

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e
Abastecimento**

Documentos 113

On line

Linfadenite Caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle

*Patrícia Yoshida Faccioli-Martins
Francisco Selmo Fernandes Alves
Raymundo Rizaldo Pinheiro*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145

CEP: 62010-970 - Sobral-CE

Fone: (0xx88) 3112-7400 - Fax: (0xx88) 3112-7455

Home page: <https://www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos>

Sac: <https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Francisco Selmo Fernandes Alves

Secretária-Executiva: Juliana Evangelista da Silva Rocha

Membros: Alexandre César Silva Marinho, Carlos José Mendes Vasconcelos, Diones Oliveira Santos, Maíra Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Tânia Maria Chaves Campelo, Alexandre Weick Uchoa Monteiro e Viviane de Souza (Suplente).

Supervisor editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisor de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo

Editoração eletrônica: Comitê de Publicação

Foto da Capa: Patrícia Yoshida Faccioli-Martins

Fotos anexo II: Maira Vergne Dias

1ª edição on line (2014) - CGPE - 11548

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Caprinos e Ovinos

Faccioli-Martins, Patrícia Yoshida

Linfadenite caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle / por Patrícia Yoshida Faccioli-Martins, Francisco Selmo Fernandes Alves e Raymundo Rizaldo Pinheiro. - Dados eletrônicos. - Sobral : Embrapa Caprinos e Ovinos, 2014.

71 p. il. - (Documentos / Embrapa Caprinos e Ovinos, ISSN 1176-7659 ; 113).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpc.embrapa.br/publicacoes/>>

1. Linfadenite caseosa. 2. Doença animal – Bacteria. 3. Caprino – Doença. 4. Ovino – Doença. I. Alves, Francisco Selmo Fernandes. II. Pinheiro, Raymundo Rizaldo. III. Título. IV. Embrapa Caprinos e Ovinos. V. Série.

CDD 21 ed. 636.39089

Autoria

Patrícia Yoshida Faccioli-Martins

Méd. Vet., Doutora em Medicina Veterinária Preventiva. Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos
Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145
CEP - 62010-970 - Sobral/CE

Fone: (0xx88) 3112-7400

Fax: (0xx88) 3112-7455

E-mail: patricia.yoshida@embrapa.br

Francisco Selmo Fernandes Alves

Méd. Vet., Ph.D. em Patologia Comparada,
Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos,
E-mail: selmo.alves@embrapa.br

Raymundo Rizaldo Pinheiro

Méd. Vet., Doutor em Ciência Animal, Pesquisador
da Embrapa Caprinos e Ovinos
E-mail: rizaldo.pinheiro@embrapa.br

Apresentação

A caprinocultura e ovinocultura são atividades desenvolvidas em diversas regiões do país e do mundo, representados por animais capazes de se adaptar a condições ambientais adversas, inclusive no semiárido brasileiro.

Nesses sistemas de produção um dos fatores que requer atenção nos rebanhos é a sanidade. Dentre as enfermidades infectocontagiosas existentes, a Linfadenite Caseosa é uma das mais antigas, apresentando caráter crônico e debilitante.

Os prejuízos causados pelo tratamento de animais doentes e pelas perdas produtivas são subestimados pela ausência de programas de diagnóstico e controle da enfermidade no país.

Neste contexto, este documento tem como objetivo sistematizar as informações mais atuais disponíveis sobre o diagnóstico, tratamento e controle da linfadenite caseosa, além de propor recomendações para a elaboração e implantação de um programa de controle da enfermidade.

Que essas informações possam ser difundidas para atingir o maior número de pessoas que atuam nessas cadeias, de forma a melhorar a

saúde dos rebanhos tanto pela ação direta do produtor como por meio de incentivos ao desenvolvimento de políticas públicas para o setor.

Evandro Vasconcelos Holanda Jr.
Chefe Geral Embrapa Caprinos e Ovinos

Sumário

Introdução	09
A Linfadenite Caseosa e sua origem	10
Distribuição geográfica	11
Impacto econômico no Brasil	12
Potencial zoonótico	15
Testes diagnósticos	15
Direto	16
Indireto	18
Insumos	18
Vacinas	20
Tratamentos	24
Avanços no conhecimento	26
Programas de controle	27
Recomendações finais	34
Referências	35
Anexo I	55
Anexo II	68

Linfadenite Caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle

*Patrícia Yoshida Faccioli-Martins
Francisco Selmo Fernandes Alves
Raymundo Rizaldo Pinheiro*

Introdução

A caprinocultura e a ovinocultura são atividades desenvolvidas em diversas regiões do Brasil, gerando renda tanto para pequenos como grandes produtores. Segundo o IBGE, 92,8% (5166/5565) dos municípios do país registraram a criação dessas espécies. A região Nordeste é a que concentra o maior número de rebanhos, e as enfermidades que atingem esses animais acarretam prejuízos substanciais aos produtores.

Entre as enfermidades impactantes para a cadeia produtiva, podemos destacar a Linfadenite Caseosa (LC). Ela é uma doença infectocontagiosa de caráter crônico e debilitante, reconhecida pela formação de abscessos em glânglios linfáticos superficiais, podendo atingir órgãos e linfonodos internos. Apesar de seu surgimento remoto, ainda assola os rebanhos de caprinos e ovinos ao redor do mundo.

Este trabalho aborda os avanços e perspectivas atuais no diagnóstico, tratamento e controle da LC. São discutidos os estudos realizados até o momento, os testes diagnósticos avaliados e as medidas de prevenção e controle adotadas pelos países produtores de ovinos e caprinos. Finalmente, são propostas recomendações para a elaboração e implantação de um programa de controle da enfermidade no país.

A Linfadenite Caseosa e sua origem

A LC é uma doença crônica debilitante de ovinos e caprinos, causada pela bactéria Gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*. É responsável pela formação de abscessos nos linfonodos superficiais ou internos (frequentemente do mediastino) e órgãos. Dependendo da localização dos abscessos, prejudica a função local (mastigação, amamentação, etc.). É comum a LC disseminar por vários órgãos. Na forma visceral, é uma das causas da síndrome da ovelha magra, levando a prejuízos pela diminuição da produção (WILLIAMSON, 2001).

O micro-organismo foi isolado pela primeira vez, em 1888, de um caso incomum de linfangite em uma vaca, pelo bacteriologista francês Edward Nocard. Alguns anos depois, o bacteriologista búlgaro Hugo von Preisz também identificou uma bactéria similar em um abscesso renal de uma ovelha. A partir daí, o micro-organismo passou a se chamar o bacilo “Preisz – Nocard”, e esse nome vernacular foi usado por décadas. No final do século 19, dois bacteriologistas alemães, Lehmann e Neumann, descreveram a bactéria na primeira edição de seu atlas bacteriológico (LEHMANN; NEUMANN, 1896). Nele, o bacilo foi renomeado para *Bacillus pseudotuberculosis*, que em grego significa falsa tuberculose, relacionando a suposta similaridade clínica das lesões a nódulos de tuberculose micobacteriana (BAIRD; FONTAINE, 2007, p. 182).

Na primeira edição de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, publicada em 1923, o micro-organismo foi incluído no gênero *Corynebacterium*, espécie *ovis*, juntamente ao patógeno humano *C. diphtheriae*, por apresentarem semelhanças na morfologia e composição de parede, levando a mais uma mudança de nome. Ao longo do tempo, a bactéria foi isolada de outras espécies animais (caprinos, equinos e seres humanos) em infecções purulentas e linfangites ulcerativas. Em vista disso, na sexta edição de Bergey's Manual, publicada em 1948, a espécie foi renomeada como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, permanecendo com essa denominação até os

dias atuais. No entanto, em trabalhos da década de 1980, é referenciada como *C. ovis* (BAIRD; FONTAINE, 2007).

Em caprinos e ovinos, a transmissão desse patógeno ocorre em contato animal-animal, com secreções de abscessos supurados e por meio de fômites e do ambiente contaminado, penetrando no indivíduo por meio de lesões de pele (NAIRN; ROBERTSON, 1974), ferimentos na mucosa oral (UNANIAN et al., 1985) e até mesmo por aerossóis, nos casos da linfadenite localizada nos pulmões (CHAPLIN et al., 1999). A partir do local de penetração, a bactéria é levada por macrófagos aos linfonodos locais.

A parede do micro-organismo é recoberta por ácido micólico, uma molécula que apresenta efeitos citotóxicos sobre os fagócitos (CARNE et al., 1965 citado por BAIRD; FONTAINE, 2007, p.), impedindo a sua destruição e permitindo sua sobrevivência como parasita intracelular facultativo (WILLIAMSON, 2001). Além disso, a natureza tóxica dessa molécula contribui para a formação do abscesso. Um fator de virulência do *C. pseudotuberculosis* a ser considerado é a fosfolipase D, que apresenta capacidade de hidrolisar membranas de células eucariotas, favorecendo a invasão microbiana nos tecidos do hospedeiro, e a disseminação para outros locais e órgãos (BATEY, 1986; JOLLY, 1966).

Distribuição geográfica

É uma doença de distribuição mundial, estando relacionada à presença de rebanhos de pequenos ruminantes, sendo diagnosticada na Europa, Oceania, Américas do Sul e do Norte, Ásia, África e o Meio Leste. A infecção tem se estabelecido em países como Brasil, Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido, Canadá e EUA, entre outros, causando forte impacto econômico na caprinocultura, e principalmente na ovinocultura, desencadeado pela redução na produção de lã, carne e leite, além da condenação no frigorífico de carcaças e couro afetados pela doença (BAIRD; FONTAINE, 2007; DORELLA et al., 2009).

No início da década de 1930, a doença era conhecida por afetar extensivamente rebanhos de países exportadores de carne, sugerindo que essa disseminação ao redor do mundo tenha sido decorrente da exportação de ovinos pelos poderes coloniais do século 18.

Sugere-se que a exportação de animais de origem espanhola, da raça Merino, muito valorizada pela dupla aptidão de carne e lã, possa ter contribuído na disseminação da bactéria, primeiro para a África do Sul e depois para Austrália e Américas. Tal teoria é difícil de ser comprovada, mas há evidências pela demonstração de relação genotípica entre isolados de diferentes partes do mundo. Além disso, a ausência de Merino como uma raça comercial nas ilhas britânicas pode ter sido, de alguma forma, uma proteção do país contra a infecção (BAIRD; FONTAINE, 2007).

Na Austrália, em torno de 28% dos rebanhos não vacinados apresentaram LC nas linhas dos abatedouros estudados. Em 1973, essa prevalência chegava a 58% (PATON et al., 2003). Na Nova Zelândia, a doença atingia 30% dos animais adultos na década de 1980 (NUTTAL, 1988). Em um estudo realizado em rebanhos do Egito (AL-GAABARY et al., 2009; AL-GAABARY et al., 2010), 17,32% dos caprinos e ovinos com sinais clínicos de LC foram confirmados por exame bacteriológico. No abatedouro, a frequência foi ainda maior, com 25% dos animais confirmados microbiologicamente (AL-GAABARY et al., 2010).

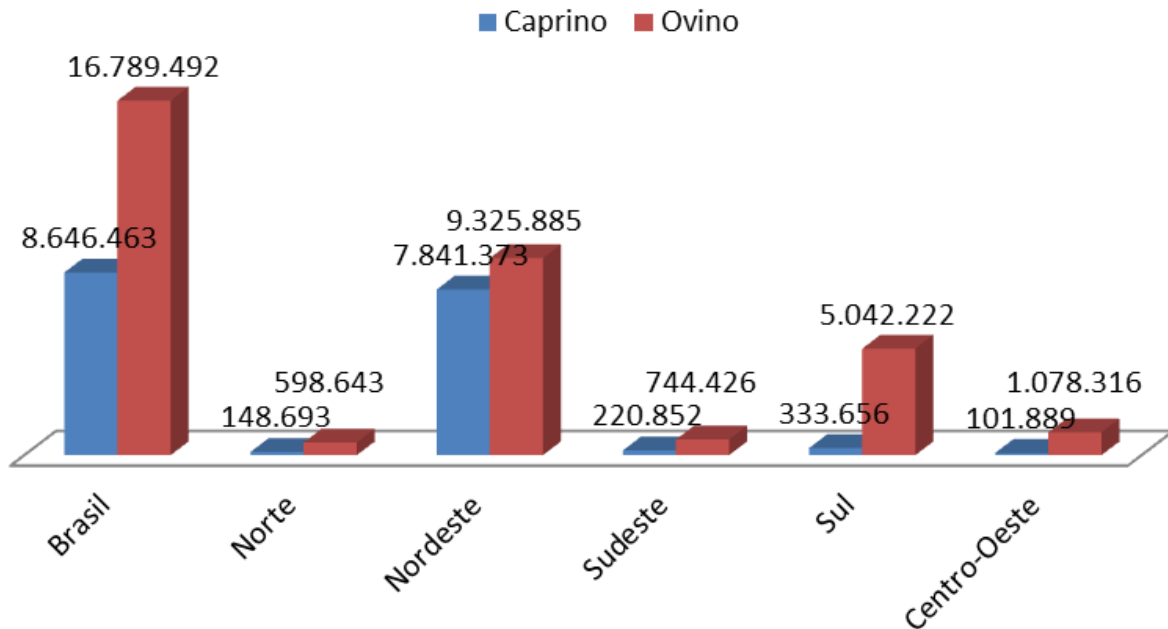
Impacto econômico no Brasil

No Brasil, os rebanhos caprino e ovino atuais são de aproximadamente 8.646.463 e 16.789.492 cabeças, respectivamente. A região Nordeste representa 90,7% dessa população caprina e 55,6% da população ovina (IBGE, 2013), superando as demais regiões brasileiras (Figura 1).

Em estudos realizados no Nordeste, em seis localidades do Estado do Ceará, dos 656 caprinos analisados, 41,65% apresentavam abscessos superficiais palpáveis e 11,5% abscessos nos órgãos internos

Figura 1 - Efetivo dos rebanhos (cabeças), por tipo de rebanho

Brasil e Grande Região - ano de referência 2012



Nota: Efetivos dos rebanhos em 31/12/2012.

Fonte: adaptado de IBGE (2013).

(UNANIAN et al., 1985). Nesse mesmo Estado, Pinheiro et al. (2000) relataram 66,9% de rebanhos caprinos com presença de sinais clínicos de linfadenite caseosa. Na Paraíba, 15,9% dos ovinos tinham lesões similares a LC, sendo que em 74,5% dos abscessos isolou-se *C. pseudotuberculosis* (SOUZA et al., 2011).

Considerando uma propriedade de porte médio (ao redor de 114 animais), com 15% dos animais com abscessos externos com tamanho aproximado de uma laranja, com uma média de 1,2 abscessos por animal, o custo atualizado com o tratamento é ao redor de R\$ 10,06 por abscesso (Tabela 1). Para essa propriedade, o custo anual do tratamento impactaria com aproximadamente de R\$ 205,20, sem contar os prejuízos causados pelas perdas produtivas (redução do peso, problemas reprodutivos, redução no valor do couro) e no descarte de carcaças pela enfermidade e suas lesões, com grande impacto econômico e social dessa enfermidade para a pecuária regional.

Tabela 1. Custo aproximado* do tratamento de um abscesso externo.

Produto	Preço Unitário	Quant. Utilizada	Custo por abscesso (por 5 dias)
Detergente líquido (500 ml)	R\$ 1,00	50 mL	R\$ 0,10
Lâmina de barbear (caixa)	R\$ 4,40	1 unidade	R\$ 0,88
Tintura de iodo 10% (1 L)	R\$ 60,00	75 mL	R\$ 4,50
Gaze (pacote)	R\$ 2,00	1,5 pacote	R\$ 3,00
Álcool etílico 70% (1 L)	R\$ 5,00	50 mL	R\$ 0,25
Mata bicheira (500 ml)	R\$ 4,00	50 mL	R\$ 1,33
		Total	R\$ 10,06

* Levantamento de preço de mercado em abril/2014.

Adicionalmente, levando em conta um levantamento realizado em 130 propriedades no Estado do Ceará, em que 67% dos criatórios caprinos relataram problemas com a LC, e extrapolando essa porcentagem sobre o rebanho caprino nordestino, tem-se um total de 5.253.720 animais provenientes de rebanhos nordestinos com problema. Estimando-se que 15% estejam com abscessos, haverá média de 788.058 custando à cadeia produtiva de caprinos aproximadamente 7,9 milhões de reais. Quanto à população ovina nordestina, esta é 16% superior à população caprina, e visto que a presença da enfermidade é semelhante, pode-se extrapolar como custo de tratamento de abscessos em ovinos aproximadamente 9,1 milhões de reais para a região Nordeste.

No Rio Grande do Sul, apesar de a prevalência de LC nas carcaças ser de apenas 0,037% e a condenação total ser de 0,009% no período de 2004 a 2009, o prejuízo calculado no período foi de aproximadamente R\$ 12.975,27 (MACHADO et al., 2011).

No Estado do Rio de Janeiro, a prevalência da enfermidade variou entre 3,6% e 100% dos rebanhos (LANGENEGGER et al., 1991).

Em trabalhos recentes no Estado de Minas Gerais, a prevalência estimada de infecção nas ovelhas variou de 70,9 a 78,9% e a

prevalência de rebanhos infectados de 95,9 a 98% (GUIMARÃES et al., 2009; SEYFFERT et al., 2010).

A dificuldade no controle dessa enfermidade se justifica por *C. pseudotuberculosis* permanecer no hospedeiro cronicamente, evadindo-se eficientemente do sistema imune, e raramente causando morte do animal. Além disso, é capaz de permanecer no meio ambiente por longos períodos, podendo se disseminar silenciosamente nos rebanhos. Esses fatores contribuem para que as medidas de controle adotadas sejam incipientes. Nos rebanhos infectados, as medidas, como drenagem dos abscessos e vacinação, contribuem apenas para reduzir os níveis da infecção, e não para a sua erradicação (BAIRD; FONTAINE, 2007).

Potencial zoonótico

C. pseudotuberculosis é considerada uma zoonose emergente, relacionada principalmente a pessoas que têm contato com animais infectados e a produtos lácteos contaminados. No período de 1966 a 2008 foram relatados aproximadamente 30 casos humanos, nos quais a enfermidade se apresenta como linfadenopatia supurativa crônica. Além disso, essa espécie é capaz de receber um gene adicional, relacionado à toxina de difteria, provindo de outras corinebactérias, sendo um importante fator de virulência investigado e notificado às agências de controle da Europa - entre elas a OMS (BASTOS et al., 2012). Um caso de endocardite por *C. pseudotuberculosis* produtor da toxina de difteria foi relatado em um usuário de drogas injetáveis ilícitas (WAGNER et al., 2010).

Testes diagnósticos

Muitos testes foram desenvolvidos buscando um diagnóstico confiável para a LC ao longo de décadas. Ainda assim, há pouquíssimos testes comerciais disponíveis no mundo, não se sabendo a verdadeira prevalência da doença nos rebanhos (BINNS et al., 2007).

A maioria deles foi elaborada para detectar a resposta imune à exotoxina, outros foram extrapolados de testes já existentes para outras enfermidades bacterianas similares.

No Brasil, além da disponibilização dos testes, é necessária a ampliação da rede de laboratórios credenciados, que havendo a demanda de diagnósticos dessa enfermidade pelos órgãos competentes, gera interesse na estruturação dos laboratórios e técnicos para a oferta desses testes.

A seguir são apresentados os principais testes diagnósticos já desenvolvidos até o momento. Neste documento eles estão classificados em dois grupos: testes diretos e indiretos. O teste direto permite a identificação do agente etiológico da enfermidade, *C. pseudotuberculosis*, ou de seus componentes celulares e secretados (material genético, toxinas). Já o teste indireto permite a detecção dos anticorpos produzidos pelo animal frente à infecção pelo micro-organismo, indicando indiretamente a presença do patógeno.

Direto Isolamento e identificação

É o método confirmatório tradicional e padrão-ouro na diferenciação de abscessos causados por *C. pseudotuberculosis* de outros agentes como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros (AL-HARBI, 2011; BAIRD; FONTAINE, 2007). Consiste do cultivo da amostra clínica – pus coletado por aspiração, drenagem ou suabe – em meio enriquecido, como agar sangue, e incubado a 37°C por 72 horas. Colônias secas e quebradiças de coloração branca a amarelada começarão a ser visualizadas entre 24 e 48 horas, com a presença de hemólise (QUINN et al., 1994).

Esfregaços do crescimento em lâmina podem ser corados por Gram com a observação de cocobacilos Gram-positivos em arranjos de “letras chinesas”, ou por Giemsa com a visualização adicional das

células do hospedeiro presentes no material. Normalmente esse isolamento é realizado de material fresco, entretanto, Sutherland et al. (1987) determinaram a viabilidade de utilizar pus armazenado por 14 dias a -20°C em comparação ao pus fresco, demonstrando que o congelamento não destrói o micro-organismo e mantém o material infectante.

Detecção e quantificação da fosfolipase D

A partir da bactéria isolada, é possível determinar a presença e quantidade da exotoxina (fosfolipase D) produzida por duas técnicas. A primeira é através da titulação de hemólise da fosfolipase, realizada a partir do sobrenadante, diluído em tubos de vidro com tampão fosfato citrato salina pH 5,5, adicionado de suspensão em salina de hemácia de ovelha a 5%. A leitura é realizada após 24h de incubação a 37°C . O título considerado é a diluição mais alta em que houve hemólise completa. A segunda técnica é por meio de injeção intradermal em coelho de diluições seriadas do sobrenadante e observação após 48h. A reação observada é a formação de placa dermal palpável com um centro inflamado escurecido, recoberto por um fino exsudato branco (BURRELL et al. 1980b).

A presença da exotoxina de *C. pseudotuberculosis* também pode ser detectada pela hemólise sinérgica (HS), observada em hemácias previamente tratadas com sobrenadante de cultura de *Rhodococcus equi* (antigo *Corynebacterium equi*). Um amplo halo de hemólise é formado pela interação da fosfolipase D de *C. pseudotuberculosis* com a fosfolipase C de *R. equi* (FRASER, 1961; KNIGHT, 1978).

PCR

Com o advento e disseminação das técnicas biomoleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se tornado uma ferramenta acessível a diversos laboratórios de rotina e pesquisa. Alguns autores têm desenvolvido *primers* específicos para *C. pseudotuberculosis* que podem ser utilizados na confirmação da espécie por PCR (ÇETINKAYA et al., 2002; KUMAR et al., 2013; PACHECO et al., 2007; TORRES et al.,

2013). No estudo de Torres et al. (2013) foi feita a padronização de PCR multiplex para identificação e determinação da toxigenicidade de *C. pseudotuberculosis* e outras espécies do gênero. Pacheco et al. (2007) padronizaram a multiplex PCR para identificação rápida de *C. pseudotuberculosis* em amostras clínicas com no mínimo 10^3 unidades formadoras de colônias por mililitro.

Indireto

Vários testes sorológicos têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, alguns são aprimoramentos dos já existentes, outros são baseados em novos conhecimentos. Neste item serão citados os mais utilizados e no Anexo I serão dados maiores detalhes de cada metodologia.

Os primeiros testes indiretos a serem utilizados foram os testes alérgicos ou de hipersensibilidade, realizados individualmente para determinação de animais infectados, porém com especificidade ainda limitada. Na sequência, testes sorológicos foram desenvolvidos, que têm apresentado a cada estudo uma melhora de sensibilidade e especificidade, e que possibilitam um maior número de animais avaliados e em menor tempo. Entre esses testes avaliados, destaca-se o ELISA (*enzyme enzyme linked immuno sorbent assay*) que apresenta sensibilidade e especificidade adequadas, mas variantes de acordo com o tipo de antígeno e combinação de conjugados. Os poucos kits comerciais disponíveis para diagnóstico da linfadenite caseosa são baseados em ELISA.

Outras variações de testes e associações entre testes diretos e indiretos podem ser observadas no Anexo I.

Insumos

Até aqui, demonstramos a importância da LC nos rebanhos caprinos e ovinos de todo o mundo, e levantamos as metodologias desenvolvidas até o momento para o diagnóstico desta enfermidade. Para que esse conhecimento enfim chegue ao produtor, e permita o controle e a prevenção da LC, é preciso que um longo caminho seja percorrido.

Nesse trajeto, é fundamental a estruturação de instituições, públicas ou privadas, que sejam capazes de suprir a demanda de insumos e de diagnóstico necessários para esse controle em nível nacional e que acompanhem a demanda das propriedades. Essa demanda será presente se políticas públicas e o mercado apresentarem um retorno positivo, ou seja, incentivarem o produtor a implementar um programa de controle, com custo acessível, e gerando renda direta ou indireta pela maior produtividade dos animais.

Para a produção dos antígenos de kits e vacinas, as cepas bacterianas de referência poderão ser obtidas das bacteriotecas dos centros de estudos em LC (nas Universidades, como na Universidade Federal da Bahia e na Universidade Federal de Minas Gerais, em Institutos, como por exemplo, o Instituto de Biologia Molecular do Paraná). A partir desses isolados, a toxina bruta é passível de ser produzida, sendo utilizada nos testes parcial ou totalmente purificada. Já existem laboratórios de pesquisa que seriam capazes de produzir a fosfolipase D purificada e em larga escala por meio de clonagem do gene *pld* (DE ROSE et al., 2002; HODGSON et al., 1990).

As bacterinas poderiam ser produzidas facilmente, com padronização do protocolo e controle de qualidade para uniformização dos lotes. O controle deve ser feito para os testes sorológicos, determinando-se os laboratórios de referência que atestem periodicamente os resultados emitidos pelos laboratórios credenciados.

Bibliotecas genômicas e kits comerciais podem ser desenvolvidos em parceria com empresas públicas e privadas. Até o momento não existem no Brasil testes comerciais para linfadenite caseosa.

Quanto às vacinas, no Brasil existem três produtos licenciados pela indústria para uso em ovinos e caprinos, discutidos a seguir, que garantem proteção vacinal significativa, mas não têm sido usadas amplamente nos rebanhos. Mais estudos são necessários para verificar a eficácia a campo dessas vacinas em longo prazo, calculando os

benefícios monetários da vacinação, além da busca pelo desenvolvimento de imunógenos mais eficientes e com resposta duradoura.

Os insumos necessários para a implementação de um Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos são possíveis de serem obtidos, mas será necessário o esforço conjunto e de parcerias no sentido de disponibilizá-los com qualidade e quantidade exigidas para um alcance nacional.

Vacinas

O desenvolvimento de vacinas para o controle de enfermidades é um grande desafio. A resposta imune a uma vacina na população é influenciada por muitos fatores: o tipo de vacina utilizada, a dose, o número e intervalo de vacinações, as peculiaridades do antígeno, a bagagem genética do indivíduo e a rota de imunização (De Rose et al., 2002)

A primeira vacina contra a LC foi testada nos anos 60, preparada a partir de uma cultura formalizada de *C. pseudotuberculosis* em adjuvante de alumínio (EGGLETON et al., 1991). Apresentou redução de apenas 60% da infecção, contra 83% de imunoproteção da vacina viva atenuada produzida da cepa 1002 (RIBEIRO et al., 1991). A partir dela, a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) lançou sua vacina atenuada em 2000.

Diversas composições de vacinas têm sido testadas, desde vacina viva atenuada (RIBEIRO et al., 1991; SIMMONS et al., 1997), vacina inativada (CAMERON et al., 1969; FONTAINE et al., 2006), toxoide (ALVES; OLANDER, 1998), associações entre bacterinas e toxoide até vacinas de DNA (CHAPLIN et al., 1999; DE ROSE et al., 2002) e peptídeos (COELHO et al., 2009).

Com a vacina de toxoide, Alves e Olander (1998) imunizaram caprinos da raça Parda Alpina provenientes de rebanho da Universidade da Califórnia, e conseguiram reduzir a multiplicação e propagação do micro-organismo do local da infecção para outras partes do corpo do animal, reduzindo a extensão da doença. Além disso, 3/10 (30%) dos animais vacinados e 1/5 (20%) dos animais controle não apresentaram

abscessos, sugerindo uma tendência de proteção contra a infecção.

Em continuidade aos testes de eficácia de vacinas baseadas em toxoides, bacterinas e cepas atenuadas, foram testadas vacinas de DNA. Esse tipo vacinal introduz, por meio de um plasmídeo, ácido nucleico (DNA) codificante para um antígeno específico dentro de uma célula viva do hospedeiro, resultando na ativação contra o imunógeno entregue pelo gene. Ele é bem mais vantajoso quando comparado aos efeitos indesejáveis da introdução de patógenos ou proteínas recombinantes, destacando-se como pontos positivos: a ausência de risco de infecção; a indução de resposta imune de longa-duração; o estímulo à imunidade mediada celular e humoral; a facilidade do uso de vacinas polivalentes; boa estabilidade a altas e baixas temperaturas, resposta de células T citolíticas aumentada; fácil preparação e purificação, e baixo custo (OLIVEIRA et al., 1999).

Chaplin et al. (1999) testaram uma vacina de DNA em ovelhas com o gene da fosfolipase D recombinante (inativa), apresentando o antígeno como alvo da proteína CTLA-4, e obtiveram um aumento na eficiência da vacina, com maior proteção e longevidade da resposta imune. Nessa mesma linha de estudo, De Rose et al. (2002) avaliaram a eficácia dessa vacina por diferentes rotas de imunização, obtendo melhor resposta por administração intramuscular.

Coelho et al. (2009) avaliaram a imunogenicidade de duas proteínas (Hsp65 e Hsp60) de *C. pseudotuberculosis* pela vacinação de proteína purificada e DNA em camundongos. Tanto as vacinas de proteína quanto de DNA falharam na proteção dos animais, levando-os à morte, após o desafio com cepa virulenta, provavelmente por uma resposta imune ineficiente e não protetora contra a infecção.

Na tabela 2, estão apresentadas as vacinas comerciais disponíveis contra a linfadenite caseosa.

Tabela 2. Vacinas contra a Linfadenite Caseosa disponíveis no mercado nacional e internacional.

Nome comercial	Componentes	Uso licenciado	País	Fabricante	Validade	Revacinação
Glanvac 3 [®]	Toxóide de CP associado a toxóides de dois clostrídeos	Caprinos e ovinos	África do Sul	Zoetis	-	Anual
Glanvac [®] 6	Toxóide de CP associado a toxóides e bacterinas de cinco clostrídeos	Ovinos	Nova Zelândia	Zoetis	-	Anual
Glanvac [®] 3 B12	Toxóide de CP associado a toxóide de dois clostrídeos e vitamina B12	Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Glanvac [®] 3 Vaccine (for goats)	Toxóide de CP associado a toxóides de dois clostrídeos	Caprinos e ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Glanvac [®] 3S B12	Toxóide de CP associado a toxóides de dois clostrídeos, selênio e vitamina B12	Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual

Nome Comercial	Componetes	Uso licenciado	País	Fabricante	Validade	Ravacinação
Glanvac® 6 (for goats)	Toxóide de CP associado a toxóides e bacterinas de cinco clostrídeos	Caprinos e ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Glanvac® 6S	Toxóide de CP associado a toxóides e bacterinas de cinco clostrídeos e selênio	Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Glanvac® 6 B12	Toxóide de CP associado a toxóides e bacterinas de cinco clostrídeos e vitamina B12	Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Case-Bac®	Bacterina e toxóide de CP	Ovinos	EUA, Canadá	Colorado Serum Company	-	Anual
Caseus D-T®	Bacterina e toxóide de CP associado a toxóides de dois clostrídeos	Ovinos	EUA, Canadá	Colorado Serum Company	-	Anual

Nome Comercial	Componetes	Uso licenciado	País	Fabricante	Validade	Ravacinação
Glanvac [®] 6	Toxóide de CP associado a toxóide e bacterinas de cinco clostrídeos	Caprinos e Ovinos	Brasil	Zoetis	-	Anual
LinfoVac [®]	Bactérias vivas atenuadas	Caprinos e Ovinos	Brasil	Laboratório Vencofarma do Brasil	12 meses	Anual
Vacina 1002 [®]	Bactérias vivas atenuadas	Caprinos e Ovinos	Brasil	Labovet Produtos Veterinários	3 meses	Anual

CP = *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Tratamentos

Um abscesso contém aproximadamente 5×10^7 células viáveis de *C. pseudotuberculosis* por grama de material infeccioso purulento (AUGUSTINE et al., 1982). Deve-se, portanto, impedir que os animais tenham acesso a esse conteúdo, seja diretamente pelo contato com outros animais, ou ainda, por meio de fômites. Esse micro-organismo é muito resistente às adversidades ambientais, nas fezes permanece viável por 10 dias a 37°C, em palha por 19 dias, em feno por nove dias, em madeira 19 dias (AUGUSTINE; RENSHAW, 1982) Salienta-se, portanto, a importância do tratamento do animal e descarte correto do material contaminado para diminuir a disseminação da doença no rebanho.

Os abscessos superficiais muito desenvolvidos devem ser drenados, evitando-se a sua ruptura dos no ambiente. Recomenda-se inspeção frequente dos rebanhos, identificando por palpação os linfonodos alterados e procedendo-se à separação dos animais com lesão para uma área de isolamento.

O processo de drenagem e antissepsia do abscesso deve ser seguido de rigorosa desinfecção do local onde foi realizado, recolhendo-se todo o material contaminado, destruindo-o completamente com fogo e enterrando-o. A ferida deve ser limpa periodicamente com solução iodada a 10% ou solução aquosa de clorexidina. O animal deve permanecer isolado até a completa cicatrização do corte. Além disso, os utensílios da área onde os animais foram isolados como cochos, bebedouros, cordas, entre outros, não devem ser compartilhados com os animais sadios. Evitar a introdução de animais sadios na área utilizada para tratamento dos abscessos, a menos que seja desinfetada previamente. É recomendado que animais que apresentam reincidivas sejam sacrificados e suas carcaças incineradas¹ (WINDSOR, 2011).

Pode ser tentada a retirada cirúrgica e completa do linfonodo afetado, mas muitas vezes há ruptura durante o procedimento, ou o tamanho e

¹As imagens contendo os procedimentos e técnicas, encontram-se no anexo 2 deste documento.

aderência do abscesso dificultam a retirada, além da necessidade de anestésiar o animal (NOZAKI et al., 2000). Esse procedimento é indicado para animais de alto valor zootécnico (DAVIS, 1990).

A aplicação de formol a 10% no interior de abscessos com o objetivo de destruir *C. pseudotuberculosis* deve ser evitada. Essa medida tem ação apenas local, não sendo considerada com medida terapêutica, por não evitar a sua ruptura (como tem sido divulgado), causar dor local intensa no animal, além do custo/benefício ser baixo, havendo ainda risco de efeito cumulativo de resíduos químicos na carne e leite dos animais destinados ao consumo humano, sendo uma substância sabidamente carcinogênica e com potencial mutagênico e teratogênico para os seres humanos (ALVES; PINHEIRO, 2003).

Na busca de antissépticos alternativos, foram realizados testes para avaliar o efeito *in vitro* de tintura de iodo a 10%, hipoclorito a 2,5%, permanganato de potássio a 5%, sabonete líquido antisséptico Aseptol® (a base de timol e resorcinol) e álcool etílico absoluto (99,8%) sobre o micro-organismo por disco-difusão. O produto com maior poder bactericida contra *C. pseudotuberculosis* foi a tintura de iodo a 10%, seguida pelo hipoclorito a 2,5% e o permanganato de potássio a 5% (SANTIAGO et al., 2010). Com esses resultados, os mesmos autores testaram *in vivo* a aplicação no interior do linfonodo de tintura de iodo a 10% e hipoclorito de sódio a 2,5%. Infelizmente, esses tratamentos foram ineficazes no estágio inicial de desenvolvimento do abscesso avaliado (com aumento de volume e sem a presença de alopecia local), causando a sua posterior ruptura (SANTIAGO et al., 2013).

Quanto ao uso de antimicrobianos no tratamento de abscessos, a escolha deve ser racional. Apesar do micro-organismo *in vitro* ser sensível a vários antimicrobianos, os resultados nem sempre são satisfatórios na prática pelas características do abscesso - encapsulado e repleto de material caseoso -, e do micro-organismo - parasita intracelular facultativo, sobrevivendo à fagocitose, se disseminando para locais secundários (WILLIAMSON, 2001). Há influência também

das classes de antimicrobianos, que possuem diferentes estruturas moleculares, favorecendo ou não sua absorção nos fagócitos em níveis bactericidas. Macrolídeos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos e oxazolidinonas apresentam uma localização celular predominante em lisossomos (CARRYN et al., 2003).

Alguns estudos avaliaram o tratamento antimicrobiano na forma parenteral, após a excisão cirúrgica e limpeza do abscesso, pelo período de 4 a 6 semanas, buscando-se reduzir a chance de reincidência. Oxitetraciclina e rifamicina apresentaram certa eficácia, porém os autores não recomendam esse tratamento em animais reincidivantes e reforçam a necessidade de descarte (BAIRD, 2006; SENTURK; TEMIZEL, 2006). Outros autores indicam o uso de penicilina no dia da tosquia associada à desinfecção das feridas e dos instrumentos de tosquia, buscando reduzir casos novos da doença no rebanho durante esse manejo (AL-GAABARY et al., 2009).

Avanço do conhecimento

Para o desenvolvimento de métodos adequados de controle da doença, tem sido necessário um maior conhecimento dos antígenos específicos de *C. pseudotuberculosis* responsáveis pela resposta imune do hospedeiro, tanto pela infecção natural como no pós-vacinal. As ferramentas exigidas para a obtenção e análise dessas informações vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas, visto que o volume de dados gerado é cada vez maior.

O sequenciamento completo do genoma de diversas espécies bacterianas e em um curto espaço de tempo tem sido um grande avanço, inclusive para *C. pseudotuberculosis*. Um exemplo disso é o trabalho de Costa et al. (2011), que a partir do genoma dos isolados sequenciados, elaboraram uma biblioteca randômica de *Phage display* para a identificação e caracterização de peptídeos bioativos com possível elaboração de kits diagnósticos e vacinas para o controle da enfermidade. Infelizmente, os primeiros peptídeos testados não confe-

riram imunidade aos camundongos contra a infecção pela linhagem selvagem. Para Almeida (2011) e Ruiz et al. (2011) existem também outros pontos a serem aprimorados, tais como, via de aplicação da vacina, adjuvantes, dosagens diferentes, outros peptídeos.

Outra ferramenta interessante que tem sido utilizada no desenvolvimento de drogas e vacinas, com base no genoma dos micro-organismos, é a análise genômica comparativa (ALI et al., 2013).

Em um estudo de Barh et al. (2011), os genomas de quatro isolados de *C. pseudotuberculosis* foram sequenciados e avaliados para elucidar a patologia molecular desse patógeno, além de uma análise comparativa de outros oito genomas do grupo *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia* (CMN), inclusive de origem humana. Alguns alvos conservados foram comuns a todos os patógenos testados do grupo CMN, independentemente do hospedeiro de origem do isolado. O alvo determinado como principal foi o caminho da biossíntese de peptidoglicano, seguido pelo sistema de transporte-ABC. Compostos de chumbo foram identificados como candidatos à validação experimental.

Além dos pontos estudados em relação ao micro-organismo, trabalhos também podem ser direcionados com o objetivo de melhorar o acesso dos antimicrobianos nos abscessos. Isso pode ser feito, por exemplo, por meio do desenvolvimento de melhores métodos de entrega da molécula, como as nanopartículas. Estudos promissores com nanotecnologia estão sendo desenvolvidos em humanos para o tratamento antimicrobiano em locais de difícil acesso, como abscessos hepáticos (LAHIANI-SKIBA et al., 2006), e tratamento de feridas, com liberação controlada do medicamento (BOATENG et al., 2013). Essas ferramentas têm potencial para serem extrapoladas para o uso veterinário.

Programas de controle

Os programas de controle da LC baseiam-se em práticas de manejo associadas, com o objetivo de evitar a disseminação da bactéria no

meio ambiente e nos rebanhos. Em países onde a vacinação não está disponível como, por exemplo, no Reino Unido, o controle da doença é baseado na identificação dos animais infectados, visando prevenir o contato deles com os animais sadios. Isso normalmente é realizado pelo teste sorológico seguido do sacrifício dos animais positivos (WINDSOR, 2011).

Com o objetivo de melhorar a eficiência dos programas de controle para LC, a elaboração de manual para consulta dos produtores é recomendado, sendo nele abordadas as práticas de manejo, técnica de drenagem do abcesso e critérios para realização de descarte de animais que apresentam sinais clínicos da doença.

O primeiro passo em um programa de controle é a identificação dos animais com sinais clínicos evidentes da doença, tais como, abscessos nos linfonodos superficiais e emagrecimento, separando-se esses animais dos que não apresentam lesões aparentes. Nos animais sem sinais clínicos evidentes, recomenda-se a realização de testes sorológicos ou testes alérgicos.

Na inexistência de testes que sejam altamente sensíveis e específicos, a realização de duas provas diagnósticas pode ser recomendada. Utilizando-se na triagem uma técnica sensível capaz de detectar todos os animais positivos e falso-positivos. E a partir dos resultados obtidos, deve-se utilizar teste mais específico, reduzindo, assim, o número de animais descartados por inespecificidade do teste de triagem.

Além disso, existem testes sorológicos que não são capazes de diferenciar títulos vacinais e de infecção. Assim, propriedades que adotam como prática a vacinação de seus rebanhos, precisam ser monitoradas com maior rigor, visto que um programa vacinal inadequado se equivale à ausência de vacinação, como será demonstrado a seguir. E sem a diferenciação dos animais, não é possível distinguir animais imunizados pela vacinação dos infectados. Só será possível, a princípio, acompanhar a incidência de casos clínicos.

Por mais de 70 anos os pesquisadores da África do Sul e Austrália têm explorado o uso das vacinas no controle da LC. Vacinas com diversos antígenos têm sido desenvolvidas, mas uma resposta efetiva e duradoura ainda não foi atingida. Mesmo assim, estudos demonstram que a vacinação adequada reduz a prevalência da doença nos rebanhos, devido à menor carga de patógeno no ambiente proveniente dos abscessos rompidos. Um esquema de vacinação que demonstrou bons resultados na Austrália foi a realização de duas doses de vacina na fase de cordeiro e revacinações anuais como reforço (PATON et al., 2003). A prevalência média em rebanhos não vacinados ou vacinados de forma irregular foi ao redor de 30%, e no rebanho com esquema completo 3% (WINDSOR, 2011).

No estudo de Paton et al. (2003) foram avaliados os motivos pelos quais alguns produtores australianos de diferentes estados não aderiram a programas de vacinação contra a LC (Tabela 3), e a prevalência média de LC em rebanhos sem o uso de vacinação, rebanhos com programas de controle de vacinação recomendados e rebanhos com programas de controle não recomendados (Tabela 3).

Tabela 3. Razões para não utilizar vacina no controle da Linfadenite Caseosa em três diferentes estados australianos.

Razões	Percentual de protures nos diferentes Estados (%)			
	NSW	VIC	WA	Geral
Nunca vi LCA neste grupo de ovelhas	17	22	9	17
Vi LCA, mas não acredito que cause perda significativa	14	11	12	13
Custo extra na vacinação com componente para LCA	8	16	0	9
Já uso uma vacina 5-1 para gado	6	2	3	5
A prevalência de LCA é sabidamente baixa de acordo com os dados do abatedouro	2	0	0	1

NSW: New South Wales; VIC: Victoria; WA: Western Australia

Fonte: Adaptado de Paton et al. (2003).

As principais razões apontadas pelos australianos para não usarem uma vacina no controle da LC foram: ausência da doença no rebanho e o pouco prejuízo causado por ela, não justificando o custo gerado pela vacinação. Esse tipo de avaliação é passível de ser realizada nos rebanhos brasileiros, por meio de questionários, visando determinar a percepção do produtor sobre a presença da doença e o prejuízo causado em seus animais. A partir das informações obtidas, será possível desenvolver estratégias para uma maior participação e constância dos produtores nos programas de controle e vacinação.

Na tabela 4, é possível observar o efeito da vacinação recomendada na prevalência média de LC nos rebanhos.

Tabela 4. Prevalência média de LC em rebanhos sem uso de programas de vacinação, com programas de vacinação não recomendados e com programas de vacinação não recomendados.

<i>Estado</i>	<i>Nº de rebanhos</i>	<i>Prevalência média de LC (%)</i>			
		<i>Nos rebanhos em geral</i>	<i>Nos rebanhos sem programas de vacinação para LC</i>	<i>Rebanhos com programas de vacinação não recomendados</i>	<i>Rebanhos com programas de vacinação para LC recomendados</i>
WA	34	20	24	22	1
NSW	144	29	32	31	4
VIC	45	23	22	23	5
Geral	-	26	29	28	3

WA - Western Australia; NSW - New South Wales; VIC -Victoria.

Fonte: Adaptado de Paton et al. (2003).

Nesse mesmo estudo, também foi avaliada a prevalência média de LC em rebanhos nos quais diferentes programas de controle vacinal foram utilizados (Tabela 5).

Tabela 5. Prevalência média de LC em ovelhas submetidas a diferentes programas de vacinação para a doença.

Programa de vacinação	Prevalência média de LC (%)
Ovelhas não recebem qualquer vacinação para LC	29
Ovelhas recebem uma dose quando cordeiros sem revacinações	31
Ovelhas recebem duas doses quando cordeiros sem revacinações	22
Ovelhas recebem uma dose quando cordeiros com revacinações	33
Ovelhas recebem duas doses quando cordeiros com revacinações	3

Fonte: Adaptado de Paton et al. (2003).

Observa-se neste estudo, que o sucesso da vacinação recomendada na Austrália é a aplicação de duas doses no cordeiro e a associação com revacinações anuais, que garantem a expressiva queda de 29% para 3%.

Sabe-se que as vacinas desenvolvidas até o momento ainda não conferem uma imunidade satisfatória, no entanto este estudo demonstrou que a vacinação australiana, baseada principalmente em vacina de toxoide, é capaz de reduzir drasticamente a prevalência da doença.

Em rebanhos com índice de infecção elevado, uma das medidas de controle que podem ser indicadas é o tratamento ou sacrifício. O descarte por sacrifício do animal constitui-se em uma medida de controle que poderá minimizar os índices de ocorrência da doença, por meio da substituição gradativa de animais problemas por animais sadios. Entretanto, no Brasil não existem incentivos para reduzir os prejuízos causados ao produtor decorrentes dessa prática. Esse tipo de ação associada às outras medidas de controle pode ter um efeito favorável a médio e longo prazo.

O'Reilly et al. (2010) elaboraram um modelo matemático aferindo o impacto da vacinação, do teste sorológico, do exame clínico e da limpeza dos abscessos sobre o controle da LC em rebanhos ovinos. Segundo esse modelo, a limpeza dos abscessos reduziu a prevalência de infecção quando esta era de <60%, mas a eliminação foi improvável. Uma eficácia de vacina de 79% ou mais levou à eliminação da infecção do rebanho, considerando uma prevalência endêmica de infecção <60%. Uma combinação de vacinação e exame clínico (este realizado em 5 repetições) reduziram a prevalência da infecção a uma taxa mais rápida do que usando um deles isoladamente. O teste sorológico levou à eliminação da infecção depois de cinco testes, mas estava altamente dependente da sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico e opções de manejo utilizadas: um teste com 90% de sensibilidade sempre resultou em eliminação. Um suposto teste com especificidade maior que 90% preveniu a remoção de muitas ovelhas falso-positivas e conseqüentemente preveniu o prejuízo na produção de cordeiros. A eliminação foi mais provável usando um teste sorológico com sensibilidade e especificidade >90%, mas pela vacinação combinada com exame clínico há redução da infecção rapidamente com pequeno impacto na produtividade de cordeiros. Os autores sugerem que mais pesquisas precisam ser feitas para desenvolver um teste diagnóstico com pelo menos 90% de sensibilidade e especificidade, sob condições de campo, antes que quaisquer medidas de controle possam ser recomendadas com confiança.

Outras medidas alternativas de controle foram avaliadas na Árabia Saudita e podem ser analisadas com cautela e adaptadas para a realidade do Brasil. Mahmoud et al. (2009) estudaram o efeito do zinco e da vacina contra LC em um experimento com quatro grupos: grupo 1 – aplicação de zinco, grupo 2 – aplicação de vacina e zinco, grupo 3 – aplicação de vacina, e grupo 4 – controle. A infecção foi precoce no grupo controle (4 semanas pós-introdução dos animais infectados), seguida pelo grupo tratado somente com zinco (16^a semana), somente com vacina (19^a semana) e por fim na 37^a semana no grupo tratado com vacina e zinco.

Tendo em vista os resultados do estudo acima, Alharbi (2011) avaliaram o controle da LC por meio de administração concomitante de vacina (Glanvac-6), injeção de zinco e lavagem com antisséptico, com reaplicação do tratamento após 1 mês. Após o tratamento, foi feita a adição de cinco carneiros infectados em cada grupo de ovelhas. Durante o tempo de observação (12 meses), 10% das ovelhas do grupo 1 (tratado) e 40% do grupo 2 (controle) desenvolveram abscessos na cabeça. O início do aparecimento das lesões nas ovelhas tratadas foi mais tardio (10º mês de experimento) em comparação ao grupo controle (1º mês). Os autores associaram as três medidas, tendo como objetivos aumentar a imunidade dos animais pela vacinação, impulsionar a imunidade geral da ovelha pela injeção de zinco, e destruir a bactéria no ambiente, lavando o animal com antisséptico (cloroxileno 4,8% diluído 1:100 em água). Entretanto, antes da adoção dessas medidas, deve-se avaliar a sua viabilidade, considerando o custo operacional envolvido e o resultado esperado.

A contaminação ambiental também deve ser observada atentamente. Os cochos podem ser uma importante fonte de transmissão por fômite, visto que a bactéria pode sobreviver de semanas a meses sobre algumas superfícies. Uma ferramenta de controle eficiente seria o uso de cochos com um formato que não exija que a ovelha passe a cabeça por obstáculos. Isso poderá reduzir a chance de rompimento de abscessos e contaminação do alimento (WINDSOR, 2011).

Equipamentos de tosquia e acessórios devem ser rotineiramente limpos e desinfetados antes do uso, particularmente se foi usado anteriormente em rebanho com LC. Os acessórios incluem roupas, bolsas para a lã, sapatos, entre outros itens utilizados pelo tosquiador. É aconselhável que o rebanho tenha seu próprio material de tosquia, e adotadas todas as medidas com o objetivo de reduzir as fontes ambientais de contaminação (WINDSOR, 2011).

Outra atividade de manejo que pode favorecer a disseminação da doença é o banho contra piolhos. Segundo observado por Panton et al. (2003), os rebanhos que não realizavam esse controle tiveram uma

prevalência bem menor de LC. Sugere-se que esse resultado esteja relacionado ao maior contato durante o banho dos animais recém-tosquiados. Como a tosquia é uma das maiores causas de rompimento de abscessos, o banho na sequência a ela favorece a transmissão da bactéria dos animais infectados para os sadios.

Recomendações finais

De acordo com todo o contexto levantado, são resumidas abaixo as ações recomendadas para o suporte do produtor na implementação do programa de controle e prevenção da Linfadenite caseosa:

- 1 Elaboração de guia e/ou cartilha sobre linfadenite caseosa para produtores e técnicos: instruções de limpeza e cura de abscessos, esquema recomendado de vacinação, cuidados na tosquia e redução de contaminação ambiental.
- 2 Conscientização, sensibilização, treinamento e qualificação dos técnicos e produtores - baseado nos motivos identificados no estudo para o insucesso do controle da doença
- 3 Avaliação dos testes de triagem e confirmatório a serem utilizados no diagnóstico da enfermidade.
- 4 Credenciamento e validação de laboratórios veterinários para realização dos testes.
- 5 Credenciamento e treinamento de médicos veterinários para realização do exame clínico e coleta de sangue para exame sorológico.
- 6 Realização de vacinação em unidades de referência técnica e propriedades-piloto para avaliar o teste diagnóstico que diferencie título vacinal de infecção.
- 7 Inclusão do teste diagnóstico selecionado no controle de trânsito dos animais.

Referências

AL-GAABARY, M. H.; OSMAN, S. A.; AHMED, M. S.; OREIBY, A. F. Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 94, n. 1/3, p. 117-124, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448810002129>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

AL-GAABARY, M. H.; OSMAN, S. A.; OREIBY, A. F. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 87, n. 1/3, p. 116-121, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448809002156>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

AL-HARBI, K. B. Prevalence and etiology of abscess disease of sheep and goats at Qassim Region, Saudi Arabia. **Veterinary World**, Rajkot, v. 4, n. 11, p. 495-499, 2011. Disponível em: <<http://www.scopemed.org/?mno=11060>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

ALHARBI, K. B. A. Control of abscess disease of sheep by concurrent vaccination, zinc injection and antiseptic washing. **Research Journal of Veterinary Sciences**, New York, v. 4, n. 1, p. 9-13, 2011. DOI: 10.3923/rjvs.2011.9.13.

ALI, A.; SOARES, S. C.; BARBOSA, E.; SANTOS, A. R.; BARH, D.; BAKHTIAR, S. M.; HASSAN, S. S.; USSERY, D. W.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Microbial comparative genomics: an overview of tools and insights into the genus *Corynebacterium*. **Journal of Bacteriology and Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 1000167, 2013. DOI:10.4172/2155-9597.1000167.

ALMEIDA, S. S. **Identificação e caracterização de peptídeos bioativos através de Phage display usando genoma completo de *Corynebacterium pseudotuberculosis***, 2011. 198 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. J. Teste de pele em caprinos vacinados e infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 7, p. 1313-1318, 1999. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/45603/1/Pab97-078.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

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

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. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/53851/1/NT-Control-da-linfadenite.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2014.

AUGUSTINE, J. L.; RENSHAW, H. W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* on common barnyard fomites. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., 1982, Tucson, Arizona. **Proceedings...** Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p. 525.

AUGUSTINE, J. L.; RICHARDS, A. B.; RENSHAW, H. W. Concentration of *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtained from lesions of sheep and goats with caseous lymphadenitis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., 1982, Tucson, Arizona. **Proceedings...** Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p. 525.

AWAD, F. I. Serological investigation of pseudotuberculosis in sheep. I. Agglutination test. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 21, p. 251-253, 1960.

AWAD, F. I.; EL-MOLLA, A. A.; SHAWKAT, H. E. A.; ARAB, R. M. Studies on the diagnosis of caseous lymphadenitis of sheep and goats by the agar gel precipitation test. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 14, n. 1, p. 21-24, 1977.

BAIRD, G. J. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. **Veterinary Record**, London, v. 159, n. 15, p. 500, 2006. DOI: 10.1136/vr.159.15.500.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. Corynebacterium pseudotuberculosis and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 137, n. 4, p. 179-210, Nov. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826790>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BARH, D.; JAIN, N.; TIWARI, S.; PARIDA, B. P.; D'AFONSECA, V.; LI, L.; ALI, A.; SANTOS, A. R.; GUIMARÃES, L. C.; SOARES, S. C.; MIYOSHI, A.; BHATTACHARJEE, A.; MISRA, A. N.; SILVA, A.; KUMAR, A.; AZEVEDO, V. A novel comparative genomics analysis for common drug and vaccine targets in Corynebacterium pseudotuberculosis and other CMN group of human pathogens. **Chemical Biology & Drug Design**, Oxford, v. 78, n. 1, p. 73-84, 2011.

BASTOS, B. L.; PORTELA, R. W. D.; DORELLA, F. A.; RIBEIRO, D.; SEYFFERT, N.; CASTRO, T. L. P.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; AZEVEDO, V. Corynebacterium pseudotuberculosis: immunological responses in animal models and zoonotic potential. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, S4:005, 2012.

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

BINNS, S. H.; GREEN, L. E.; BAILEY, M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to Corynebacterium pseudotuberculosis in ovine sera. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 123, n. 1/3, p. 169-179, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113507000752>>. Acesso em: 15 out. 2013.

BOATENG, J. S.; PAWAR, H. V.; TETTEH, J. Polyox and carrageenan based composite film dressing containing anti-microbial and anti-

inflammatory drugs for effective wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 441, n. 1/2, p. 181-191, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517312010526>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; BIBERSTEIN, E. L.; MORENO, D. Serologic response and lesions in goats experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* of caprine and equine origins. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 11, p. 2322-2326, 1985.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ZOMETTA, C.; ALVES, S. F. Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 47, n. 7, p. 1461-1463, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255272/pdf/cjvetres00057-0048.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BURRELL, D. H. A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. **Research in Veterinary Science**, London, v. 28, n. 2, p. 190-419, 1980a.

BURRELL, D. H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. **Research in Veterinary Science**, London, v. 28, n. 2, p. 234-237, 1980b.

CAMERON, H. S.; McOMIE, W. A. The agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, NY, v. 30, p. 41-46, 1940.

CAMERON, C. M.; MINNAR, J. L.; ENGELBRECHT, M. M.; PURDOM, M. R. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 39, n. 1, p. 11-24, 1972.

CAMERON, C. M.; MINNAAR, J. L.; PURDOM, M. R. Immunizing

properties of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cell walls.

Onderstepoort Journal of Veterinary Research, Pretoria, v. 36, n. 2, p. 211-216, 1969.

CARMINATI, R.; BAHIA, R.; COSTA, L. F. de M.; PAULE, B. J. A.; VALE, V. L.; REGIS, L.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 2, n. 1, p. 88-93, 2003. Disponível em: <<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/4256/3127>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

CARNE, H. R. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagentes. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 4, p. 42-47, 1932.

CARRYN, S.; CHANTEUX, H.; SERAL, C.; MINGEOT-LECLERCQ, M. -P.; VAN BAMBEKE, F.; TULKENS, P. M. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 615-634, 2003. Disponível em: <<http://www.facm.ucl.ac.be/Full-texts-FACM/Carryn-2003-2.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

CASSAMAGNAGHI, A. Le diagnostic de la Lympho-adenite caséense des mouton par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. **Bulletin de l'Academie Veterinaire de France**, Paris, v. 4, n. 7, p. 330-333, 1931.

CERDEIRA, L. T.; CARNEIRO, A. R.; RAMOS, R. T.; ALMEIDA, S. S.; D'AFONSECA, V.; SCHNEIDER, M. P.; BAUMBACH, J.; TAUCH, A.; McCULLOCH, J. A.; AZEVEDO, V. A.; SILVA, A. Rapid hybrid de novo assembly of a microbial genome using only short reads: *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19 as a case study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 218-23, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701211001953>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

CESARI, E. Sur le diagnostic de la lymphadénie caséense par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. **Bulletin de l'Académie Veterinaire de France**, Paris, v. 3, n. 6, p. 291-295, 1930.

ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; BAERE, T. D.; VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 75-83, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502000895>>. Acesso em: 15 mar. 2014.

CHAPLIN, P. J., DE ROSE, R., BOYLE, J. S., MCWATERS, P., KELLY, J., TENNENT, J. M., LEW, A. M., SCHEERLINCK, J. Y. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 12, p. 6434-6438, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97052/pdf/ii006434.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

COELHO, K. S.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C.; BARSANTE, M. M.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R. The immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* protein and DNA vaccines in a murine model (Abstracts). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1/3, p. 314, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242708006211>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

COSTA, M. P.; McCULLOCH, J. A.; ALMEIDA, S. S.; DORELLA, F. A.; FONSECA, C. T.; OLIVEIRA, D. M.; TEIXEIRA, M. F. S.; LASKOWSKA, E.; LIPINSKA, B.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC Research Notes**, London, v. 4, p. 243, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21774825>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

COSTA FILHO, G. A. Diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos através da intradermo-reação. **Anais da Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Recife, v. 2, n. 3, p. 161-170, 1978.

DAVIS, E. W. Corynebacterium pseudotuberculosis infections in animals. In: SMITH, B. P. (Ed.). **Large Animal Internal Medicine**. Toronto: C.V. Mosby Company, 1990. p. 1120-1126.

DE ROSE, R.; TENNENT, J.; McWATERS, P.; CHAPLIN, P. J.; WOOD, P. R.; KIMPTON, W.; CAHILL, R.; SCHEERLINCK, J. Y. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunization in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 90, n. 1/2, p. 55-63, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242702002210>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K.; 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**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 167-175, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113500002170>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of Corynebacterium pseudotuberculosis and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 205-13, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196200>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

DOTY, R. B., DUNNE, H. W., HOKANSON, J. F., REID, J. J. A comparison of toxins produced by various isolates of Corynebacterium pseudotuberculosis and the development of a diagnostic skin test for caseous lymphadenitis of sheep and goats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 25, p. 1679-1685, 1964.

EGGLETON, D. G.; MIDDLETON, H. D.; DOIDGE, C. V.; MINTY, D. W. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 68, n. 10, p. 317-319, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1755781>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

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**, Ithaca, v. 196, n. 10, p. 1609-1613, 1990.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 28, n. 3/4, p. 289-301, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1719692>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

FARID, A.; MAHMOUD, A. H. Primary trials on the diagnosis of Caseous lymphadenitis in Egypt by means of intradermal inoculation of allergic material. **Veterinary Medical Journal**, Giza, v. 7, n. 7/8, p. 253-258, 1961.

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**, Kidlington, v. 24, n. 33/34, p. 5986-5996, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X0600541X#>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

FRASER, G. Haemolytic activity of *Corynebacterium ovis*. **Nature**, London, v. 189, p. 246, 1961.

GUIMARÃES, A. S.; CARMO, F. B. do; PAULETTI, R. B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **The IIOAB Journal**, India, v. 2, n. 2, p. 33-43, 2011. Disponível em: <[http://www.iioab.org/Vol2\(2\)2011/de%20Sa%20Guimaraes%20et%20al-IIOABJ-2%20\(2\)-2011-33-43p.pdf](http://www.iioab.org/Vol2(2)2011/de%20Sa%20Guimaraes%20et%20al-IIOABJ-2%20(2)-2011-33-43p.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2014

GUIMARÃES, A. S.; SEYFFERT, N.; BASTOS, B. L.; PORTELA, R. W. D.; MEYER, R.; CARMO, F. B.; CRUZ, J. C. M.; MCCULLOCH, J. A.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B.; 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**, Amsterdam, v. 87, n. 1/3, p. 86-91, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448809001850>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

HODGSON, A. L. M.; BIRD, P.; NISBET, I. T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 3, p. 1256-1261, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC208591/pdf/jbacter01045-0102.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

HOLSTAD, G. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. I. Evaluation of two serological diagnostic tests. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 27, n. 4, p. 575-583, 1986.

HUSBAND, A. J.; WATSON, D. L. Immunological events in the popliteal lymph node of sheep following injection of live or killed *Corynebacterium ovis* into an afferent popliteal lymphatic duct. **Research in Veterinary Science**, London, v. 22, p. 105-112, 1977.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática: SIDRA**. Banco de Dados Agregados. Tabela 73: efetivo dos rebanhos por tipo de

rebanho. [Rio de Janeiro, 2013]. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=73&z=t&o=24>>. Acesso em: 15 out. 2013.

JOHNSON, E. H.; VIDAL, C. E. S.; SANTA ROSA, J. Comparison of a diffusion in gel-enzyme linked immunosorbent assay (Dig-Elisa) and the synergistic hemolysis inhibition assay to record the antibody response of goats to the exotoxin of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 374-378, 1988.

JOLLY, R. D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 189-196, 1966. DOI: DOI:10.1111/j.1365-2672.1966.tb03467.x.

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

KUMAR, J.; TRIPATHI, B. N.; KUMAR, R.; SONAWANE, G. G.; DIXIT, S. K. Rapid detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in clinical samples from sheep. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 45, n. 6, p. 1429-1435, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11250-013-0381-8>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

KURIA, J. K.; HOLSTAD, G. Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep-correlation between the hemolysis inhibition test and the ELISA test. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 30, n. 1, p. 109-110, 1989.

LAHIANI-SKIBA, M.; BOUNOURE, F.; SHAWKY-TOUS, S.; ARNAUD, P.; SKIBA, M. Optimization of entrapment of metronidazole in amphilic beta-cyclodextrin nanospheres. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 41,

n. 3, p. 1017-1021, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708506000604>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

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

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

LEHMANN, K. B.; NEUMANN, R. O. **Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speciellen Bakteriologischen Diagnostik**. München: Verlag von J. F. Lehmann, 1896. 2 v.

LUND, A.; ALMLID, T.; LARSEN, H. J.; STEINE, T. Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 23, p. 473-482, 1982.

MACHADO, G.; GRESSLER, L.T.; KIRINUS, J. K.; HERMANN, G. P. Linfadenite caseosa em ovinos abatidos sob inspeção federal no estado do Rio Grande do Sul; estimativas de perdas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 967, 2011. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/39-2/PUB%20967.pdf>>. Acesso em> 25 jan. 2014.

MAHMOUD, O. M.; HAROUN, E. M.; OMER, O. H. The effect of zinc injection on the duration of protection against abscess diseases in vaccinated ewes. **Research Journal of Veterinary Sciences**, New York, v. 2, n. 1, p. 10-13, 2009. Disponível em: <<http://scialert.net/qredirect.php?doi=rjvs.2009.10.13&linkid=pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

MAKI, L. R., SHEN, S. H., BERGSTROM, R. C., STETZENBACH, L. D. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep, using an enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 1, p. 212-214, 1985.

MENZIES, P. I., MUCKLE, C. A. The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, CA, v. 53, n. 3, p. 313-318, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255717/pdf/cjvetres00051-0061.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 107, n. 3/4, p. 249-254, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242705001492>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

NAIN, S. P. S.; GARG, D. N.; CHANDIRAMANI, N. K. An agar-gel-immuno-precipitation test for the detection of *Corynebacterium ovis* antibodies in sheep and goat sera. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases**, Izatnagar, v. 5, n. 3, p. 93-96, 1984.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 50, n. 12, p. 537-542, 1974.

NOZAKI, C. N.; FARIA, M. A. R.; MACHADO, T. M. M. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 187-189, 2000. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V67_2/8.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2014.

NUTTALL, W. O. **Caseous lymphadenitis in sheep and goats in New Zealand**. *Surveillance*, Wellington, v. 15, n. 1, p. 10-12, 1988.

O'REILLY, K. M.; MEDLEY, G. F.; GREEN, L. E. The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: a mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscess. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 95, n. 1/2, p. 115-126, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587710000632>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

OLIVEIRA, S. C.; ROSINHA, G. M. S.; DE-BRITO, C. F. A.; FONSECA, C. T.; AFONSO, R. R.; COSTA, M. C. M. S.; GOES, A. M.; RECH, E. L.; AZEVEDO, V. Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 2, p. 207-214, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v32n2/3388c.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

PACHECO, L. G. C.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L. P.; DORELLA, F. A.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; FROTA, M. N. L.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; ALVES, F. S. F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, n. 4, p. 480-486, 2007. Disponível em: <<http://jmm.sgmjournals.org/content/56/4/480.full.pdf+html>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

PATON, M. W.; WALKER, S. B.; ROSE, I. R.; WATT, G. F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal, Victoria**, v. 81, n. 1/2, 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.; SCHAER, R.; GOES, A. M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium*

pseudotuberculosis primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 96, n. 3-4, p. 129-139, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242703001466>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

PAULE, B. J. A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 34, n. 2, p. 311–316, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592804000051>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

PEPIN, M.; MARLY, J.; PARDON, P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep and the complement fixation test for paratuberculosis. **Veterinary Record**, London, v. 120, n. 10, p. 236, 1987. DOI: doi:10.1136/vr.120.10.236.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0102-09352000000500021>. Acesso em: 10 fev. 2014.

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**, Amsterdam, v. 88, n. 3, p. 287-297, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502001219>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

PRODHAN, M. A.; 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**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 193-196, 1993. Disponível em: <http://download.springer.com/static/pdf/995/at%2F5A101007%2F252BF0183916.pdf?auth=6-14082693_8d067de2b883ba481037e29d08e7&ext=pdf>. Acesso em: 10 fev. 2014.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p.

RENSHAW, H. W.; GRAFF, V. P.; GATES, N. L. Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, and *Moraxella* spp from internal abscesses in emaciated ewes. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 40, n. 8, p. 1110-1114, 1979.

REBOUÇAS, M. F.; PORTELA, R. W.; LIMA, D. D.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; VALE, V. L.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, MO, v. 23, n. 2, p. 213-220, 2011. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/23/2/213.long>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

RIBEIRO, O. C., SILVA, J. A. H., OLIVEIRA, S. C., MEYER, R., FERNANDES, G. B. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 4, p. 461-465, 1991. Disponível em: <<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/3363/696>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

RUIZ, J. C.; D'AFONSECA, V.; SILVA, A.; ALI, A.; PINTO, A. C.; SANTOS, A. R.; ROCHA, A. A. M. C.; LOPES, D. O.; DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G.

C.; COSTA, M. P.; TURK, M. Z.; SEYFFERT, N.; MORAES, P. M. R. O.; SOARES, S. C.; ALMEIDA, S. S.; CASTRO, T. L. P.; ABREU, V. A. C.; TROST, E.; BAUMBACH, J.; TAUCH, A.; SCHNEIDER, M. P. C.; MCCULLOCH, J.; CERDEIRA, L. T.; RAMOS, R. T. J.; ZERLOTINI, A.; DOMINITINI, A.; RESENDE, D. M.; COSER, E. M.; OLIVEIRA, L. M.; PEDROSA, A. L.; VIEIRA, C. U.; GUIMARÃES, C. T.; BARTHOLOMEU, D. C.; OLIVEIRA, D. M.; SANTOS, F. R.; RABELO, E. M.; LOBO, F. P.; FRANCO, G. R.; COSTA, A. F.; CASTRO, I. M.; DIAS, S. R. C.; FERRO, J. A.; ORTEGA, J. M.; L. V. PAIVA, L. R. GOULART, ALMEIDA, J. F.; FERRO, M. I. T.; CARNEIRO, N. P.; FALCÃO, P. R. K.; GRYNBERG, P.; TEIXEIRA, S. M. R.; BROMMONSCHENKEL, S.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; MOORE, R. J.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, G. C.; AZEVEDO, V. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e18551, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21533164>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

SANTIAGO, L. B.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, V. W. S.; RODRIGUES, A. S.; CHAPAVAL, L.; BRITO, L. F.; SOUSA, F. G. C. Avaliação in vitro da sensibilidade da *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a diferentes tipos de antissépticos e desinfetantes e determinação de sua curva de crescimento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 593-600, 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/105599/1/AP-Avaliacao.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; SANTOS, V. W. S.; RODRIGUES, A. S.; LIMA, A. M. C.; OLIVEIRA, E. L.; ALBUQUERQUE, F. H. M. A. R. In vivo evaluation of antiseptics and disinfectants on control of caseous lymphadenitis: clinical, haematological, serological and microbiological monitoring. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 277-284, 2013. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/105600/1/AP-In-vivo.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

SENTURK, S.; TEMIZEL, M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Record**, London, v. 159, n. 7, p. 216-217, 2006.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, London, v. 88, n. 1, p. 50-55, 2010.

SIMMONS, C. P.; HODGSON, A. L. M.; STRUGNELL, R. A. Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 65, n. 8, p. 3048-3056, 1997. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/65/8/3048.long>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

SHEN, D. T.; JEN, L. W.; GORHAM, J. R. The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., 1982, Tucson, Arizona. **Proceedings...** Scottsdale: Dairy Goat Journal, 1982. p. 445-448.

SHIGIDI, M. T. A. Antigenic relationship of various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Bulletin of Epizootic Diseases of Africa**, London, v. 22, p. 263-269, 1974.

SHIGIDI, M. T. A. An indirect haemagglutination test for the sero-diagnosis of *C. ovis* infection in sheep. **Research in Veterinary Science**, London, v. 24, n. 1, p. 57-60, 1978.

SHIGIDI, M. T. A. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. **British Veterinary Journal**, London, v. 135, n. 2, p. 172-177. 1979.

- SIMMONS, C. P.; HODGSON, A. L. M.; STRUGNELL, R. A. Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 65, n. 8, p. 3048-3056, 1997. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/65/8/3048.long>>. Acesso em: 15 mar. 2014.
- SOUZA, M. F.; CARVALHO, A. Q.; GARINO JUNIOR, F. G.; RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 3, p. 224-230, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n3/07.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2014.
- STAPLETON, S.; BRADSHAW, B.; O'KENNEDY, R. Development of a surface plasmon resonance-based assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 651, n. 1, p. 98-104, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267009010563>>. Acesso em: 15 mar. 2014.
- SUNIL, V.; MENZIES, P. I.; SHEWEN, P. E.; PRESCOTT, J. F. Performance of a whole blood interferon-gamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 3-4, p. 288-297, 2008.
- UTHERLAND, S. S.; PATON, M. W.; MERCY, A. R. ELLIS, T. M. A reliable method for establishing caseous lymphadenitis infection in sheep. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 64, n. 10, p. 323-324, 1987.
- TER LAAK, E. A.; BOSCH, J.; BIJL, G. C.; SCHREUDER, B.E. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 7, p. 1125-1132, 1992.

TORRES, L. F. C.; RIBEIRO, D.; HIRATA JR, R.; PACHECO, L. G. C.; SOUZA, M. C.; SANTOS, L. S.; SANTOS, C. S.; SALAH, M.; COSTA, M. M.; RIBEIRO, M. G.; SELIM, S. A.; AZEVEDO, V. A. C.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 108, n. 3, p. 272-279, 2013. Disponível em: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/issues/past-issues/item/download/1747_e5b21a1801ee40c5f5dbe54082a3e692>. Acesso em: 25 mar., 2014.

UNANIAN, M. M.; FELICIANO SILVA, A. E.; PANT, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 17, n. 1, p. 57-62, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3992674>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

VAISEH, F. P. **Development of a dot-blot assay for sero-diagnosis of caseous lymphadenitis, using a purified exotoxin as antigen**. 1990. Thesis (Ph.D) - University of California, Davis.

WAGNER, K. S.; WHITE, J. M.; CROWCROFT, N. S.; MANN, G.; EFSTRATIOU, A. Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 138, p. 1519-1530, 2010.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. The Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 17, n. 2, p. 359-371, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515406>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

WINDSOR, P. A. Control of caseous lymphadenitis. The Veterinary clinics of North America. **Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 193-202, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072010000964>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

YANAGAWA, T.; BASRI, H.; OTSUKI, K. Three types of *Corynebacterium renale* classified by precipitin reactions in gels. **Japanese Journal of Veterinary Research**, Sapporo, v. 15, n. 3, p. 111-120, 1967.

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

ZAKI, M. M.; ABDEL-HAMID, Y. M. A comparative study of in vitro and in vivo tests for caseous lymphadenitis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 16, n. 2, p. 167-70, 1974.

ZERBINATI, J.; GREVE, I. C.; LEAL, R. F.; AMORIM, L. M. P. V.; SILVA, D. L.; VIEGAS, S. R. A. A.; PEIXOTO, A. P. C.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B. Produção e padronização de um antígeno para um teste elisa indireto no diagnóstico da linfadenite caseosa em soros caprinos. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 3, p. 285-293, 2007. Disponível em: <<http://www2.pucpr.br/reol/index.php/ACADEMICA?dd1=1853&dd99=pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

Anexo

Anexo I

Nesta seção, há a descrição resumida de métodos diagnósticos desenvolvidos desde meados da década de 1980, cuja literatura não é encontrada nas bases de dados *on-line*, até os atuais, mais facilmente referenciados, e que disponibilizamos para consulta do leitor.

Testes Diagnósticos Diretos

Os métodos de isolamento microbiológico, detecção da fosfolipase D e PCR já foram descritas no item 2.

Testes Diagnósticos Indiretos

Testes alérgicos

Os testes alérgicos ou de hipersensibilidade foram um dos primeiros a serem elaborados, na forma de testes intradérmicos com inúmeras variações no preparo do antígeno, que levavam a reações que lembravam a tuberculina (CAMERON; McOMIE, 1940; CARNE, 1932; CASSAMAGNAGHI, 1931; CESARI, 1930; COSTA FILHO, 1978; FARID; MAHMOUD, 1961; LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1984 citados por LANGENEGGER et al., 1987, p. 28; RENSHAW et al., 1979; TRAIN, 1934, citado por Langenegger et al., 1987, p. 28).

De modo geral, esses estudos não apresentaram resultados satisfatórios quanto à especificidade e sensibilidade dos testes, sendo testados em alguns casos somente em cobaias, e poucos realizaram estudos a campo.

Alves e Olander (1999) avaliaram um teste de pele em caprinos vacinados e infectados com *C. pseudotuberculosis* baseado em um antígeno bruto de bactéria inativada por formalina. Anteriormente à infecção, nenhum animal do grupo controle e do grupo vacinado respondeu ao teste. Após o desafio com a bactéria viva, reações mensuráveis foram observadas em todos os animais a partir da primeira até a décima semana. Esse resultado indicou que o antígeno específico de *C. pseudotuberculosis* pode ser usado em caprinos no diagnóstico da LC como teste de pele.

Observa-se, portanto, a necessidade de um teste alérgico com um antígeno extremamente purificado, com boa padronização de seu protocolo e validado a campo, associados a outras metodologias que confirmem a positividade do animal, para que se possa determinar efetivamente a viabilidade desses testes alérgicos em um programa sanitário.

Outras metodologias foram estudadas baseadas no principal antígeno de *C. pseudotuberculosis* (a fosfolipase D) e nas suas características biológicas, sendo detalhadas a seguir.

Inibição de hemólise sinérgica (SHI)

Teste primariamente desenvolvido para o diagnóstico de LC em equinos. Foi elaborado baseando-se nas características da hemólise sinérgica observadas entre a fosfolipase D de *C. pseudotuberculosis* e a fosfolipase C de *R. equi*. Extrapolando para caprinos e ovinos, observou-se que na presença de anticorpos no soro contra a fosfolipase D de *C. pseudotuberculosis*, há neutralização da toxina, impedindo sua atuação de forma sinérgica com a fosfolipase C de *Rhodococcus equi*, inibindo a formação do amplo halo de hemólise no agar sangue (KNIGHT, 1978)

Vários autores têm utilizado essa técnica para determinação da LC de forma indireta, pela detecção dos anticorpos no soro, e consideraram esse teste confiável como indicador de infecção ativa (BROWN et al., 1985). Porém, pode haver ausência de lesões em animais reagentes, por inespecificidade do teste por reações cruzadas com outros bacilos Gram-positivos (PRODHAN et al., 1993) ou exposição prévia ou recente à infecção (BROWN et al., 1986), e até mesmo títulos baixos em animais positivos por uma infecção em fase inicial (JOHNSON et al., 1988).

Inibição da anti-hemolisina (AHI)

Esse método foi elaborado, sabendo-se que a fosfolipase D de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a beta-hemolisina de

Staphylococcus aureus têm afinidade pelo mesmo receptor nas hemácias de carneiro. Se a beta-hemolisina se liga a esse receptor, a hemácia é lisada, e visualiza-se hemólise no agar sangue. Na presença da fosfolipase D, ela se liga ao sítio da hemácia primeiro, não permitindo a ação da hemolisina nessa célula e, portanto, não há visualização de hemólise na placa. Entretanto, na presença de anticorpos anti-toxina de animais com a doença, há sequestro da fosfolipase D e a hemolisina estafilocócica fica disponível para causar hemólise (SHIGIDI, 1979; ZAKI, 1968; ZAKI; ABDEL-HAMID, 1974).

Teste de inibição da hemólise (HIT)

Teste desenvolvido em 1980, baseado na capacidade da exotoxina hemolisar hemácias de carneiro. Na presença de soro de ovelhas vacinadas para essa exotoxina, os anticorpos antitoxina se ligam à toxina, impedindo a hemólise, dando o nome ao método de inibição da hemólise. Quando testado em ovelhas com linfadenite caseosa, detectou 24/30 (80%) animais (BURRELL, 1980a). Quando comparado ao teste de aglutinação bacteriana, ambos apresentaram nos animais-teste sensibilidade e especificidade de 96%. A reprodutibilidade para HIT foi um pouco maior (95%,) quando comparada ao BAT (87%), também demonstrando um menor coeficiente de variação (HOLSTAD, 1986).

Teste de aglutinação bacteriana (BAT)

Este teste é feito com células de *C. pseudotuberculosis* crescidas em caldo cérebro coração e lavadas com PBS (salina tampão fosfato) adicionado de Tween 80. São, então, diluídas no mesmo PBS na concentração padrão. O soro é diluído em placa de microtitulação e adiciona-se o antígeno, incubando durante a noite a 37°C. O título de anticorpo é lido como o valor recíproco de \log_{10} da última diluição de soro, dando aglutinação. Valores maiores que 1,8 podem ser considerados positivos (LUND et al., 1982). Outros testes de aglutinação são relatados (AWAD, 1960; CAMERON; McOMIE, 1940; SHIGIDI, 1974 citado por SHEN et al., 1982, p. 445).

Microaglutinação direta

Método adaptado de um sistema de microplaca previamente relatado para *P. haemolytica* e de um teste de aglutinação em tubo para *C. pseudotuberculosis*. Uma suspensão de antígeno bacteriano formalizado é preparada em solução tampão fosfato com corante safranina e aglutinada por diluições seriadas de soro em placa de microtitulação com fundo em "V". As placas cobertas são incubadas durante a noite em temperatura ambiente. A diluição do último poço com aglutinação visível é considerada como o título (MENZIES; MUCKLE, 1989).

Hemaglutinação indireta (HAI)

Teste desenvolvido a partir de hemácias de carneiro tratadas com bi-diazobenzidina e sensibilizadas com toxina purificada. Títulos a partir de 1/16 foram considerados positivos. Soros de animais com LC foram testados por HAI e AHI, sendo o primeiro mais sensível (SHIGIDI, 1978).

Agglutinação em tubos

Resumidamente, este teste é realizado a partir de antígeno obtido da massa de crescimento bacteriano diluído em salina, homogeneizado em um liquidificador de teflon e deixado para decantar por duas horas. O sobrenadante em suspensão foi utilizado no teste, ajustado à densidade do antígeno de *Brucella* com nefelômetro. Diluições seriadas do soro são testadas com o antígeno e incubadas a 37°C por 6 horas. Considera-se positiva a diluição com aglutinação de pelo menos 50% (CAMERON et al., 1972). Husband e Watson (1977) utilizaram essa técnica de titulação de anticorpos anti-*C. ovis* de soro e linfa para comparação entre grupos de animais que foram inoculados com bactéria viva ou morta.

Neutralização em pele de coelho

Esta técnica consiste em um teste de pele no qual exotoxina titulada com o soro teste é injetada intradermicamente em coelhos. Na presença de anticorpos antitoxina há a ausência de necrose. Foi o teste que confirmou a suspeita de que uma resposta humoral desenvolvida para a exotoxina e que essa reação de neutralização da toxina pela

antitoxina poderia ser utilizada em um esquema de diagnóstico (DOTY et al., 1964).

Imunodifusão em gel de agar

Este teste foi padronizado primeiramente para *C. renale* (YANAGAWA et al., 1967) e posteriormente foi adaptado para *C. pseudotuberculosis*, com um antígeno satisfatório para a técnica, produzido com células tratadas com desoxicolato de sódio. (SHIGIDI, 1974). Awad et al. (1977) avaliaram qual a reação entre soros de caprinos e ovinos infectados com isolados bacterianos oriundos da mesma espécie animal e entre as duas espécies. Houve a mesma resposta entre os soros e os antígenos, demonstrando a sua similaridade antigênica no teste de precipitação em gel de agar. Entretanto, o teste apresentou baixa sensibilidade, detectando apenas 66% dos animais infectados, e boa especificidade, sendo negativo em 98% dos animais saudáveis.

Nain et al. (1984) padronizaram o sorodiagnóstico de LC em ovelhas e cabras por meio do teste de agar-gel-immuno-precipitation (AGIPT) usando como antígeno células de *C. ovis* sonicadas. Esse teste foi comparado com o teste de aglutinação, havendo concordância de 92,6% quanto à positividade dos testes, e apenas de 38% quanto ao título encontrado.

Imunodifusão dupla simplificada

Burrell (1980b) descreveu um método de imunodifusão simplificada capaz de ser realizado com baixa concentração de antígeno e soro. Linhas proeminentes de precipitação foram formadas entre a anti-toxina a diluições de até 1:8 e de sobrenadante não diluído com título hemolítico de 1:32768. Esse teste é extremamente econômico e conveniente para levantamento de infecções por *C. ovis* visto que requer somente 0,05mL de sobrenadante e de soro. Além disso, pelo menos 16 amostras podem ser testadas em cada placa de petri e os resultados são obtidos em 24 horas.

Teste de proteção ao camundongo (MP test)

Esse teste utiliza soro de animais com suspeita de infecção por *C. pseudotuberculosis* e o inocula intraperitonealmente em camundongos. Após 6 horas, inocula-se a endotoxina em dose letal mínima. Se o animal possui anticorpos antitoxina, o camundongo permanece vivo após 24 horas da inoculação (ZAKI; ABDEL-HAMID, 1974).

Fixação de complemento

Detecção de anticorpos ligados a antígenos específicos que ativam o sistema complemento, levando a lise celular. No caso das hemácias, na presença dos anticorpos há hemólise. Em diluições seriadas, é possível determinar o título de anticorpos onde houve 50% de hemólise (SHIGIDI, 1979). Entretanto, essa metodologia pode oferecer reações cruzadas com *Mycobacterium paratuberculosis* (PEPIN et al., 1987).

ELISAs

O ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) tem se demonstrado muito útil nas avaliações de prevalência da LC nos rebanhos, e tem sido testado em diversas preparações de antígenos, incluindo célula bacteriana total, exotoxina PLD, proteínas secretadas (CARMINATI et al., 2003; PAULE et al., 2004; SEYFFERT et al., 2010; ZERBINATI et al. 2007), além da detecção de IFN-gama (MEYER et al., 2005; PAULE et al., 2003; PRESCOTT et al., 2002; REBOUÇAS et al., 2011; SUNIL et al., 2008).

Considerando as melhorias alcançadas nesse teste, ele será uma potencial escolha em um programa de controle da enfermidade pela possibilidade de diferenciação de anticorpos vacinais e de infecção natural. A seguir são relatados alguns estudos com ELISA em suas diferentes composições de antígenos, e a combinação do ELISA com outros testes.

ELISA com antígeno de parede celular

Cameron et al. (1969) realizaram estudos sobre a composição da parede celular de *C. pseudotuberculosis* para auxiliar no desenvolvi-

mento de testes sorológicos que aferissem a resposta imune de animais imunizados. Camundongos foram imunizados com parede celular extraída com éter:etanol, ácido tricloroacético, formamida e combinações. Houve redução marcante na imunização dos animais após tratamento com formamida, demonstrando que o antígeno indutor é parte integrante da parede celular.

Baseando-se nesse estudo, Shen et al. (1982) desenvolveram um ELISA com a parede celular purificada. O antígeno demonstrou-se aparentemente específico, não havendo reação cruzada com o soro de animais infectados com *C. pyogenes*. Além disso, todos os animais com abscessos foram positivos ao ELISA, demonstrando uma sensibilidade comparável ao teste de SHI, e talvez ligeiramente maior.

ELISA com antígeno de toxina

Notou-se uma dificuldade em prepara antígeno de célula bacteriana devido à tendência da corinebactéria se autoaglutinar. Visto a alta porcentagem de lipídeos de superfície de fácil extração, substâncias baseadas em petróleo foram utilizadas para tal fim sem afetar a viabilidade da célula. Estudou-se então se esses tratamentos da célula bacteriana com éter e/ou sonicação aumentavam a especificidade e sensibilidade do teste e solucionavam a autoaglutinação. Além desses antígenos, o ELISA foi realizado com a toxina, todos testados frente a soro de animais experimentalmente infectados. A toxina se apresentou como melhor antígeno na aferição de infecção do que a parede celular. O ELISA pareceu ser tão sensível quanto o teste AHI, e mais fácil de ser executado (MAKI et al., 1985).

Baseado na padronização por Maki et al. (1985) do ELISA com a toxina como antígeno, Kuria e Holstad (1989) avaliaram a correlação desse teste com o HIT. Os resultados dos dois testes foram concordantes, mas pela maior capacidade de processamento de amostras do ELISA, os autores sugerem que esse teste substitua o HIT em levantamentos de infecção.

Sutherland et al. (1987) combinaram um ELISA, um contendo como antígeno a exotoxina e o outro contendo uma fração da parede celular, aumentando a sensibilidade do teste. O ELISA, usando a fração da parede celular, foi capaz de distinguir animais infectados de animais vacinados com uma vacina toxoide (Sutherland et al. ,1987citados por Ter Laak, 1992, p. 1125).

ELISA com dois antígenos: parede celular; sobrenadante livre de bactéria com exotoxina

Em um estudo realizado em abatedouro, 33 de 104 ovelhas examinadas (31,7%) tinham lesões típicas de LC com isolamento de *C. pseudotuberculosis*. O soro desses 33 animais foi submetido a dois tipos de ELISA – um com a parede celular como antígeno e o outro com o sobrenadante livre de bactéria com exotoxina. O primeiro detectou 96,9% dos animais positivos e o segundo 84,8%. Quando se avaliou os soros de animais sem infecção aparente, ambos apresentaram um alto número de aparentes falso-positivos, com 64,7% e 49,2%, respectivamente. Não houve relação significativa entre intensidade de lesão, valor de densidade óptica ou título de anticorpo antitoxina. Os autores alertam que o uso de ELISA com antígenos brutos são de utilidade questionável a campo, pela possibilidade de em rebanhos endêmicos haver o risco de detectar anticorpos de exposição que não necessariamente indicam infecção ativa (ELLIS et al., 1990).

ELISA para detecção de interferon-gama (IFN-gama)

Alguns trabalhos têm sido realizados avaliando o uso do ELISA, quantificando os níveis de IFN-gama para detecção de ovinos e caprinos infectados. Resultados promissores foram relatados por Sunil et al. (2008), utilizando um kit comercial para bovinos e utilizando como antígeno células inativadas por formalina. A sensibilidade alcançada foi de 91% e especificidade de 98%.

Rebouças et al. (2011) realizaram esse teste estimulando os leucócitos do sangue dos animais com antígeno secretado de *C. pseudotuberculosis*. A especificidade foi excelente, 100% para caprinos

e 93% para ovinos, mas a sensibilidade foi baixa, 55,8 e 56%, respectivamente.

DIG – ELISA – Diffusion in gel-ELISA

Johnson et al. (1988) realizaram uma forma simplificada do ELISA convencional com a difusão em gel de agar (DIG-ELISA) dos anticorpos, com ligação nos antígenos aderidos à placa de poliestireno, e visualização direta ou com anticorpo secundário marcado. Essa metodologia foi testada em soro caprino de fazendas com e sem histórico da doença, tendo como antígeno a exotoxina. Os resultados foram comparados com o SHI, e o teste pareceu ser simples e sensível para detectar a resposta de cabras à exotoxina.

ELISA com seis diferentes antígenos x controle com Immunoblot

Ellis et al. (1991) testaram seis preparados de antígenos e testaram com o ELISA desenvolvido por Maki et al. (1985) em ovelhas naturalmente infectadas. Realizando eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) desses antígenos, observou-se a extração virtualmente dos mesmos antígenos, considerando o padrão de bandas obtido – mais de 30 bandas na célula completa e nas preparações de parede celular extraídas com éter; mais de 15 bandas nos sobrenadantes das culturas. Muitas dessas moléculas foram reconhecidas por anticorpos de soros de animais de áreas endêmicas para a doença. Não houve relação aparente entre o estágio da doença e o reconhecimento sorológico (Immunoblot) de uma proteína particular dos antígenos em células extraídas com éter ou em filtrados de cultura.

ELISA double-antibody sandwich x Immunoblot

Um ELISA sanduíche duplo-anticorpo foi elaborado para detecção de anticorpos antiexotoxina, e obteve especificidade de 99,9% e sensibilidade de 100%. Resultados duvidosos ou inconclusivos ao ELISA foram analisados por Immunoblot. Os autores consideraram o ELISA um teste diagnóstico útil para os programas de erradicação da LC, e o Immunoblot apresentou-se valioso em classificar soros com resulta-

dos insatisfatórios pelo ELISA. Foi o primeiro teste em larga escala com soros de campo (TER LAAK et al., 1992).

ELISA com antígeno de bactéria sonicada

Binns et al. (2007) padronizaram um ELISA com antígeno sonicado de *C. pseudotuberculosis* e otimizaram a detecção no soro de imunoglobulinas totais e de IgG. A detecção total de anticorpo apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 71%. Já a detecção de IgG apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 83%. Os autores consideraram essa metodologia favorável em relação a outros testes de ELISA publicados (DERCKSEN et al., 2000), além de ser mais simples e de menor custo que o teste holandês por *ELISA indirect double-antibody sandwich* (TER LAAK et al., 1992).

Biosensor baseado em ressonância de plásmon de superfície (SPR)

Stapleton et al. (2009) elaboraram um ensaio de biosensor baseado em ressonância de plasmon de superfície para a detecção de anticorpos contra a fosfolipase D em soros de ovelhas, viabilizando um teste com chip, minimizando reações de ligação inespecíficas. Quando comparado ao ELISA sanduíche duplo, obtiveram-se resultados muito favoráveis com 91,3% de concordância.

Dot-Blot

O Dot-Blot para LC foi padronizado por Vaiseh (1990), utilizando a toxina PLD parcialmente purificada. O mesmo indicou uma sensibilidade de 94% e especificidade de 99%.

Na comparação com o teste SHI, o dot-blot detectou menor número de animais positivos, o que os autores justificam ser pelas reações cruzadas que podem ocorrer no teste SHI em virtude de infecções por outras corinebactérias, levando a resultados falso-positivos, indicando o dot-blot como um teste mais confiável na varredura de LC em caprinos do que o SHI (PRODHAN et al., 1993).

Associação de Testes Diretos e Indiretos

É interessante observar que dados importantes podem ser obtidos pelo uso associado das técnicas de detecção dos antígenos e dos anticorpos. Essas informações auxiliam na determinação dos antígenos imunodominantes e da resposta imune, necessários no desenvolvimento de novos testes diagnósticos e vacinas.

Entre as técnicas, destacam-se a eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE), que permite uma boa separação das proteínas de acordo com o peso molecular, associada ao immunoblot, que transfere esse gel para uma membrana de celulose e com o soro do animal infectado, marca quais proteínas especificamente os anticorpos reconhecem. Como comentado anteriormente, Ter Laak et al. (1992) utilizaram essa associação e compararam com o ELISA, obtendo resultados favoráveis.

Ellis et al. (1991) realizaram a caracterização por SDS-PAGE de antígenos de constituintes bacterianos obtidos por vários métodos e verificaram os respectivos anticorpos de resposta frente a eles com ELISA específico de cada antígeno associado.

Anexo 2

Procedimento de drenagem do abscesso e cauterização química com iodo



Fig. 1. Animal com abscesso de Linfadenite Caseosa.



Fig. 2. Material necessário.



Fig. 3. Tricotomia da área do abscesso. Uso indispensável de luvas.



Fig. 4. Incisão da região inferior do abscesso com bisturi estéril.



Fig. 5. Drenagem do conteúdo, para dentro de um saco plástico, evitando contato com as mãos.



Fig. 6. Limpeza da cavidade com gaze e papel toalha limpos.



Fig. 7. Umedecimento da gaze com solução de iodo a 10%.



Fig. 8. Introdução de compressas preenchendo todo o espaço deixado pelo abscesso vazio.



Fig. 9. Ferida protegida com repelente e mantida preenchida pela gaze durante 3 dias.



Fig. 10. Descarte do material contaminado dentro de saco plástico.



Fig. 11. Queima dos sacos plásticos com as luvas, pus e todo material contaminado. Realizado em lata específica para esta finalidade, utilizando álcool como combustível. Garantir que ocorra a completa destruição do material.