução de crescimento (mm)
Tintura de Iodo 10%	60,25 ^a ± 4,11	0
Hipoclorito de Sódio 2,5%	22,5 ^b ± 1,29	0
Permanganato de Potássio 5%	15,75 ^c ± 2,22	21,75 ± 2,75
Aseptol®	0 ^d	27,75 ± 3,59
Álcool Etílico Absoluto (99,8%)	0 ^d	16,75 ± 1,5
Solução Salina Estéril (0,95%)	0 ^d	0

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não existe diferença estatística significativa entre os valores, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os compostos contendo iodo são reconhecidos como potentes germicidas, sendo capazes de destruir uma larga variedade de microrganismos, tais como bactérias,

fungos, leveduras, protozoários, vírus e até mesmo esporos. Possuem um alto poder de penetração ao reagir com o substrato protéico da célula bacteriana (HUBER, 1983). Entretanto, a utilização da tintura de iodo como antisséptico possui algumas desvantagens como irritação da derme e elevada afinidade por matéria orgânica, fazendo com que seu potencial oxidante e, conseqüentemente, seu poder germicida seja reduzido nestes casos (BLATT e MOLONEY, 1961; KAUL e JEWETT, 1981).

O cloro e os derivados clorados também são caracterizados como bons germicidas, ao liberar, em solução aquosa, o ácido hipocloroso, que apresenta capacidade de penetrar na célula bacteriana e destruí-la (ANDRADE, 1988). O hipoclorito de sódio a 5% atua como um excelente desinfetante de equipamentos e utensílios, não devendo ser utilizado como antisséptico por ser extremamente irritante para os tecidos vivos. A ação bactericida do cloro é inativada em meio alcalino e na presença de matéria orgânica (MORIYA e MÓDENA, 2008).

O permanganato de potássio é um agente de oxidação forte possuindo propriedades desinfetantes e desodorizantes. Os íons resultantes da redução do permanganato exercem um efeito adstringente. Apesar de ter efeito bactericida *in vitro*, o seu valor clínico como tal é minimizado pela sua rápida redução na presença de fluidos corporais (HUBER, 1983; MORIYA e MÓDENA, 2008).

Verifica-se que os três produtos que demonstraram poder bactericida *in vitro* contra a *C. pseudotuberculosis* podem ter seu efeito reduzido na presença de matéria orgânica como sangue, pus ou fezes. Além disso, alguns fatores externos incontrolláveis podem interferir substancialmente nos resultados do teste, gerando uma certa variação nos dados. Com isso, torna-se evidente a importância do desenvolvimento de análises *in vivo* para avaliar a aplicação de antissépticos e desinfetantes diretamente no linfonodo, para o controle da LC.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo a partir da descrição da curva de crescimento da *C. pseudotuberculosis* contribuem fundamentalmente para a padronização de protocolos de pesquisa relacionados à LC. Para obtenção de uma concentração máxima de células viáveis por mL em caldo BHI+T deve-se manter o inóculo a 37°C por um período de 28 a 40 horas. A avaliação da densidade óptica do meio de cultura líquido é um método eficaz para estimação do número de células viáveis até 40 horas de incubação do meio a 37°C.

Com relação à sensibilidade *in vitro*, a *C. pseudotuberculosis* foi sensível a tintura de iodo a 10%, ao hipoclorito de sódio a 2,5% e ao permanganato de potássio a 5%. O desenvolvimento de um experimento *in vivo* se faz necessário para a confirmação da eficácia do novo tratamento sugerido para a LC, já que os testes de sensibilidade *in vitro* podem sofrer ação de fatores externos incontroláveis e os produtos avaliados podem atuar de forma diferente na presença de matéria orgânica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. S. F. **Immunokinetics of goats with *C. ovis* vaccination and infection.** 1988. 68f. Dissertação (Mestrado em Patologia Comparada) - University of California, Davis, 1988.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Controle da Linfadenite Caseosa pela aplicação de solução de formol no abscesso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 25, n. 3, p. 130-132, 2003.

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite Caseosa: o estado da arte.** Sobral: EMBRAPA Caprinos e Ovinos, 2007. 60p. (EMBRAPA-CNPC. Documentos, 74).

ANDRADE, N. J. O uso de compostos clorados na indústria de laticínios. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p. 48-52, 1988.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 9, p. 269-272, 1986.

BAUER, W.; KIRBY, W. M.; SHEERRIS, J. C.; TURCCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BIER, O. **Bacteriologia e Microbiologia.** 18.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1977. 1056p.

BLATT, R.; MOLONEY, J. V. Evaluation of the iodophor compounds as surgical germicides. **Surgery Gynecologic & Obstetrician**, v. 113, n. 6, p. 699-704, 1961.

BOVILL, R.; BEW, J.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 157-165, 2000.

BROCK, T. D.; BROCK, K. M. **Basic microbiology with applications.** 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1978. 608p.

BUCHANAN, R. L.; BAGI, L. K. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* 0157:H7 to include sodium nitrite as a variable. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 317–332, 1994.

BUCHANAN, R. L.; SMITH, J. L.; MCCOLGAN, C.; MARMER, B. S.; GOLDEN, M.; DELL, B. Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride, and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Safety**, v. 13, p. 159–175, 1993.

FIGUEIREDO, E. A. P.; SHELTON, M.; PANT, K. P. **Goats skins**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., Tucson. **Proceedings...** Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p. 488-490.

HUBER, W. G. **Antissépticos e desinfetantes**. In: JONES, L. M.; BOOTH, N. H.; MCDONALD, L. E. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

ISCSS - INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DO SUL. **Manual prático de microbiologia**. Disponível em: <http://www.egasmoniz.edu.pt/ficheiros/alunos/anos_anteriores/microbiologia/pratica/CAPITULO09.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2009.

KAUL, A. F.; JEWETT, J. F. Agents and techniques for disinfection of the skin. **Surgery Gynecologic & Obstetrician**, v. 152, p. 677-685, 1981.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p.

MORIYA, T.; MÓDENA, J. L. P. Asepsy and antiseptics: techniques of sterilization. **Medicina** (Ribeirão preto), v. 41, n. 3, p. 265-273, 2008.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep: role of skin lesions and dipping fluid. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 12, p. 537-342, 1974.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing**, v. 22, n. 1. Wayne, Pennsylvania, 2002.

OSBALDISTON, G. W. **Laboratory procedures in clinical veterinary bacteriology**. Baltimore: University Park Press, 1973. 265p.

PEDRINI, S. C. B.; MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 391-395, 2003.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A.; ANDRIOLI, A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000.

PRODUTOS químicos de uso freqüente no Cbiot. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Comissão de Segurança-Cbiot. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS_Cbiot08.htm>. Acesso em: 22 out. 2003.

SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 894p.

WILLIAMS, C. S. F. Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 75, n. 7, p. 1165-1169, 1980.

CAPÍTULO 3

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE ANTISSEPTICOS E DESINFETANTES NO
CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA: ACOMPANHAMENTO
CLÍNICO, HEMATOLÓGICO, SOROLÓGICO E MICROBIOLÓGICO**

RESUMO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma enfermidade infecto-contagiosa que acomete caprinos e ovinos, causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis*. O tratamento atualmente preconizado para esta enfermidade consiste na drenagem e cauterização química dos abscessos em estágio avançado de evolução, apesar deste procedimento representar grande risco de contaminação ambiental. Estudos de sensibilidade *in vitro* recentemente desenvolvidos relataram eficiência bactericida da tintura de iodo a 10% e do hipoclorito de sódio a 2,5% contra a *C. pseudotuberculosis*. Objetivou-se com este experimento avaliar a eficácia da tintura de iodo a 10% e do hipoclorito de sódio a 2,5% aplicados no interior do abscesso de animais acometidos pela LC. Foram utilizadas 18 fêmeas ovinas, divididas em três grupos: o primeiro foi tratado com tintura de iodo a 10% (TI), o segundo com hipoclorito de sódio a 2,5% (HS) e o último grupo foi submetido ao tratamento convencional (CT). Os dados hematológicos e sorológicos foram analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Lilliford e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). Foi observada a ruptura natural dos seis abscessos do grupo TI, sendo que em cinco deles, a viabilidade da *C. pseudotuberculosis* foi confirmada no local da lesão, após a ruptura do linfonodo. Quanto ao grupo HS, a ruptura espontânea foi observada em cinco, dos seis abscessos tratados, sendo o microrganismo identificado na lesão dos cinco animais, após o rompimento. No sexto animal deste grupo, foi constatada a involução do abscesso. Foi verificado um edema intenso na região do linfonodo tratado com formação de uma lesão de grande extensão nos animais dos grupos TI e HS. Não foi detectada diferença ($p < 0,05$) nos parâmetros hematológicos em decorrência dos tratamentos avaliados. Quanto ao acompanhamento sorológico dos animais, a análise estatística comparativa entre os meses, dentro de cada grupo, mostrou que os meses 1, 2, 3 e 4 foram diferentes ($p < 0,05$) do mês 0 para os grupos TI e HS. No grupo CT, não houve diferença ($p < 0,05$) entre os meses de 1 a 5 e o mês 0. Conclui-se que a aplicação de tintura de iodo a 10% e hipoclorito de sódio a 2,5% no interior do abscesso de animais acometidos pela LC, em estágio no qual as lesões são detectadas através da inspeção, não é 100% eficaz para o seu controle.

Palavras-chave: abscesso, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ovino, tratamento

ABSTRACT

Caseous Lymphadenitis (LC) is a contagious and infectious disease that affects caprine and ovine, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The current and recommended treatment for the disease is the drainage and chemical cauterization of the abscesses with 10% iodine at the final stage of development, although it may represent high risks of environmental contamination. Recent *in vitro* sensibility experiments showed the bactericidal efficiency of 10% iodine and 2,5% sodium hypochlorite against *C. pseudotuberculosis*. The aim of this study was to evaluate the efficacy of 10% iodine and 2,5% sodium hypochlorite application inside the lymph nodes of animals affected by LC. It were utilized 18 ovine females, assorted in three groups: the first group was treated with 10% iodine (TI), the second with 2,5% sodium hypochlorite (HS) and the third group was conventionally treated (CT). It was observed the abscess rupture of all six animals of TI group, and *C. pseudotuberculosis* was confirmed in five, after rupture. In HS group, the spontaneous rupture was noted in five animals, which in all of them it were detected the etiological agent of LC. The sixth animal of this group developed abscess regression. Hematological and serological results were submitted to Lilliford's test, analysis of variance and Dunnet's test, with 5% of significance. It was observed an intense swelling at the treated lymph node region and the formation of an extensive wound in both groups TI and HS. No statistical difference significant was detected in hematological parameters due to treatments evaluated. Considering the serological monitoring, the comparative statistical analysis between months, inside the groups, showed that months 1, 2, 3 and 4 were different ($p < 0,05$) from month 0, for TI and HS groups. For CT group, no difference ($p < 0,05$) between month 0 and months from 1 to 5 were detected. It is concluded that the application of 10% iodine and 2,5% sodium hypochlorite inside the abscess of animals affected by LC, at the stage that lesions are detectable by inspection, is not 100% efficient for the control of the disease.

Keywords: abscess, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ovine, treatment

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a produção de caprinos e ovinos vem assumindo uma importante parcela no contexto do agronegócio brasileiro. Atualmente, se caracteriza como uma atividade de grande importância cultural, social e econômica para o Nordeste do Brasil, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento desta região. A produção de alimentos de alto valor bio1ógico (leite, carne e vísceras) e pele de excelente qualidade, além da adaptabilidade dos animais aos ecossistemas locais, permite à caprino-ovinocultura enquadrar-se como uma boa alternativa de trabalho e de renda (MORAES NETO et al., 2003). Entretanto, ainda observa-se uma baixa produtividade na região em decorrência da utilização de manejos inadequados e da grande ocorrência de doenças, dentre elas a Linfadenite Caseosa (LC).

A LC é uma enfermidade crônica e debilitante que acomete os pequenos ruminantes, caracterizada pela formação de abscessos em um ou mais linfonodos, causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um bacilo Gram positivo curto e irregular de, aproximadamente, 0,5 a 0,6 μm por 1,0 a 3,0 μm . É uma doença infecto-contagiosa que constitui um problema de ordem mundial, responsável por causar grandes perdas econômicas na caprino-ovinocultura (ALVES et al., 2007). A depreciação do valor das peles, condenação de carcaças, quedas na produção de carne, leite, lã e eficiência reprodutiva são alguns dos principais prejuízos causados pela LC (KRISHNA et al., 1977; FIGUEIREDO et al., 1982; PATON et al., 1994; PATON et al., 2003), além do risco oferecido à saúde pública pelo potencial zoonótico já descrito para a *C. pseudotuberculosis* (MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997; JOIN-LAMBERT et al., 2006).

A ocorrência de ferimentos na pele dos animais atua como a principal porta de entrada para o microrganismo, presente no meio ambiente devido à ruptura dos abscessos de animais infectados pela doença (NAIRN e ROBERTSON, 1974). O exsudato purulento de uma lesão de LC é extremamente rico em células bacterianas viáveis, apresentando uma concentração aproximada de 1×10^6 a 5×10^7 células por grama de material (BROWN e OLANDER, 1987). Portanto, o principal aspecto relacionado ao controle desta enfermidade está no isolamento imediato dos animais acometidos e na drenagem cirúrgica do abscesso, antes do seu rompimento natural, já que o microrganismo é capaz de sobreviver e persistir no meio ambiente por um longo

período de tempo, constituindo uma constante fonte de infecção para os animais (WILLIAMS, 1980). Tal característica do microrganismo associada à ineficiência do tratamento à base de antimicrobianos e à difícil detecção dos animais infectados faz com que a erradicação da LC seja uma tarefa extremamente árdua de ser realizada (WILLIAMSON, 2001).

O tratamento atualmente recomendado para a LC consiste na drenagem e cauterização química dos abscessos, utilizando-se solução de iodo a 10%, quando estes encontram-se em estágio avançado de desenvolvimento. Porém, esta técnica representa grandes riscos de contaminação ambiental, seja através da ruptura espontânea inesperada do abscesso ou pela simples exposição ao meio externo de um material altamente contaminado. Um experimento avaliando a aplicação de solução de formol a 10% no interior do linfonodo já foi realizado, onde constatou-se a morte da *C. pseudotuberculosis* no local da lesão, permanecendo viável apenas em outros órgãos ou linfonodos do animal. Entretanto, a utilização deste produto no interior dos abscessos é responsável pelo aparecimento de vários transtornos como a ocorrência de fibrose, necrose, destruição dos tecidos epitelial e muscular adjacentes e possível comprometimento de tecido ósseo (ALVES e PINHEIRO, 2003). Além disso, sabe-se que o formol possui efeitos teratogênico, mutagênico e carcinogênico em animais de laboratório, sendo também responsável por causar anomalias congênitas e outras reações adversas (PRODUTOS..., 2003).

Estudos *in vitro* recentemente desenvolvidos com intuito de avaliar a eficácia de antissépticos e desinfetantes de baixa toxicidade ao organismo animal, contra a *C. pseudotuberculosis*, relatam a alta sensibilidade deste microrganismo frente à solução de tintura de iodo a 10% e ao hipoclorito de sódio a 2,5% (SANTOS et al., 2009). Portanto, objetivou-se com este experimento, avaliar a eficácia da utilização dessas substâncias no interior do abscesso de animais acometidos pela LC, em estágio inicial de desenvolvimento, visando o tratamento e o controle desta enfermidade.

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado na Fazenda Santa Rita, unidade experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos (CNPQ), localizada no município de Sobral, em uma região semi-árida do sertão cearense, a 3° 41' 32" de latitude Sul e 40° 20' 53" de longitude Oeste e a uma altitude de 75 m. O período experimental foi compreendido entre os meses de julho e dezembro do ano de 2009. O clima da região, pela classificação de Köppen, é Aw de Savana (MILLER, 1971), caracterizada por um período chuvoso de janeiro a junho e um período seco de julho a dezembro, com temperaturas elevadas ao longo do ano, médias máximas de 32°C e mínimas de 22°C e pluviosidade média de 759 mm ao ano.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 18 fêmeas ovinas mestiças da raça Santa Inês naturalmente infectadas pela LC, pertencentes ao rebanho experimental do CNPC, localizado na cidade de Sobral-CE. Os animais eram mantidos em piquete de pastagem nativa, tinham acesso ao cocho com sal mineral e água à vontade e foram inspecionados e selecionados a partir da apresentação clínica da enfermidade, em estágio inicial de desenvolvimento. O estágio inicial da enfermidade foi identificado através da linfadenomegalia visível e perceptível através da inspeção dos animais, com ausência de alopecia na região da lesão. O exame clínico completo, realizado antes do início do experimento, não acusou nenhum outro achado patológico nos animais, além das alterações nos linfonodos. Durante o exame clínico, foram avaliados frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, movimentos ruminais, coloração de mucosas e linfonodos (DIFFAY et al., 2005). O método FAMACHA foi utilizado ao longo de todo o experimento para o controle da parasitose gastrointestinal, que consistia na avaliação da mucosa ocular dos animais quinzenalmente. Todos os animais selecionados foram testados através do IHS

(Teste da Inibição da Hemólise Sinérgica) para confirmação do diagnóstico de LC e, a partir daí, divididos aleatoriamente em três grupos, contendo seis animais cada um. O primeiro grupo de animais foi tratado com tintura de iodo a 10% (TI), o segundo grupo com hipoclorito de sódio a 2,5% (HS) e o terceiro grupo foi utilizado como controle para a realização do tratamento convencional da enfermidade, através da drenagem cirúrgica e cauterização química da lesão (CT). Para o preparo da solução de tintura de iodo a 10%, foram utilizados 100 g de iodo ressublimado, 60 g de iodeto de potássio, 50 mL de água destilada e 950 mL de álcool absoluto. Quanto à solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, foi utilizado um produto comercial da marca Brilux®, à base de hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, água e teor de cloro ativo de 2,5% p/p. No momento que precedeu o tratamento, um volume de 1 mL de solução salina estéril (NaCl, 0,95%) foi injetado no interior do linfonodo acometido e em seguida puncionado para confirmação microbiológica da *C. pseudotuberculosis*.

TRATAMENTO E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO, MICROBIOLÓGICO E HEMATOLÓGICO

Inicialmente foram realizadas tricotomia e antissepsia da região dos linfonodos acometidos, com álcool a 70% e tintura de iodo a 10%. Foi aplicado um volume de 5 mL do produto a ser testado no interior do abscesso já formado de cada animal, utilizando-se seringas e agulhas descartáveis, de 5 mL e 25 x 0,7 mm de diâmetro, respectivamente. Após o tratamento, os animais foram avaliados clinicamente durante cinco meses, duas vezes por semana, para descrição da evolução do caso clínico. Foi realizado o exame clínico completo (DIFFAY et al., 2005), dando ênfase à caracterização das lesões localizadas nos linfonodos, como o aumento ou redução do diâmetro dos abscessos, alteração em sua consistência, sensibilidade, mobilidade, cicatrização ou ruptura. Nos casos de ruptura, foi realizada a coleta de material para isolamento e identificação do microrganismo presente no local da lesão e o ferimento tratado com tintura de iodo a 10% e spray repelente de insetos. Quando necessário, foi utilizada uma pomada cicatrizante e antibiótico local. O material coletado foi plaqueado em ágar sangue e as colônias submetidas à caracterização macroscópica, coloração pelo método de Gram e provas da catalase, urease e fermentação de carboidratos, para

identificação da *C. pseudotuberculosis*. As variações no volume dos abscessos foram aferidas com o auxílio de um paquímetro digital. Para realização do hemograma foram colhidas amostras de sangue através da punção da veia jugular utilizando-se o sistema de vacutainer, em tubos de 5 mL contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) sete dias após o tratamento e ao final do experimento. O exame hematológico, seguindo metodologia descrita por Coles (1993), consistiu na determinação dos seguintes parâmetros: volume globular (método do microhematócrito), hemoglobina (método da cianometahemoglobina), contagem total de leucócitos (método de hemocítômetro) e contagem diferencial de leucócitos, os quais foram classificados como neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, eosinófilos, linfócitos e monócitos (esfregaço sanguíneo corado com soluções de azobenzenosulfônicos a 0,1%, ciclohexadienos a 0,1% e fenotiazinas a 0,1%). Todas as análises hematológicas foram desenvolvidas no Laboratório de Patologia Clínica do CNPC.

ACOMPANHAMENTO SOROLÓGICO (IHS)

O acompanhamento sorológico dos animais foi realizado a cada 15 dias, através do IHS, seguindo a metodologia descrita por Knight (1978). As coletas de sangue para obtenção do soro foram realizadas por punção da veia jugular, utilizando-se sistema vacutainer, em tubos de 10 mL sem anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e os soros armazenados em tubos tipo eppendorf em freezer à -20°C.

Para realização do IHS, a toxina do *Rhodococcus equi* foi produzida a partir da incubação de 250 mL de caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração), inoculado com cinco colônias do microrganismo, a 37°C durante cinco dias. Após a confirmação de pureza e 24 horas de descanso em geladeira, o caldo foi centrifugado a 3000 rpm, por 30 minutos e o sobrenadante filtrado, utilizando-se primeiramente filtro estéril de 0,45 µm e posteriormente de 0,22 µm. O filtrado obtido (exotoxina) foi acondicionado em garrafa estéril a 4°C, após adição de Thimerosal® na proporção de 1:10000, até a sua utilização. Para sensibilização das hemácias com a toxina de *R. equi*, foi realizada a coleta asséptica de sangue ovino em tubo estéril contendo anticoagulante (solução

estéril de citrato de sódio a 5%) e então procedida a centrifugação do mesmo a 3000 rpm por 10 minutos. O sedimento composto por glóbulos vermelhos foi então lavado três vezes em solução salina 0,9% estéril, e posteriormente, reconstituído o volume original com a mesma solução. Ao ágar base fundido e estéril, mantido a 48°C em banho-maria, acrescentou-se 20% da toxina de *R. equi* e 7% das hemácias lavadas. Após este procedimento, realizou-se a distribuição do ágar em placas de petri estéreis de 90 x 15 mm, sendo que uma delas foi mantida em temperatura ambiente como controle, e as outras acondicionadas a 4°C. A toxina da *C. pseudotuberculosis* foi produzida a partir da incubação de 250 mL de caldo BHI+T (Infusão de Cérebro e Coração incluída de Tween 80®), inoculado com cinco colônias do microrganismo, a 37°C por 72 horas. Após a confirmação de pureza e 24 horas de descanso em geladeira, o caldo foi então centrifugado a 3000 rpm, por 30 minutos e o sobrenadante filtrado, utilizando-se primeiramente filtro estéril de 0,45 µm e posteriormente de 0,22 µm. O filtrado obtido (exotoxina) foi acondicionado em garrafa estéril a 4°C, após adição de Thimerosal® na proporção de 1:10000, até a sua utilização. Para a titulação das toxinas, foi utilizada uma placa de diluição contendo 80 poços. Foram adicionados 100 µL da toxina de *C. pseudotuberculosis* no primeiro poço e 50 µL do tampão salina formolizada (BFS) nos poços 2 a 10, promovendo as diluições em série. Em seguida, foram adicionados 50 µL do BFS em todos os poços. Por meio de discos estéreis embebidos em todas as diluições e colocados sobre o ágar sangue ovino sensibilizado com a toxina de *R. equi*, halos de hemólise variáveis se formaram, após 18 a 24 horas de incubação em estufa a 37°C. Para a leitura dos resultados, identificou-se o disco com halo de hemólise menor ou igual a 5 mm. As duas diluições anteriores indicam a diluição adequada para a realização do teste. Para realização do IHS propriamente dito, utilizou-se a mesma placa de diluição usada para a titulação da toxina. Foram adicionados 50 µL de BFS nos poços 2 a 10 e 100 µL dos soros a testar no primeiro poço. Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas, retirando-se 50 µL dos soros a testar do poço 1, transferindo ao poço 2, e assim sucessivamente até o último poço. A seguir, foram adicionados 50 µL da toxina titulada da *C. pseudotuberculosis* em todos os poços. Após esta etapa, foi realizada a homogeneização do conteúdo dos poços e a placa mantida em descanso por 30 minutos para permitir a aderência dos anticorpos presentes nos soros à toxina da *C. pseudotuberculosis*. Discos de papel filtro estéreis foram colocados em todos os poços, embebendo-os e distribuindo-os, em seguida, nas placas de ágar sangue ovino sensibilizado com toxina de *R. equi*. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C

por 18 a 24 horas. A presença de antitoxinas nos soros testados foi evidenciada pela inibição da hemólise no meio de cultura. O título sorológico corresponde à maior diluição que não apresenta hemólise, indicando existir anticorpos suficientes nesta. Somente títulos maiores ou iguais a 1:4 foram considerados como sorologia positiva. Todas as análises sorológicas e microbiológicas foram desenvolvidas no Laboratório de Bacteriologia do CNPC.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, considerando três tratamentos e seis repetições. Os dados obtidos foram analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Lilliford e submetidos à análise de variância geral, utilizando-se o programa estatístico SAEG (SAEG, 2007). A comparação de médias foi realizada através do teste de Dunnet, onde foi adotado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução do caso clínico de cada animal pertencente aos três grupos está representada nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente, através do diâmetro dos linfonodos e da ocorrência ou não de ruptura dos abscessos. O dia 0 corresponde ao tamanho dos linfonodos mensurados antes da realização dos tratamentos. As médias destes valores, por tratamento, foram calculadas até o momento que existiam, no mínimo, três animais no grupo sem ruptura de linfonodo e estão descritas na Figura 4.

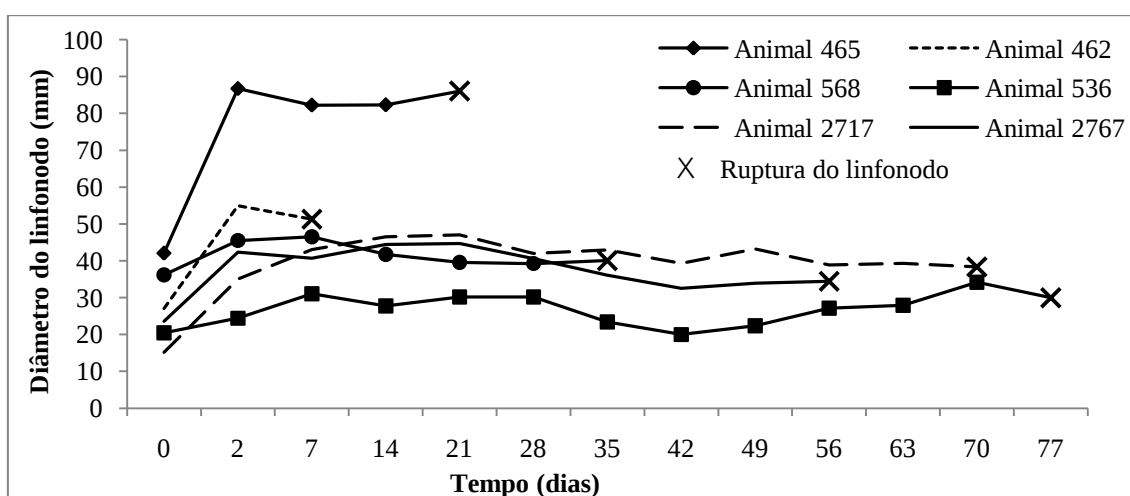


Figura 1. Evolução do diâmetro dos linfonodos dos animais do grupo tratado com tintura de iodo a 10%, ao longo do tempo.

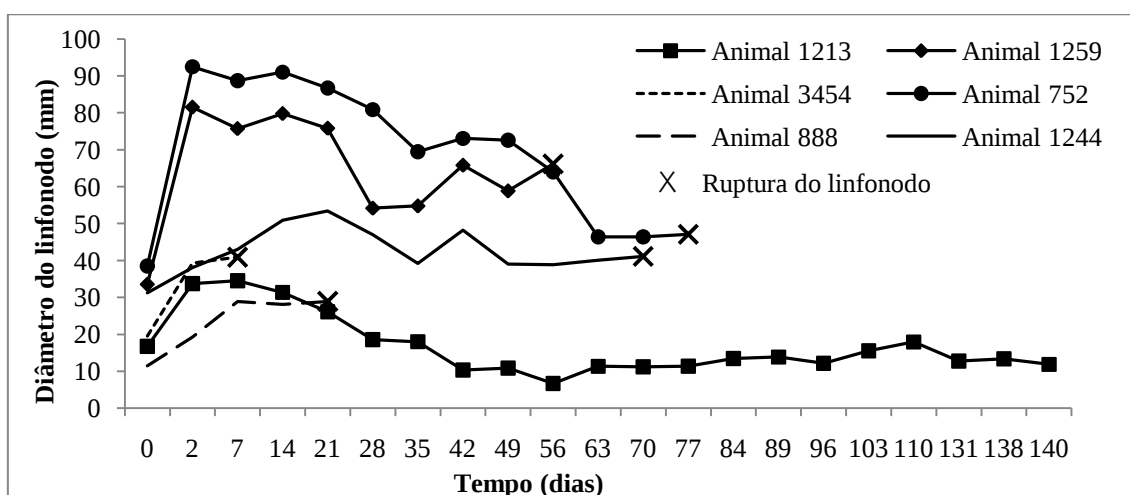


Figura 2. Evolução do diâmetro dos linfonodos dos animais do grupo tratado com hipoclorito de sódio a 2,5%, ao longo do tempo.

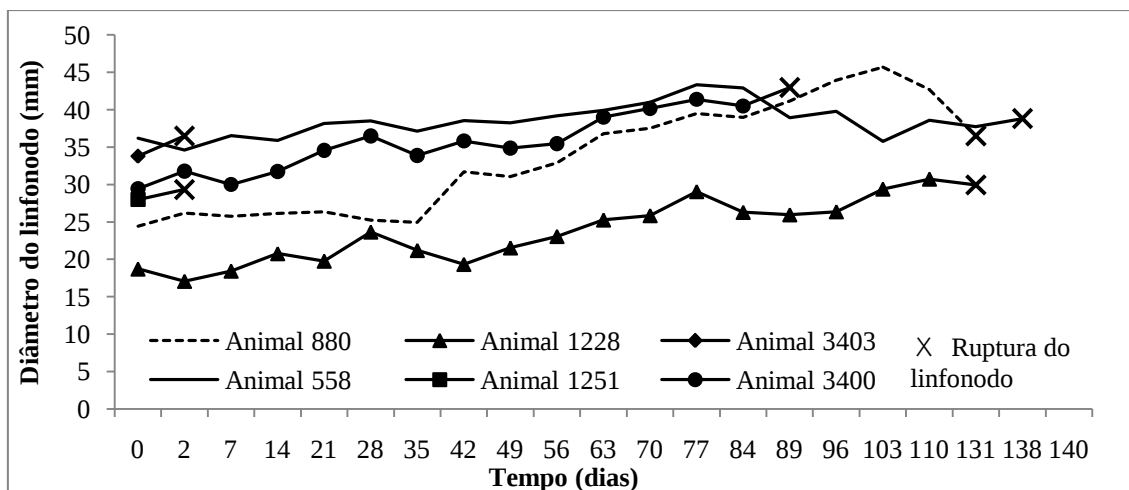


Figura 3. Evolução do diâmetro dos linfonodos dos animais do grupo controle, ao longo do tempo.

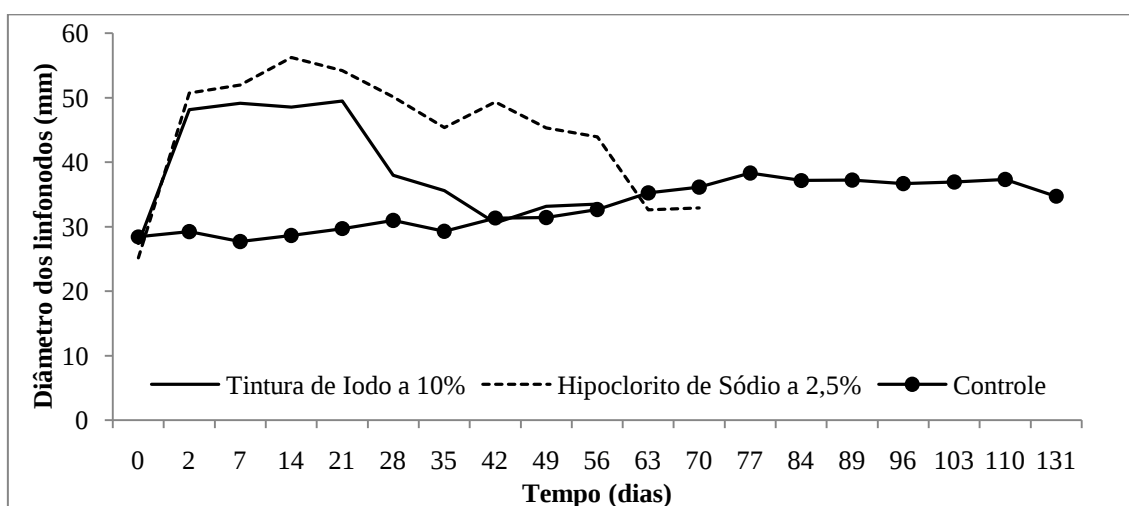


Figura 4. Evolução das médias dos diâmetros dos linfonodos dos animais pertencentes aos grupos tratados com tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5% e do grupo sob tratamento convencional, ao longo do tempo.

Para os grupos TI e HS, considerou-se como satisfatório o tratamento que promovesse a involução do abscesso ou que, após a ruptura espontânea do nódulo, não contivesse a *C. pseudotuberculosis* viável na lesão. Já para o tratamento convencional, a eficácia do mesmo foi determinada de acordo com a não ocorrência de ruptura espontânea inesperada do abscesso, considerando um acompanhamento a cada três dias dos animais infectados.

A partir da análise da Figura 1, nota-se que houve a ruptura natural dos seis abscessos tratados com tintura de iodo a 10%, sendo que em cinco deles, a viabilidade da *C. pseudotuberculosis* foi confirmada no local da lesão, após a ruptura do linfonodo. Um dado interessante que deve ser mencionado está relacionado ao aspecto do material

coletado após o rompimento. Todos os abscessos tratados com tintura de iodo a 10% continham em seu interior um material fibrinoso, encapsulado, de consistência firme e bastante aderido à musculatura adjacente, formado após a realização do tratamento (Figura 5a). Neste material, a *C. pseudotuberculosis* não foi confirmada em nenhum animal. Entretanto, em cinco animais deste grupo, o material caseoso tipicamente observado nos abscessos de animais acometidos pela LC (Figura 5b) também estava presente na lesão. A partir deste material, sempre havia confirmação de seu agente etiológico. Supõe-se que a quantidade do produto aplicada no interior do linfonodo destes animais tenha sido insuficiente para causar a eliminação do microrganismo em toda a extensão do abscesso.



Figura 5. a) Exsudato fibrinoso e encapsulado ausente de *Corynebacterium pseudotuberculosis* viável; b) exsudato de aspecto caseoso tipicamente observado nos casos de Linfadenite Caseosa.

Quanto ao grupo tratado com hipoclorito de sódio a 2,5%, a ruptura espontânea foi observada em cinco, dos seis abscessos tratados. Neste caso, a *C. pseudotuberculosis* foi isolada e identificada na lesão dos cinco animais após o rompimento do abscesso. A confirmação do microrganismo causador da LC no material contido no interior do abscesso, após sua ruptura, inviabiliza a utilização deste tratamento já que este material representa a principal fonte de infecção da enfermidade para o rebanho. Quanto ao sexto animal pertencente ao grupo HS, foi constatada a involução do abscesso após o tratamento, cujo diâmetro reduziu ao mesmo valor do linfonodo contra-lateral normal. Este resultado pode ser explicado a partir da análise do diâmetro dos abscessos dos animais, obtida antes da realização dos tratamentos. Nota-se que o único animal cujo linfonodo demonstrou regressão de tamanho após o tratamento apresentava o abscesso em estágio bastante precoce de desenvolvimento em relação aos outros animais. Este

aspecto deve ser levado em consideração para avaliar a eficácia do tratamento sugerido, já que a conduta preconizada para o tratamento de qualquer abscesso em estágio avançado consiste na drenagem completa de todo o material formado (KNIGHT et al., 1980). Sugere-se que se o tratamento tivesse sido realizado em momento anterior ao que foi descrito, ou seja, em estágio mais precoce de desenvolvimento dos abscessos, os resultados poderiam vir a ser satisfatórios. Entretanto, caso esta hipótese seja realmente comprovada em estudos futuros, supõe-se que a praticidade do novo tratamento esteja comprometida, já que os abscessos em estágio extremamente inicial de desenvolvimento dificilmente seriam detectados somente pela inspeção periódica do rebanho, e sim pelo acompanhamento através da palpação dos linfonodos externos dos animais.

Outro dado importante que deve ser mencionado diz respeito ao período de duração da apresentação clínica da enfermidade. Observa-se que aos 90 dias após o tratamento, todos os animais dos grupos TI e HS já não atuavam mais como portadores clínicos da enfermidade (Figuras 1 e 2). Neste momento, todas as lesões dos animais pertencentes a estes dois grupos já estavam cicatrizadas, diferente do que foi observado para os animais do grupo CT, onde a resolução do processo inflamatório se concentrou no período entre o 84º e 140º dia do experimento (Figura 3). A informação descrita acima é confirmada após a avaliação da duração média, em dias, da fase clínica da doença. O grupo TI apresentou uma média de duração de 51,33 dias, o grupo HS de 52,5 dias e o grupo CT de 87,67 dias, ou seja, mais de um mês além dos tratamentos avaliados. Portanto, caso seja realizado algum tipo de adaptação ao tratamento avaliado que faça com que ele se torne satisfatório, o encurtamento do curso da enfermidade seria mais uma vantagem adquirida com a nova técnica. Uma menor duração da fase clínica da doença implicaria um menor gasto com mão-de-obra, já que após a detecção das lesões, um acompanhamento mais freqüente dos animais se faz necessário para evitar a ruptura espontânea dos abscessos e a contaminação ambiental.

Na Figura 6 está representada a eficácia dos dois tratamentos avaliados em comparação ao convencional atualmente preconizado para a LC. No que diz respeito ao controle da contaminação ambiental pela *C. pseudotuberculosis*, nota-se que o tratamento convencional foi mais eficaz que os dois grupos analisados.

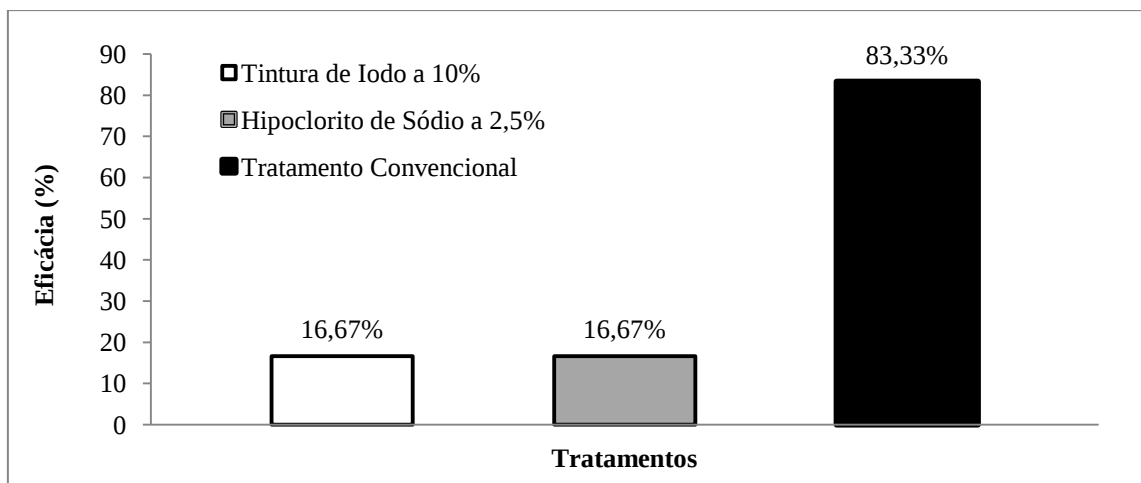


Figura 6. Eficácia (%) dos tratamentos com tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5% e do tratamento convencional.

É importante ressaltar que o hipoclorito de sódio a 2,5% aplicado no interior do linfonodo dos animais foi responsável por reação de dor, diferente do observado para a tintura de iodo a 10%. Além disso, foi observado edema na região dos linfonodos dos animais pertencentes aos dois grupos, formado logo após a realização do tratamento (Figura 7a). Este fato pode ser explicado pela forte irritação provocada por estes produtos quando utilizados em altas concentrações e em contato com superfícies vivas como pele e mucosas (PRODUTOS..., 2003). Sugere-se, portanto, a utilização prévia de anestésicos locais, caso sejam realizados estudos futuros considerando adaptações deste tratamento. Com exceção de um animal do grupo HS, todos os abscessos tratados evoluíram para a ruptura. Em todos os casos, formou-se uma lesão com exposição da musculatura da região (Figura 7b), exigindo um acompanhamento diário dos animais ao longo de aproximadamente sete dias, até a completa cicatrização da ferida. O tratamento das lesões após a ruptura foi realizado com a aplicação de tintura de iodo a 10%, após a retirada de todo o material purulento ainda existente no local e aplicação de repelente para insetos. Somente em um caso específico foi necessária a utilização de pomada antibiótica e cicatrizante para o tratamento do ferimento, após ter sido detectada infecção secundária local, através do exame microbiológico do material coletado.

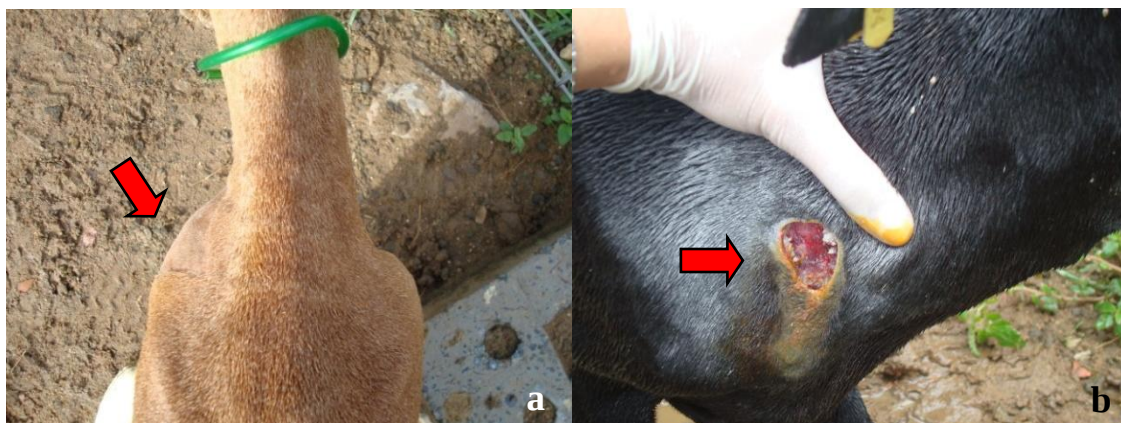


Figura 7. a) Edema acentuado na região do linfonodo tratado e b) lesão observada nos animais tratados com tintura de iodo a 10% e hipoclorito de sódio a 2,5%.

Os valores médios hematológicos obtidos no período inicial e final do experimento estão descritos na Tabela 1. A partir da análise dos dados, observa-se que todos os índices encontram-se dentro dos limites de normalidade para a espécie ovina, de acordo com os valores fornecidos por Jain (1993). A análise comparativa entre os dois grupos testados e o grupo controle revela que não existe diferença estatística significativa ($p > 0,05$) para as variáveis avaliadas. Com isso, admite-se que a toxicidade dos produtos utilizados, a reação de dor e o stress decorrente dos tratamentos não desencadearam alterações no eritrograma ou no leucograma dos animais. A comparação estatística entre os meses inicial e final do estudo acusou diferença significativa ($p < 0,05$) dentro do grupo HS para leucócitos, linfócitos e monócitos e dentro do grupo TI para monócitos. A diminuição de tais valores ao final do experimento pode ser explicada pela resolução do processo inflamatório. É importante salientar que mesmo que os tratamentos avaliados não tenham apresentado 100% de eficácia, após a obtenção dos dados e das informações necessárias para este estudo, todas as lesões foram devidamente tratadas até sua completa cicatrização. Ao terceiro mês de acompanhamento, todos os animais dos grupos TI e HS já possuíam a lesão completamente cicatrizada e os valores aumentados de linfócitos e monócitos observados em momento anterior se devem, provavelmente, à linfadenopatia localizada e à multiplicação de macrófagos para remoção de debris celulares durante o processo de recuperação (BUSH, 1994; WILLARD et al., 1994).

Percebe-se, com isso, que as alterações no hemograma descritas neste estudo são decorrentes, muito provavelmente, do processo inflamatório causado pela *C. pseudotuberculosis* (GAMEEL e TARTOUR, 1974). Portanto, vale ressaltar que a

ausência de diferença estatística significativa entre os grupos testados e o grupo controle e a permanência de todos os valores hematológicos dentro da faixa de normalidade para a espécie ovina eliminam a possibilidade de ocorrência de danos aos animais, neste aspecto, em decorrência dos tratamentos avaliados.

Tabela 1. Valores médios do volume globular, hemoglobina, leucócitos e médios absolutos de neutrófilos segmentados, bastonetes, linfócitos e monócitos dos animais pertencentes aos grupos tratados com tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5% e grupo controle, nos meses inicial e final do experimento

	Mês	Tratamento			Valores normais para ovinos*
		Tintura de Iodo a 10%	Hipoclorito de Sódio a 2,5%	Controle	
Volume Globular (%)	1	24,67 ^{Aa}	25,17 ^{Aa}	25,5 ^{Aa}	24 a 50
	2	28,5 ^{Aa}	27 ^{Aa}	28,5 ^{Aa}	
Hemoglobina (g/dL)	1	9,6 ^{Aa}	8,95 ^{Aa}	9,6 ^{Aa}	8 a 16
	2	8,83 ^{Aa}	8,53 ^{Aa}	8,58 ^{Aa}	
Leucócitos (/μL)	1	11025 ^{Aa}	10250 ^{Aa}	8250 ^{Aa}	4000 a 12000
	2	7225 ^{Aa}	6891,67 ^{Ab}	7976,5 ^{Aa}	
Eosinófilos (/μL)	1	903,17 ^{Aa}	900,83 ^{Aa}	818,92 ^{Aa}	0 a 1000
	2	851,08 ^{Aa}	713,67 ^{Aa}	783,75 ^{Aa}	
Segmentados (/μL)	1	6334,17 ^{Aa}	5160,92 ^{Aa}	4164 ^{Aa}	700 a 6000
	2	3545,67 ^{Aa}	3621,75 ^{Aa}	4030,83 ^{Aa}	
Bastonetes (/μL)	1	0 ^{Aa}	31,25 ^{Aa}	33,75 ^{Aa}	Raro
	2	34,33 ^{Aa}	14,17 ^{Aa}	28,83 ^{Aa}	
Linfócitos (/μL)	1	3256,92 ^{Aa}	3582,42 ^{Aa}	2846,33 ^{Aa}	2000 a 9000
	2	2532 ^{Aa}	2387,33 ^{Ab}	2469,75 ^{Aa}	
Monócitos (/μL)	1	514 ^{Aa}	574,58 ^{Aa}	387 ^{Aa}	0 a 750
	2	211,75 ^{Ab}	154,75 ^{Ab}	239,5 ^{Aa}	

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não existe diferença estatística significativa e letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não existe diferença estatística significativa entre os valores, pelo teste de Dunnet a 5% de significância.

*Jain (1993).

O monitoramento sorológico dos animais realizado através do IHS ao longo de cinco meses após a realização dos tratamentos está representado na Figura 8. A partir de sua análise, é possível perceber um pico nos valores sorológicos dos animais

pertencentes aos grupos TI e HS, no primeiro mês após o tratamento, diferente do observado para o grupo controle. Após o aumento na sorologia dos dois grupos citados, tais valores se mantiveram relativamente altos até o quarto mês. A partir daí, foi observada uma discreta queda dos valores. Além disso, observa-se que a titulação sorológica do grupo CT manteve-se constante ao longo de todo o período experimental.

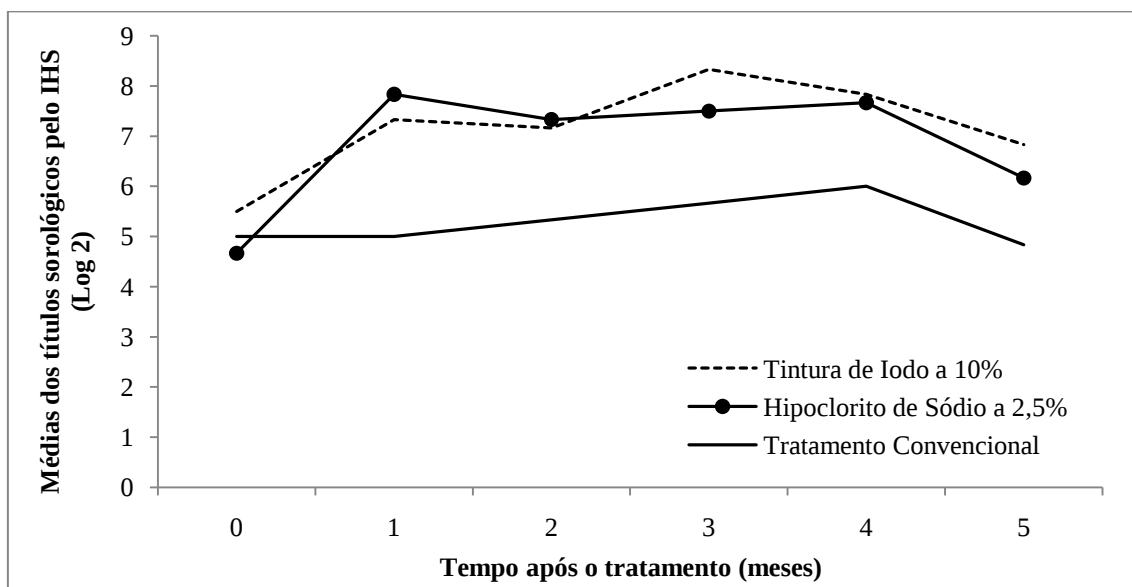


Figura 8. Médias dos títulos sorológicos (Log 2) pelo IHS dos grupos tratados com tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5% e do grupo sob tratamento convencional, ao longo de cinco meses.

A análise estatística comparativa entre os meses, dentro de cada grupo, mostrou que os meses 1, 2, 3 e 4 são diferentes ($p < 0,05$) do mês 0, para os grupos TI e HS. Já no grupo CT, não houve diferença estatística significativa entre os meses de 1 a 5 e o mês 0 (Tabela 2), confirmando o que foi visualizado pela análise da Figura 8.

Bulgin (1998) descreve a utilização de “autovacinas”, através da aplicação de 10 a 25 mL de formalina (solução a 10%) no interior do linfonodo de animais acometidos pela LC, com a ressalva de não utilizá-la em animais destinados ao consumo humano.

A reação inflamatória causada pela ação irritante da tintura de iodo a 10% e do hipoclorito de sódio a 2,5% pode ter estimulado a migração celular, com maior exposição de antígenos e, conseqüentemente, aumento da imunidade humoral. É importante ressaltar que a atividade imunológica desencadeada contra a *C. pseudotuberculosis* é complexa e envolve tanto a resposta humoral quanto a celular (ELLIS et al., 1990). Por isso, o aumento nos títulos sorológicos dos animais não implica, necessariamente, a proteção contra re-infecção ou recidiva da sintomatologia

clínica. No entanto, estudos futuros mais aprofundados com intuito de testar a hipótese sugerida e avaliar o possível efeito protetor de tais produtos devem ser realizados.

Tabela 2. Médias dos títulos sorológicos (Log 2) pelo IHS dos grupos tratados com tintura de iodo a 10%, hipoclorito de sódio a 2,5% e do grupo sob tratamento convencional, ao longo de cinco meses

Mês	Tratamento		
	Tintura de Iodo a 10%	Hipoclorito de Sódio a 2,5%	Controle
0*	4,67 ^a	5,50 ^a	5,00 ^a
1	7,83 ^b	7,33 ^b	5,00 ^a
2	7,33 ^b	7,33 ^b	5,33 ^a
3	7,50 ^b	8,33 ^b	5,67 ^a
4	7,67 ^b	7,83 ^b	6,00 ^a
5	6,17 ^a	6,83 ^a	4,83 ^a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não existe diferença estatística significativa entre os valores, pelo teste de Dunnet a 5% de significância.

*Sorologia realizada antes dos tratamentos dos animais.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a aplicação de tintura de iodo a 10% e de hipoclorito de sódio a 2,5%, no interior do abscesso de animais acometidos pela LC, em estágio de desenvolvimento no qual as lesões são detectadas através da inspeção, não é 100% eficaz para o controle desta enfermidade.

Estudos futuros devem ser realizados com intuito de avaliar o efeito do mesmo tratamento em animais que ainda não possuem aumento visível de linfonodo, mas já apresentam uma linfadenomegalia perceptível à palpação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Controle da Linfadenite Caseosa pela aplicação de solução de formol no abscesso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 25, n. 3, p. 130-132, 2003.

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite Caseosa: o estado da arte**. Sobral: EMBRAPA Caprinos e Ovinos, 2007. 60p. (EMBRAPA-CNPC. Documentos, 74).

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 57, p. 1-12, 1987.

BULGIN, M. S. Central nervous disorders of sheep. In: SYMPOSIUM ON SMALL RUMINANTS FOR THE MIXED ANIMAL PRACTITIONER WESTERN VETERINARY CONFERENCE, Las Vegas. **Proceedings...** Las Vegas, 1998.

BUSH, B. M. **Interpretation of laboratory results for small animal clinics**. London: Blackwell Scientific Publications, 1994. 515p.

COLES, E. H. **Patologia Clínica Veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Saunders, 1993.

DIFFAY, B. C.; MCKENZIE, D.; WOLF, C.; PUGH, D. G. Abordagem e exame de ovinos e caprinos. In: PUGH, D. G. (Ed.). **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 1, p. 1-19.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; HOLLER, L. D.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 10, p. 1609-1613, 1990.

FIGUEIREDO, E. A. P.; SHELTON, M.; PANT, K. P. **Goats skins**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., Tucson. **Proceedings...** Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p. 488-490.

GAMEEL, A. A.; TATOUR, G. Haematological and plasma protein changes in sheep experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 84, p. 477-483, 1974.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993, 417 p.

JOIN-LAMBERT, O. E.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J. L.; BLANCHE, S.; BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, p. 848-851, 2006.

KNIGHT, H. D. A serological method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **Cornell Veterinary**, v. 68, n. 2, p. 220-237, 1978.

KNIGHT, H. D.; HIETALA, S. K.; JANG, S. Antibacterial treatment of abscesses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 176, n. 10, p. 1095-1098, 1980.

KRISHNA, L.; KULSHRESTHA, S. B.; PALIWAL, O. P. Epididymo-Orchitis in ram due to *Corynebacterium ovis*. **Indian Veterinary Journal**, v. 54, n. 2, p. 517-519, 1977.

MILLER, A. **Meteorology**. Columbia, Ohio: Charles E. Merrill Publishing Company, 1971. 154p.

MILLS, A. E.; MITCHELL, R. D.; LIM, E. K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. **Pathology**, v. 29, n. 2, p. 231-233, 1997.

MORAES NETO, O. T.; RODRIGUES, A.; ALBUQUERQUE, A. C. A.; MAYER, S. **Manual de capacitação de agentes de desenvolvimento rural (ADRs) para a Caprinovinocultura**. João Pessoa: SEBRAE/PB, 2003. 114 p.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep: role of skin lesions and dipping fluid. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 12, p. 537-342, 1974.

PATON, M. W.; ROSE, I. R.; HART, R. A.; SUTHERLAND, S. S.; MERCY, A. R.; ELLIS, T. M.; DHALIWAL, J. A. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, n. 2, p. 47-49, 1994.

PATON, M. W.; WALKER, S. T.; ROSE, I. R.; WATT, G. T.; MERCY, A. R.; Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. ½, 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, n. 2, p. 185-191, 1997.

PRODUTOS químicos de uso freqüente no Cbiot. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Comissão de Segurança-Cbiot. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS_Cbiot08.htm>. Acesso em: 22 out. 2003.

SANTOS, V. W. S.; SANTIAGO, L. B.; RODRIGUES, A. S.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Avaliação *in vitro* da sensibilidade de antissépticos e desinfetantes contra a *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UVA, 9, Sobral. **Anais...**, Sobral, 2009.

SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

WILLARD, M. D., TVEDTEN, H., TURNVALD, G. H. **Small animal diagnosis by laboratory methods**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. 377p.

WILLIAMS, C. S. F. Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 75, n. 7, p. 1165- 1169, 1980.

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