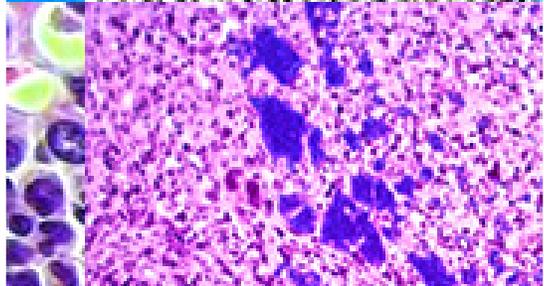
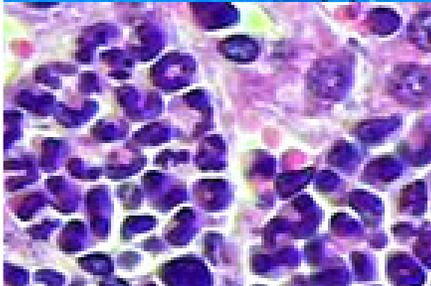
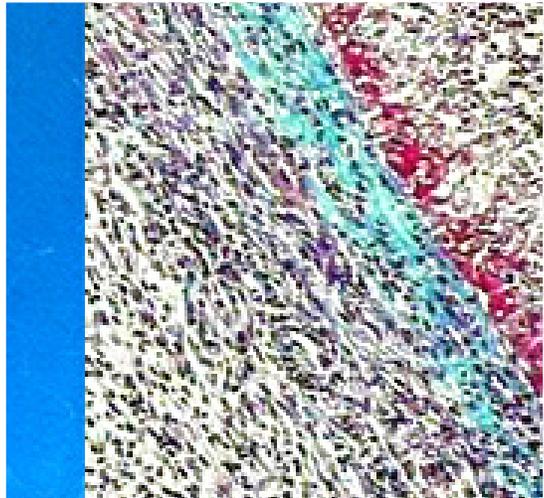


Avaliação da virulência de isolados de
Corynebacterium pseudotuberculosis
em camundongos BALB/c



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
42**

**Avaliação da virulência de isolados de
Corynebacterium pseudotuberculosis
em camundongos BALB/c**

*Grácia Maria Soares Rosinha
Patrícia Rodrigues de Melo
Lenita Ramires dos Santos
Cleber Eduardo Galvão Carvalho
Laís Cristina Oliveira Alvarenga
Gisele Braziliano Andrade
Cleber Oliveira Soares*

**Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2018**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS,
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368 2000
Fax: (67) 3368 2150
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Gado de Cortel

Presidente
Thais Basso Amaral

Secretário-Executivo
Rodrigo Carvalho Alva

Membros
Alexandre Romeiro de Araújo, André
Dominghetti Ferreira, Andréa Alves do Egito,
Kadjah Suleiman Jaghub, Liana Jank, Lucimara
Chiari, Marcelo Castro Pereira, Mariane de
Mendonça Vilela, Rodiney de Arruda Mauro,
Wilson Werner Koller

Supervisão editorial
Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto
Rodrigo Carvalho Alva

Tratamento das ilustrações
Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa
Luiz Orcirio Fialho de Oliveira

1ª edição
1ª impressão (2018): eletrônico

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Avaliação da virulência de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em
camundongos BALB/c / Grácia Maria Soares Rosinha ... [et al.]. - Campo
Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2018.
PDF (24 p.). - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de
Corte, ISSN 1983-9715 ; 42).

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2. Histopatologia. 3. Linfadenite
caseosa. 4. Patogenicidade. I. Rosinha, Grácia Maria Soares. II. Melo, Patrícia
Rodrigues de. III. Santos, Lenita Ramires dos. IV. Carvalho, Cleber Eduardo
Galvão. V. Alvarenga, Laís Cristina Oliveira. VI. Andrade, Gisele Braziliiano. VII.
Soares, Cleber Oliveira. VIII. Série.

CDD 636.39089

Sumário

Introdução.....	9
Material e Métodos	12
Amostras	12
Identificação bioquímica	12
Análises de virulência	12
Análise histopatológica	13
Ética na utilização dos animais experimentais	14
Resultados e Discussão	14
Caracterização bioquímica	14
Análise de Virulência	16
Análises patológicas	18
Conclusões.....	21
Agradecimentos.....	22
Referências	22

Avaliação da virulência de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em camundongos BALB/c

Grácia Maria Soares Rosinha¹

Patrícia Rodrigues de Melo²

Lenita Ramires dos Santos³

Cleber Eduardo Galvão Carvalho⁴

Laís Cristina Oliveira Alvarenga⁵

Gisele Brazilliano Andrade⁶

Cleber Oliveira Soares⁷

Resumo – *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva, agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) em pequenos ruminantes e causadora de piogranulomas, linfangite ulcerativa, mastite e dermatite ulcerativa em bovinos, que são doenças de grande relevância médica e veterinária. Esta doença é de difícil controle e a vacinação é a maneira mais eficiente de preveni-la nos rebanhos. Objetivou-se neste estudo selecionar cepas virulentas de *C. pseudotuberculosis*, a partir de cinco isolados obtidos de caprinos e ovinos, para uso em estudos de desafio em testes de novas vacinas contra linfadenite caseosa em camundongos. Primeiramente, os isolados foram caracterizados bioquimicamente com o kit API Coryne (APIbioMerieux, Inc., La Balme les Grottes, France) e após, camundongos BALB/c fêmeas foram infectados intraperitonealmente com três doses de Unidades Formadoras de Colônias (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 UFC/mL) com cada um dos cinco isolados de campo de *C. pseudotuberculosis* e duas linhagens controle. Os camundongos foram monitorados até trinta dias após

¹ Engenheira-Agrônoma, doutora, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte

² Bióloga, mestre, aluna de doutorado da Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade

³ Bióloga, doutora, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte

⁴ Médico-Veterinário, doutor em Ciência Animal

⁵ Médica-Veterinária, mestre em Ciências Veterinárias

⁶ Médica-Veterinária, doutora, professora da Universidade Católica Dom Bosco

⁷ Médico-Veterinário, doutor, pesquisador da Embrapa Gado de Corte

a inoculação e a taxa de mortalidade foi utilizada como marcador de virulência. Todos os isolados foram caracterizados como pertencentes à espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis e os isolados CBO 2512 e CBO 28033, isolados de abscessos de ovinos, foram considerados os mais virulentos, uma vez que induziram morte em 100% dos camundongos inoculados com 1×10^6 UFC/mL, seguidos por CBC 70D, CBC 118 isolados que apresentaram 60% de mortalidade esta mesma dose de inóculo. O grupo que recebeu 1×10^6 UFC/mL do isolado CBC NPC de *C. pseudotuberculosis* não obteve óbito, igualmente para os grupos controle, vacina 1002 (Linfovac) e isolado 00512 (Fiocruz). Além disso, análises histopatológicas macroscópicas e microscópicas foram realizadas e abscessos característicos causados por *C. pseudotuberculosis* foram observados em alguns órgãos, caracterizados por uma área central de necrose, uma área transitória de infiltrado inflamatório e uma camada de tecido conjuntivo fibroso. Em conclusão, os isolados CBO 28033 e CBO 2512 de *C. pseudotuberculosis* apresentaram-se como altamente virulentos, reproduzindo a doença LC em camundongos BALB/c e, serão utilizados em experimentos de desafio e proteção no teste de novas vacinas contra linfadenite caseosa de caprinos e ovinos.

Termos para indexação: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, virulência, histopatologia.

Evaluation of virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates in BALB/c mice

Abstract – *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a Gram-positive bacterium, an etiologic agent of caseous lymphadenitis (CLA) in small ruminants and causes piogranulomas, ulcerative lymphangitis, mastitis and ulcerative dermatitis in cattle, which are diseases of great medical and veterinary relevance. This disease is difficult to control and vaccination is the most effective way to prevent herds. The objective of this study was to select a virulent strain of *C. pseudotuberculosis*, from five isolates obtained from goats and sheep, for use in challenge studies in tests of new vaccines against CLA in mice. Firstly, the isolates were characterized biochemically

with the API Coryne kit (APIbioMerieux, Inc., La Balme les Grottes, France) and afterwards, female BALB/c mice were infected intraperitoneally with three doses of Colony Forming Units (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 CFU/mL) with each of the five field isolates of *C. pseudotuberculosis* and two control strains. Mice were monitored up to 30 days after inoculation and the mortality rate was used as a marker of virulence. All isolates were characterized as belonging to the species *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis and isolates from ovine abscesses CBO 2512 and CBO 28033, were considered the most virulent, since they induced death in 100% of the mice inoculated with 1×10^6 CFU/mL, followed by CBC 70D, CBC 118 isolates that showed 60% mortality in this same dose of inoculum. The group that received 1×10^6 CFU/mL of the CBC NPC isolate of *C. pseudotuberculosis* was not killed, also for the control, vaccine 1002 (Linfovac) and isolated 00512 (Fiocruz) groups. In addition, macroscopic and microscopic histopathological analyzes were performed and characteristic abscesses caused by *C. pseudotuberculosis* were observed in some organs, characterized by a central area of necrosis, a transient area of inflammatory infiltrate and a layer of fibrous connective tissue. In conclusion, isolates CBO 28033 and CBO 2512 from *C. pseudotuberculosis* were shown to be highly virulent, reproducing LC disease in BALB/c mice, will be used in challenge and protection experiments in the test of new vaccines against casein goat lymphadenitis and sheep.

Index terms: Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, virulence, histopathology

Introdução

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente causador da linfadenite caseosa (LC), uma doença infecciosa crônica de ovinos e caprinos e também considerada uma zoonose ocupacional. A bactéria se caracteriza como um bacilo Gram-positivo fermentativo facultativo, não móvel, anaeróbico e não formador de esporos (Batey, 1986; Dorella et al., 2006). Esta bactéria infecta uma grande variedade de mamíferos incluindo ovinos, caprinos, bovinos, bubalinos, suínos, equinos e seres humanos (Britz et al., 2014; Araújo et al., 2016, Silva et al., 2017).

Quanto às reações bioquímicas, cepas de *C. pseudotuberculosis* se caracterizam por apresentar elevada capacidade fermentativa, fazendo uso de uma variada fonte de carboidratos, tais como glicose, ribose, frutose e maltose, com produção de ácido, entretanto, sem produzir gás. Apresentam reatividade positiva para os testes de catalase e urease, porém a habilidade na redução do nitrato é variável (Pépin et al., 1989; Selim, 2001; Guimarães et al., 2011).

A bactéria *C. pseudotuberculosis* pode ser classificada em dois biovars, ovis e equi. As cepas isoladas de ovinos e caprinos classificadas como biovar ovis, por serem geralmente negativas na atividade da redutase do nitrato, e as estirpes isoladas de cavalo e gado, que são geralmente positivas no teste de redução de nitrato, foram classificadas como biovar equi (Oliveira et al., 2016).

Um teste bioquímico bem estabelecido para identificação de bactérias do gênero *Corynebacterium* é o sistema API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France), este é composto por 21 testes bioquímicos, que podem ser realizados no período de 24 a 48 horas. O *kit* apresenta 20 tubos contendo os substratos para 11 testes enzimáticos (pirazinamidase, redução de nitrato, fosfatase alcalina, β -galactosidase, pirrolidoniil arilamidase, α -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, hidrolise de gelatina, esculina, urease e glucuronidase) e oito testes para fermentação de carboidratos composto (manitol, maltose, sacarose, glucose, D-Xylose, glicogênio, lactose e ribose) (Dorella et al., 2006).

A linfadenite caseosa é caracterizada por abscessos nos linfonodos superficiais e internos e também nos órgãos. Animais infectados podem atuar como reservatórios. A transmissão ocorre principalmente pela ruptura de abscessos externos durante o cisalhamento, a castração ou o uso de agulhas contaminadas. Fatores ambientais também influenciam na propagação desta doença, devido à presença de pontas afiadas na vegetação que podem perfurar os abscessos espalhando material purulento contendo bactérias que podem contaminar o meio ambiente e agir como uma fonte de infecção para outros animais (Binns et al., 2007; Guimarães et al., 2011; Bastos et al., 2012).

A linfadenite caseosa é uma doença de ampla distribuição mundial, sendo diagnosticada na Europa, Oceania, Américas do Sul e do Norte, Ásia, África

e o Meio Leste. A infecção por *C. pseudotuberculosis* tem se estabelecido em vários países como Brasil, Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido, Canadá e EUA, causando forte impacto econômico na caprinocultura, e principalmente na ovinocultura, devido à redução na produção de lã, carne e leite, além da condenação, no frigorífico, de carcaças e couro afetados pela doença (BAIRD e FONTAINE, 2007; DORELLA et al., 2009).

Apesar de vários países apresentarem problemas relacionados com a linfadenite caseosa, um grande número provavelmente é subnotificado, uma vez que a declaração a OIE é feita somente pelas autoridades sanitárias oficiais de cada país. Há países que tiveram esta doença relatada em artigos científicos e ainda não fizeram uma declaração oficial, incluindo o Brasil (GUIMARÃES et al., 2011).

A prevalência da LC em ovinos no estado de São Paulo chega a 71%, e a prevalência em Minas Gerais, estado onde a ovinocultura tem apresentado grande crescimento, é de aproximadamente 75,8% entre ovinos (GUIMARÃES et al., 2011) e 78,9% entre caprinos (SEYFFERT et al., 2010).

Na região Nordeste do país, região detentora do maior rebanho de ovinos e caprinos, foi observado que 88,5% (193/218) das propriedades investigadas apresentaram pelo menos um caprino soropositivo para *C. pseudotuberculosis*. As prevalências por estado estudados variaram de 70,3% em Sergipe à 94,5% no Rio Grande do Norte (Farias et al., 2018).

O controle da LC é extremamente importante para a economia brasileira e mundial, principalmente por causa das perdas econômicas na cadeia produtiva de ovinos e caprinos. No entanto, a erradicação de *C. pseudotuberculosis* é muito difícil, uma vez que não existe um teste de diagnóstico confiável, tratamento ou uma vacina eficaz para essa doença (O'Reilly et al., 2010).

O tratamento da LC pode ser feito por antibióticos, porém esta prática não é recomendada, pois a droga não consegue penetrar totalmente na cápsula do abscesso, que é composta por várias camadas espessas e rígidas. Assim, para o controle é recomendado isolar os animais infectados, desinfetar as feridas e garantir que o ambiente esteja limpo. As vacinas disponíveis no mercado não protegem totalmente os animais contra a bactéria (Williamson, 2001; O'Reilly et al., 2010). Novas vacinas contra LC estão sendo desenvolvidas e testadas em camundongos experimentais antes de serem testadas em

animais hospedeiros, entre elas as vacinas de proteínas recombinantes e de DNA. Ambas apresentam potencial protetor, sem riscos de causar a doença e, induzem resposta imune humoral e celular (Jain et al., 2014; Droppa-Almeida et al., 2016). Para testar novas vacinas contra qualquer patógeno, é essencial dispor de cepas virulentas que tenham sido isoladas, propagadas e caracterizadas quanto a gênero e espécie, para que sejam usadas em experimentos de avaliação de proteção dessas vacinas. Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar e comparar a virulência de cinco isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a reprodutibilidade da LC em camundongos BALB/c, para definir o/os isolado(s) e a dose desafio a ser utilizada em estudos de proteção, em testes de novas vacinas contra LC em camundongos.

Material e Métodos

Amostras

Foram utilizados três isolados de *C. pseudotuberculosis* obtidos de abscessos externos por punção aspirativa de linfonodos fechados de caprinos, denominados CBC 70D, CBC 118, CBC NPC e dois isolados provenientes de ovinos, CBO 2512, CBO 28033, todos obtidos de animais da Embrapa Caprinos e Ovinos da cidade de Sobral/CE. Foram utilizadas também a amostra vacinal 1002 (Linfovac) comercializada no Brasil e a amostra 00512 do banco de cepas da FIOCRUZ/ INCQS. Todas as amostras foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) Agar enriquecido com 10% de sangue desfibrinado de ovino, durante 72 horas à 37°C. Após o crescimento bacteriano, selecionaram-se colônias características, as quais foram repicadas para o caldo BHI para crescimento por 72 horas à 37°C, sob agitação constante. Em seguida, os isolados foram criopreservados em glicerol em ultrafreezer a -80°C.

Identificação bioquímica

A identificação bioquímica foi realizada por meio do kit API Coryne (APIbioMerieux, Inc., La Balme les Grottes, France), o qual consiste em ba-

terias de testes bioquímicos, e fermentação de carboidratos, seguindo-se as orientações do fabricante.

Análises de virulência

As análises de virulência dos isolados de *C. pseudotuberculosis* foram realizadas em camundongos fêmeas BALB/c (6-8 semanas), em um total de 110 animais. Sete grupos foram formados: CBC 70D, CBO 2512, CBO 28033, CBC 118, CBC NPC, como isolados testes; 1002 (Linfovac) e INCQS: 00512 (FIOCRUZ) como cepas controles positivos. Cada grupo foi subdividido em três grupos correspondentes à concentração de inoculação: 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6 UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia) com cinco animais cada. Um grupo foi inoculado com 100 μ L de tampão fosfato-salino (PBS), como controle negativo.

Para a preparação do inóculo, os isolados foram inicialmente cultivados em ágar BHI suplementado com sangue de ovino 10% desfibrinado, por 48 horas a 37°C. Após, uma colônia de cada isolado foi inoculada em meio líquido BHI e incubada a 37°C com agitação por 48 horas. Após crescimento, as culturas de cada isolado foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 10 mL de PBS, pH 7,2. As concentrações foram ajustadas para 0,1 η m por diluição, seguida de leitura na densidade óptica (OD) de 580 nm em espectrofotômetro, o que correspondeu a uma concentração final de 1×10^7 UFC/mL. A partir desta concentração de UFC foram realizadas diluições seriadas e, as doses citadas anteriormente, foram inoculadas intraperitonealmente nos camundongos, no volume final de 100 μ L. Durante um período de 30 dias pós-inoculação, os camundongos foram observados diariamente e os óbitos contabilizados. Os camundongos que apresentaram sinais de debilitação média ou avançada foram eutanasiados por deslocamento cervical para limitar a dor e o sofrimento e, registrados como óbito. A virulência dos isolados foi relacionada à taxa de mortalidade e à capacidade da bactéria de causar a doença nos camundongos. Após o óbito ou no final dos trinta dias de observação, os camundongos foram necropsiados para verificação da formação de abscessos em órgãos internos e linfonodos. Uma repetição deste experimento foi realizada nas mesmas condições.

Análise histopatológica

Durante a necropsia, amostras de tecidos de órgãos com abscessos foram removidas e fixadas em formol por 48 horas. Os fragmentos foram lavados em água corrente por 10 minutos, fixados em etanol 70% e, encaminhados ao Laboratório de Patologia da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), para serem processados para lâminas histológicas. O material foi colocado no processador automático de tecidos e, em seguida realizado o protocolo rotineiro de inclusão em parafina. Após os cortes serem seccionados no micrótomo a uma espessura de 5 µm, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H & E) (Luna, 1968) para descrição histopatológica, Masson Trichrome do kit EasyPath® para revelação da cápsula de tecido conjuntivo fibroso de abscesso e coloração histológica de Gram do método de Macallum Goodpasture para observação de colônias bacterianas. As lâminas foram observadas com o auxílio de um microscópio de luz e as imagens foram obtidas por um sistema adequado para a captação de imagens.

Ética na utilização dos animais experimentais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CEUA nº 490/2013.

Resultados e Discussão

Caracterização bioquímica

As colônias dos isolados apresentaram-se formando grupamentos ou isoladas, de coloração branca ou creme de aparência opaca em meio sólido. Estas características estão conforme descrito por Muckle et al. (1982). No presente estudo foram observadas duas características peculiares quanto ao crescimento das colônias dos isolados no meio sólido, que foi a formação de uma zona de hemólise em volta da colônia, e o completo deslocamento das colônias sob o meio sólido, quando tocada por uma alça, observados também por Connor et al. (2000). Em meio líquido houve a formação de uma película na superfície do caldo, ou a formação de um halo em volta do tubo Falcon® (Batey, 1986).

A partir do teste bioquímico API Coryne (API-bioMerieux France), as cinco amostras isoladas de caprinos e ovinos foram confirmadas como pertencentes à espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* com o kit API Coryne (APIbioMerieux-França).

	CBC 70D	CBO 2512	CBO 28033	CBC 118	CBC NPC
NIT ^a	N	N	N	N	N
PYZ ^b	N	N	N	N	N
PyrA ^c	N	N	N	N	N
PAL ^d	N	N	N	N	N
β -GUS ^e	N	N	N	N	N
β -GAL ^f	N	N	N	N	N
α -GLU ^g	N	N	N	N	N
β -NAG ^h	N	N	N	N	N
ESC ⁱ	N	N	N	N	N
URE ^j	P	P	P	P	P
GEL ^k	N	N	N	N	N
O ^l	N	N	N	N	N
GLU ^m	P	P	P	P	P
RIB ⁿ	P	P	P	P	P
XYL ^o	N	N	N	N	N
MAN ^p	N	N	N	N	N
MAL ^q	P	P	N	N	P
LAC ^r	N	N	N	N	N

^aRedução de Nitrato, ^bPirazinamidase, ^cPirrolidoniol Arilamidase, ^dFosfatase alcalina, ^eBeta-glucuronidase, ^fBeta-Galactosidase, ^gAlfa-glucosidade, ^hBeta-N-acetil- β -glucosaminidase, ⁱEsculina, ^jUrease, ^kGelatina (hidrólise), ^lLiberção de oxigênio, ^mGlucógeno, ⁿRibose, ^oXilose, ^pManitol, ^qMaltose, ^rLactose. **N:** Negativo, **P:** Positivo.

As amostras utilizadas no presente estudo foram caracterizadas bioquimicamente pela produção de catalase, urease, fermentação de carbonos como, frutose, manose, galactose, glicose, sem liberação de gás (Dorella et al., 2006, Bastos et al., 2012). Huerta et al. (2013) realizaram um estudo com

testes bioquímicos que analisou o kit API Coryne (Merieux) quanto sua utilidade em laboratório de microbiologia, para identificar *C. pseudotuberculosis*, e concluiu que se trata de um método altamente recomendável.

A realização das provas bioquímicas possui uma importância significativa para que se possa classificar a qual biovar pertence a amostra. Essa diferenciação é dada pela redução de nitrato. Quando o resultado é negativo, a espécie pertence ao biovar ovis, que infecta caprinos e ovinos, e se o resultado for redução de nitrato positivo, a amostra pertence ao biovar equi, que infecta os equinos e bovinos (Hassan et al., 2012).

Os cinco isolados analisados nesse estudo foram negativos para a redução de nitrato, e de acordo com a literatura consultada, foram classificados como *C. pseudotuberculosis* biovar ovis, responsável por infectar preferencialmente ovinos e caprinos (Connor et al., 2000).

Análise de Virulência

Os sinais apresentados pelos camundongos inoculados com os isolados de *C. pseudotuberculosis* foram pelos eriçados, mobilidade limitada, aparência apática e mudança na cor natural do pelo para a cor amarela (Figura 1b),



Figura 1. Camundongos BALB/c fêmeas utilizadas no experimento de análise de virulência: (a) grupo controle inoculado com PBS (tampão fosfato-salino), com aspecto sadio e coloração natural; (b) Animal infectado intraperitonealmente com *C. pseudotuberculosis* exemplo da amostra CBO 2512 com 1×10^6 UFC/mL, a imagem evidencia os pelos eriçados.

quando comparados ao grupo controle (Figura 1a). Os pelos eriçados foram os primeiros sinais a aparecer, logo no 3º dia de infecção, seguido de coceira intensa e aumento no consumo de água. O comprometimento foi progressivo

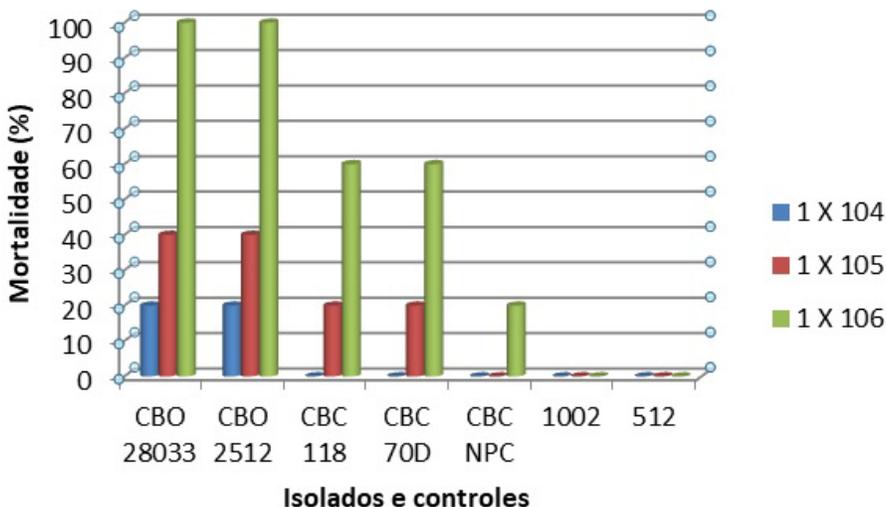


Figura 2. Representação gráfica da taxa de mortalidade dos camundongos inoculados com as amostras de *C. pseudotuberculosis* isoladas a partir de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa. Os animais foram inoculados intraperitonealmente, no volume de 100 µL por camundongo com 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 UFC/mL e monitorados por um período de 30 dias, para verificação e contagem dos óbitos. As amostras CBO 2512 e CBO 28033 foram isoladas de ovinos e as amostras CBC 118, CBC 70D E CBC NPC foram isoladas de caprinos. As amostras 1002 (Linfovac) e 00512 (Fiocruz) não induziram mortalidade.

nos animais dos grupos mais virulentos, que morreram. Os camundongos moribundos foram sacrificados por deslocamento cervical e contados como óbito no grupo devido.

A taxa de mortalidade dos camundongos pode ser observada de acordo com a porcentagem de mortes e o número de UFC/mL inoculada nos camundongos (Figura 2).

As amostras CBO 2512 e CBO 28033, isoladas de abscessos de ovinos foram consideradas as mais virulentas, uma vez que induziram maior número de óbitos em camundongos. Na 3ª semana, os grupos inoculados com 1×10^6 UFC/mL de ambos isolados apresentaram 100% (5/5) de mortalidade,

diminuindo para 20% e 40% o número de camundongos mortos aos 30 dias a 1×10^4 UFC/mL e 1×10^5 UFC/mL, respectivamente. A dosagem de 1×10^5 UFC/mL, em um período de observação de 30 dias, causou alterações consideráveis nos camundongos, quando comparados aos camundongos dos outros grupos e principalmente ao grupo PBS. Com sete dias de observação, foi possível identificar a pelagem eriçada de todos os animais deste grupo. Ao redor do 15º dia de observação, alguns animais deste grupo já apresentavam sinais de inapetência, desidratação e apatia. Aos 21 dias pós-inoculação ocorreu 80% de óbitos, sendo que o último sobrevivente foi eutanasiado aos 30 dias por apresentar apatia severa.

Os grupos cujos camundongos foram inoculados com as amostras CBC 118 e CBC 70D, isoladas de abscessos caprinos, apresentaram 20% e 60% de mortalidade que receberam 1×10^5 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL, respectivamente. A amostra CBC NPC, isolada também de um abscesso de cabra, apresentou-se menos virulenta porque induziu apenas 20% de mortalidade quando os camundongos foram inoculados com 1×10^6 UFC/ml. Não foram observados óbitos nos camundongos inoculados com as amostras controle, 1002 (Linfovac) e 00512 (FIOCRUZ), incluindo PBS.

A amostra vacinal 1002 atualmente comercializada no Brasil foi desenvolvida a partir de uma cepa naturalmente de baixa virulência, a qual foi identificada por meio de testes in vivo, por Ribeiro et al. (1991).

A amostra INCQS 00512 foi utilizada em alguns trabalhos, envolvendo a construção e avaliação de vacinas e mutantes. Dorella et al. (2006) realizaram um estudo tendo por um dos objetivos a avaliação in vivo do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativas, contra *C. pseudotuberculosis* em modelo murino. Anteriormente aos testes vacinais, foi realizado um experimento piloto para estipular a dose letal em camundongos BALB/c entre 6 a 8 semanas. A amostra 00512 foi utilizada como controle negativo no experimento teste de imunização com as linhagens recombinantes, pois esta amostra até a concentração de 1×10^6 , mostrou-se incapaz de conferir virulência e patogenicidade. No presente estudo, esta amostra também foi incapaz de causar morte e conferir doença nos camundongos.

Análises patológicas

Os animais sobreviventes e sacrificados foram avaliados por necropsia, constatando-se a presença de abscessos. Em alguns animais houve a formação de mais de um abscesso e, em diferentes órgãos. Os órgãos afetados foram fígado, baço, intestino, rim e estômago, sendo o fígado o mais afetado. Observou-se também a formação de abscessos subcutâneos e na cavidade abdominal. Apenas as amostras 1002 (Linfovac) e 00512 (Fiocruz) não foram capazes de causar a formação de abscessos em camundongos.

Os abscessos apresentaram uma morfologia uniforme quando examinados macroscopicamente, com uma forma arredondada amarelada, devido ao material purulento localizado na cápsula de abscesso (Figuras 3a e 3b). A análise microscópica evidenciou uma cápsula fibrosa, uma zona intermediária contendo células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos e plasmócitos, e uma área de necrose (Figura 3c). Estas características foram observadas independentemente do número de UFC inoculadas.

Para demonstrar as fibras do tecido conjuntivo da cápsula dos abscessos foi realizada a coloração Trichrome de Masson, que evidenciou as fibras de colágeno em azul (Figura 3d).

Além de macroabscessos houve a formação de microabscessos indicando uma concentração de neutrófilos, característica da formação inicial de um abscesso (Figura 3e). Os esfregaços corados com Gram evidenciaram colônias azuis, características de bactérias Gram-positivas, como *C. pseudotuberculosis* (Figura 3f). As células inflamatórias mais comuns observadas nos abscessos foram neutrófilos, macrófagos, plasmócitos, células epitelioides e células gigantes.

As análises anatomopatológicas dos órgãos dos camundongos inoculados com os isolados de *C. pseudotuberculosis* mostraram que os abscessos encontrados neste estudo, se assemelham quanto à estrutura, alterações desenvolvidas pela infecção natural em caprinos e ovinos, caracterizada por uma estrutura em formato lamelar, com deposição de material caseoso e uma cápsula espessa e rígida (Fontaine & Baird, 2008; Jesse et al., 2011).

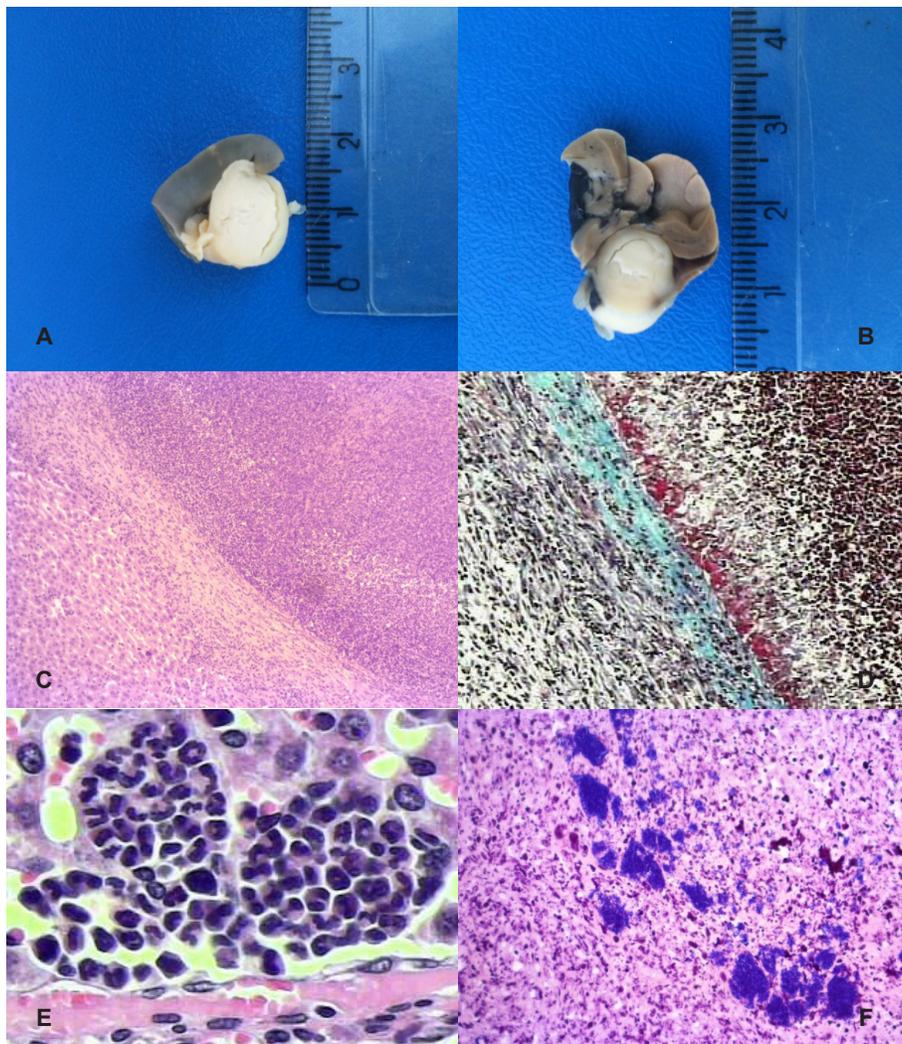


Figura 3. Fotografias e fotomicrografias de cortes histológicos de fígado representativos de camundongo inoculado com *C. pseudotuberculosis*. **A:** Aspecto macroscópico de um abscesso localizado no baço, **B:** Abscesso localizado no fígado. **C:** Aspecto microscópico de um abscesso no fígado, notar a junção do tecido hepático normal (*) e o abscesso. Destacando-se a cápsula do abscesso formada por tecido conjuntivo fibroso (+), área de infiltrado inflamatório (#) e área necrótica (seta) (H&E, objetiva 10X). **D:** Evidencia as fibras de colágeno coradas em azul (Tricrômio de Masson, objetiva 10 X). **E:** Microabscesso, evidenciando o acúmulo de neutrófilos (H&E, objetiva 40 X). **F:** Presença de colônias, agrupadas ou isoladas, coradas em azul (Gram histológico, objetiva 40X).

Estudos anteriores demonstraram por meio da inoculação experimental de *C. pseudotuberculosis* em camundongos, que independentemente do local de infecção da bactéria, a disseminação ocorre por todo o organismo, onde se locomovem em fagócitos, ou até mesmo livres, com predominância nos órgãos do sistema mononuclear fagocitário tanto em linfonodos e baço, quanto em intestinos, fígado, rins e pulmões (Motta et al., 2010). No presente estudo o fígado foi o órgão mais acometido pelos abscessos. Outros órgãos também apresentaram abscessos, como intestino, rim, baço e estômago, também relatado por Jesse et al. (2011).

Jesse et al. (2011) relataram que após 15 horas da inoculação, foi possível observar alterações histológicas nos camundongos. Pépin et al. (1991) indicaram que 24 horas após a inoculação é possível verificar que há formação de microabscessos próximo ao local de infecção. Em nosso estudo, as análises histopatológicas ocorreram nos camundongos eutanasiados entre 20 e 30 dias após a infecção experimental, os quais também, por meio da análise microscópica, apresentaram a formação de microabscessos.

As células inflamatórias mais encontradas foram os neutrófilos, macrófagos, plasmócitos, linfócitos e células gigantes. Os neutrófilos foram os mais frequentes, notando-se também um alto número de neutrófilos degenerados (piócitos), principalmente no centro necrótico, relatados também por Lan (1998).

A presença de colônias bacterianas foi confirmada pelo método de Gram histológico em cortes de abscessos. Geralmente o método de Gram é realizado em esfregaços bacteriológicos. Em cortes histológicos, esse é o primeiro estudo de *C. pseudotuberculosis*, a utilizar o método de Gram Histológico de Macallum Goodpasture. Souza et al. (2011) mostraram a presença de grandes colônias bacterianas, mas utilizando a coloração de H&E.

A coloração de tricrômico de Masson tem sido utilizada para demonstrar a presença de fibras de tecido conjuntivo, em processos inflamatórios e de reparo (Andreazza, 2011). Em nosso estudo observou-se que a cápsula dos abscessos formados pela *C. pseudotuberculosis* foi melhor demonstrada por esta coloração, inclusive pela facilidade de distinguir a parte normal do tecido da parte com o abscesso, limite demarcado pela cápsula.

As análises histopatológicas não demonstraram diferenças na formação microscópica dos abscessos entre as amostras que foram capazes de conferir a lesão, e independentemente da quantidade de UFC/mL inoculadas, as lesões apresentaram uma morfologia padrão.

Conclusões

Conclui-se neste estudo que os isolados CBO 2512 e CBO 28033 caracterizados bioquimicamente como *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* apresentaram-se como os mais virulentos e capazes de desenvolver a linfadenite caseosa em camundongos, com as dosagens de 1×10^5 e 1×10^6 UFC/mL e serão utilizados nos experimentos de desafio e proteção de vacinas em desenvolvimento pela Embrapa Gado de Corte.

Agradecimentos

À Embrapa Gado de Corte pelo apoio financeiro ao projeto e local de realização deste trabalho e ao Laboratório de Patologia do Hospital Veterinário da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), pelas análises patológicas realizadas.

Referências

ANDREAZZA, D. Caracterização patológica e imuno-histoquímica das lesões de actinobacilose em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 305-309, 2011.

ARAÚJO, C. L.; DIAS, L. M.; VERAS, A. A.; ALVES, J. T.; CAVALCANTE, A. L.; DOWSON, C. G.; AZEVEDO, V.; RAMOS, R. T.; SILVA, A.; CARNEIRO, A. R. Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* 262 biovar *equi* isolated from cow milk. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. 1-2, 2016.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.

BASTOS, B. L.; PORTELA, D. R. W.; DORELLA, F. A.; RIBEIRO, D.; SEYFFERT, N. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. *Clinical & Cellular Immunology*, doi: 10.4172/2155-9899.S4-005, 2012.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, 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**, v. 123, n. (1-3), p. 169-179, 2007.
- BRITZ, E.; SPIER, S. J.; KASS, P. H.; EDMAN, J. M.; FOLEY, J. E. The relationship between *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi phenotype with location and extent of lesions in horses. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 282–286, 2014.
- CONNOR, K. M.; QUIERIE, M. M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2633–2637, 2000.
- DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, p. 201-218, 2006.
- DROPPA-ALMEIDA, D.; VIVAS, W. L.; SILVA, K. K.; REZENDE, A. F.; SIMIONATTO S, MEYER R, LIMA-VERDE IB, DELAGOSTIN O, BORSUK S, PADILHA FF. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, p. 1091-1996, 2016.
- FARIAS, A. M.; ALVES, J. R. A.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LIMA, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Soroprevalência da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos no Nordeste brasileiro utilizando técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA-indireto). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p.1344-1350, 2018.
- FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 42-48, 2008.
- GUIMARÃES, A. S.; CARMO, F. B.; PAULETTI, R. B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **The IIOAB Journal**, v. 2, p. 33-43, 2011.
- HASSAN, S. S.; PEREIRA, U. P.; ISLAM, A.; ALI, A.; BAKHTIAR, S. M.; RIBEIRO, D.; SANTOS, A. R.; SOARES, S. C.; DORELLA, F.; PINTO, A. C.; SCHENEIDER, M. P. C.; BARBOSA, M. S.; ALMEIDA, S.; ABREU, V.; ABURJAILE, F.; CARNEIRO, A. R.; CERDEIRA, L. T.; FIAUX, K.; BARBOSA, E.; DINIZ, C.; ROCHA, F.; RAMOS, R. T. J.; JAIN, N.; TIWARI, S.; DEBMALYA, B.; MIYOSHI, A.; MULLER, B.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis strain P54B96 isolated from antelope in South Africa obtained by rapid next generation sequencing technology. **Stand Genomic Science**, v. 7, p. 189-199, 2012.
- HUERTA, B.; GÓMEZ-GASCÓN, L.; VELA, A. I.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; CASAMAYON, A.; TANADAS, C.; MALDONADO, A. Comparison of two biochemical methods for identifying *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep and goats. **The veterinary Journal**, v. 196, p. 552-554, 2013.
- JAIN, S.; AFLEY, P.; DOHRE, S. K.; SAXENA, N.; KUMAR, S. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmid DNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 32, p. 4537-4542, 2014.
- JESSE, F. F. A.; SANG, S. L.; SAHAREE, A. A.; SHAHIRUDIN, S. Pathological Changes in the Organs of Mice Model Inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* Organism. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, p. 145–149, 2011.

- LAN, D. T. B.; TANIGUCHI, S.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology and Immunology**, v. 42, p. 863–870, 1998.
- MOTTA, R. G.; CREMASCO, A. C. M.; RIBEIRO, M. G. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 17, p. 200-213, 2010.
- MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 46, p. 206-208, 1982.
- OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, P.; AZEVEDO, M.; JAMAL, S. B.; TIWARI, S.; ALMEIDA, S.; SILVA, A.; BARH, D.; DORNELES, E. M. S.; HAAS, D. J.; HEINEMANN, M. B.; GHOSH, P. LAGE, A. P.; FIGUEIREDO, H.; FERREIRA, R. S.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be under anagenesis and biovar Equi forms biovar Ovis: a phylogenetic inference from sequence and structural analysis. **BMC Microbiology**, v. 16, p.100, 2016.
- 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 abscesses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, P. 115–126, 2010.
- PÉPIN, M.; BOISRAMÉ, A.; MARLY, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v. 20, n. 1, p. 111-115, 1989.
- PEPIN, M.; PARDON, P.; LANTIER, F.; MARLY, J.; LEVIEUX, D.; LAMAND, M. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: Kinetics of bacterial dissemination and inflammation. **Veterinary Microbiology**, v. 26, p. 381-392, 1991.
- 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**, v. 26, n. 4, p. 461–465, 1991.
- SELIM, A. S. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 48, p. 241-258, 2001.
- SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research Veterinary Science**, v. 88, n.1, p. 50-55, 2010.
- SILVA, W. M.; FOLADOR, E. L.; SOARES, S. C.; SOUZA, G. H. M. F.; SANTOS, A. V.; SOUSA, C. S.; FIGUEIREDO, H.; MIYOSHI, A.; LE LOIR, Y.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. Label-free quantitative proteomics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates reveals differences between Biovars *ovis* and *equi* strains. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 451, 2017.
- SOUZA, M. F.; CARVALHO, A. Q.; GARINO, F.; RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslançados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 224-230, 2011.
- WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet Clin N Am*: **Food Anim Prat**, v. 17, p. 359-371, 2001.

Embrapa

Gado de Corte



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 15152