

**ALESSANDRO DE SÁ GUIMARÃES**

**EPIDEMIOLOGIA DA LINFADENITE CASEOSA OVINA  
NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do  
grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

Co-orientadores: Profa. Dra. Aurora Maria Guimarães Gouveia  
Prof. Dr. Andrey Pereira Lage  
Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
Dezembro de 2009

G963e Guimarães, Alessandro de Sá, 1971-

Epidemiologia da linfadenite caseosa ovina no estado Minas Gerais,  
Brasil / Alessandro de Sá Guimarães - 2009.

83 p. : il.

Orientador: Marcos Bryan Heinemann

Co-orientadores: Aurora Maria Guimarães Gouveia, Andrey Pereira  
Lage, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

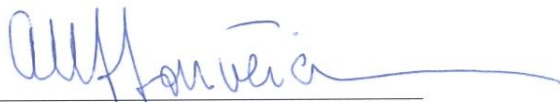
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de  
Veterinária

Inclui bibliografia

1. Ovino – Doenças – Teses. 2. Ovino – Criação - Teses– 3. Linfadenite  
caseosa – Teses. 4. Epidemiologia – Teses. I. Heinemann, Marcos Bryan.  
Gouveia, Aurora Maria Guimarães. III. Lage, Andrey Pereira. IV. Azevedo,  
Vasco Ariston de Carvalho. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola  
de Veterinária. VI. Título.

CDD – 636.308 96

Tese defendida e aprovada em 18 de dezembro de 2009, pela Comissão Examinadora  
constituída por:



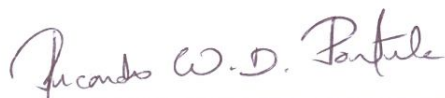
---

Prof.<sup>a</sup>. Aurora Maria Guimarães Gouveia  
(Presidente)



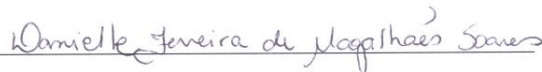
---

Dr.<sup>a</sup>. Ana Paula Reinato Stynen



---

Prof. Ricardo Wagner Dias Portela



---

Prof.<sup>a</sup>. Danielle Ferreira de Magalhães Soares



---

Prof. Francisco Carlos Faria Lobato



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de aprender cada dia mais.

Aos meus pais, Geraldo Nogueira Guimarães e Sônia Maria de Sá Guimarães pelo amor, carinho, ensinamentos e apoio constantes em todos os momentos da vida.

A minha querida filha Amanda Oliveira de Sá Guimarães, fonte de vida e de alegria.

A minha irmã Daniela de Sá Guimarães, pela amizade.

Ao amigo Filipe Borges do Carmo, sem o qual esse trabalho seria praticamente impossível.

À orientadora Profa. Aurora Maria Guimarães Gouveia pelos ensinamentos durante essa jornada.

Aos orientadores Profs. Andrey Pereira Lage, Marcos Bryan Heinemann e Vasco Ariston de Carvalho Azevedo pelo apoio e ensinamentos durante os quatros anos de trabalho.

Aos amigos e Profs. Alan Maia Borges e Renato Lima Santos pela amizade e valiosos conselhos durante todo o processo.

A todos os alunos de iniciação científica e pós-graduação (mestrado e doutorado) que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução desse projeto, em especial aqueles do Laboratório de Bacteriologia Aplicada (LBA), Laboratório de Sanidade de Ovinos e Caprinos (LASOC), ambos da Escola de Veterinária da UFMG, Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG) e Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciência da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA).

A senhora Maria Anita Guimarães e Fernando Guimarães Gouveia pela amizade e hospitalidade com que me receberam em sua casa.

A Eliane, secretária da professora Aurora pela amizade e apoio.

Ao Dr. Altino Rodrigues Neto, Diretor Presidente do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), por nos proporcionar o apoio técnico e financeiro, indispensáveis na realização de parte deste trabalho.

A todos os médicos veterinários do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) pelo apoio na aplicação dos questionários aos ovinocultores de Minas Gerais.

A Superintendência Federal da Agricultura SIPAG/DT-MG, na pessoa do médico veterinário Belfort Rodriguez Dieguez, Fiscal Federal Agropecuário pelo fornecimento dos dados estatísticos relativos ao SIF abate ovinos e por sua paciência em receber-nos com tanta boa vontade.

À Caprileite/ACCOMIG pelo apoio na divulgação das informações por meio de seus veículos de comunicação com os criadores.

A todos os criadores de ovinos que contribuíram para realização deste trabalho.

A todos os professores que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação pessoal e profissional.

A todas as pessoas que porventura não tenham sido mencionadas, mas participaram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

---

## **APOIO FINANCEIRO**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida ao aluno Alessandro de Sá Guimarães durante o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do CNPq pelo apoio financeiro aos laboratórios LASOC – DMVP – EV – UFMG e LGCM – DBG – ICB – UFMG.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária, Superintendência Federal de Agricultura (SFA/MAPA) e Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais (Caprileite/ACCOMIG) pelo custeio e organização da etapa de coleta de amostras e aplicação de questionários em criatórios ovinos de Minas Gerais.

À Rio Branco Alimentos (Programa Pif Paf Ovinos) pelo custeio de deslocamentos, hospedagem e alimentação dos dois médicos veterinários pós-graduandos da EV-UFMG, durante seis meses de coleta de amostras na indústria em Patrocínio.

À FAPEMIG pelo financiamento do Projeto CVZ APQ 3283-5.04/07

### **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Rio Branco Alimentos SA, por permitir nosso acesso a sua indústria para coleta de informações e de amostras de ovinos nos abates ocorridos dentro do Programa Pif Paf Ovinos.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa tese a minha avó Luci Guimarães (em memória), exemplo de fé e dedicação à família;

Ao meu avô Ilídio de Sá (em memória), exemplo de bom senso e honestidade, homem de palavras certas em momentos certos;

Dedico também a minha avó Maria Nogueira Maia de Sá (em memória);

Dedico também aos meus pais que sempre valorizaram a cultura como fonte de transformação do ser humano, investindo o que tinham e o que não tinham na educação dos seus filhos.



## SUMÁRIO

---

	Pág.
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	13
<b>RESUMO</b> .....	15
<b>ABSTRACT</b> .....	16
1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 <b>OBJETIVOS</b> .....	18
1.1.1 <b>Objetivo geral</b> .....	18
1.1.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	18
2. Capítulo 1 <b>CASEOUS LYMPHADENITIS: EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND CONTROL</b> .....	19
3. Capítulo 2 <b>CASEOUS LYMPHADENITIS IN SHEEP FLOCKS OF THE STATE OF MINAS GERAIS, BRAZIL: PREVALENCE AND MANAGEMENT SURVEYS</b> .....	39
4. Capítulo 3 <b>LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO DE MINAS GERAIS: CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FORNECEDORAS DE OVINOS AO FRIGORÍFICO E SOROEPIDEMIOLÓGICA A PARTIR DE SOROSCOLETADOS</b> .....	51
4.1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	52
4.2 <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
4.2.1 Marco amostral .....	52
4.2.2 Exame e identificação ante mortem dos ovinos e coleta de material no frigorífico .....	54
4.2.3 Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti- <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	55
4.2.4 Coleta de conteúdo de abscessos .....	55
4.2.5 Isolamento bacteriano nas amostras coletadas .....	56
4.2.6 Identificação bioquímica dos isolados .....	57
4.2.7 Extração do DNA total a partir de culturas .....	58
4.2.8 Primers e PCR multiplex de material cultivado .....	58
4.3 <b>RESULTADOS</b> .....	59
4.3.1 Resultados obtidos a partir do questionário aplicado em propriedades fornecedoras do frigorífico em Minas Gerais .....	59
4.3.2 Linfadenite caseosa em soros ovinos abatidos em frigorífico de Minas Gerais .....	61
4.3.3 Ocorrência de nódulos caseosos nas carcaças de ovinos em frigorífico de Minas Gerais .....	61
4.3.4 Isolamento e identificação por provas bioquímicas e PCR multiplex (PCRm) de material cultivado .....	61
4.3.5 Bacterioteca de isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i> de Minas Gerais .....	62

---

4.4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
4.4.1	Caracterização das propriedades fornecedoras para frigorífico em Minas Gerais.....	62
4.4.2	Caracterização soropidemiológica da linfadenite caseosa em ovinos.....	64
4.4.3	Bacterioteca de isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i> de Minas Gerais.....	68
5. Capítulo 4	<b>CONCLUSOES E PERSPECTIVAS</b> .....	69
5.1	<b>Conclusões</b> .....	70
5.2	<b>Perspectivas</b> .....	70
6	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	70
7	<b>ANEXOS</b> .....	79
7.1	<b>Anexos 1</b> .....	79
7.1.1	Artigos publicados e resumos apresentados em congressos durante o doutorado.....	79
7.1.2	Artigos submetidos em periódicos (no prelo).....	80
7.2	<b>Anexos 2</b> .....	81
7.2.1	Soluções para extração de DNA bacteriano.....	81
7.3	<b>Anexos 3</b> .....	82
7.3.1	Questionário aplicado aos fornecedores de ovinos para.....	82

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1	Ocorrência de linfadenite caseosa em ovinos e caprinos no Brasil por ano, unidade da Federação e ferramentas de diagnóstico, 2009. ....	18
<b>Capítulo 1</b>		
Tabela 1	Principal phenotypic characteristics of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> used for identification.....	22
Tabela 2	.Principal phenotypic characteristics of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> used for identification.....	29
<b>Capítulo 2</b>		
Tabela 1	Frequency distribution of seropositive sheep based on ELISA for <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> in Minas Gerais, Brazil, 2002.....	44
Tabela 2	Principal management practices identified among the 97 sheep herds studied to determine caseous lymphadenitis incidence in the state of Minas Gerais, Brazil, 2002. ....	44
Tabela 3	Risk analysis of variables that are predictors of risk for caseous lymphadenitis in sheep farms in Minas Gerais. ....	45

---

<b>Capítulo 3</b>		
Tabela 1	Bactérias utilizadas como controles positivo e negativo para provas bioquímicas, para identificação de <i>C. pseudotuberculosis</i> de Minas Gerais, 2007. ....	57
Tabela 2	Primers de oligonucleotídeos utilizados na PCR multiplex, para identificação de <i>C. pseudotuberculosis</i> de Minas Gerais, 2007. ....	59
Tabela 3	Distribuição das propriedades fornecedoras de ovinos para frigorífico em Minas Gerais quanto à anotação dos animais com abscessos, idade em que apresentam abscessos, sua localização e atitude do responsável em caso de recidivas, 2007. ....	59
Tabela 4	Distribuição das propriedades fornecedoras de ovinos para frigorífico em Minas Gerais quanto ao manejo dos animais com abscessos, destino do material descartado, utilização de dreno no local na incisão e cauterização interna do abscesso com iodo, 2007. ....	60
Tabela 5	Distribuição das propriedades de ovinos em Minas Gerais quanto ao conhecimento do potencial zoonótico da linfadenite caseosa, destino dos animais e informação de perdas durante o abate por linfadenite caseosa no frigorífico, 2007. ....	60
Tabela 6	Distribuição das propriedades com ovinos em Minas Gerais quanto à presença de assistência veterinária, desinfecção de instalações e tipo de cerca utilizada, 2007. ....	61
Tabela 7	Distribuição de frequência de resultados sorológicos positivos por ELISA para detecção de anticorpos contra <i>C. pseudotuberculosis</i> em soros de ovinos procedentes de Minas Gerais, coletados em frigorífico, Patrocínio (MG), 2007. ....	61
Tabela 8	Distância, em quilômetros, entre Patrocínio (MG), município sede da indústria frigorífica, e os municípios de Minas Gerais com propriedades que forneceram ovinos para abate no período de julho a dezembro, 2007. ....	67

#### LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo 1</b>		
Figura 1	201 countries that reported their sanitary situation to the World Animal Health Organization (OIE), 1996 – 2004. ....	23
Figura 2	Condemnation of sheep carcass at slaughterhouse inspection. A. Pre-scapular lymph node. B. Superficial lymph node. Arrows indicate pre-scapular lymph nodes with caseous material, characteristic of caseous lymphadenitis in federally inspected slaughterhouse. ....	24
Figure 3	A. Two caeous abscesses, one spontaneous opened and other closed. B. Ocular and cutaneous infection of sheep with caseous material. ....	26
<b>Capítulo 2</b>		
Figura 1	Municipalities with sampled flocks in Minas Gerais State, Brazil. ....	42

---

	<b>Capítulo 3</b>	
Figura 1	Municípios em Minas Gerais com propriedades fornecedoras de ovinos para abate inspecionado em Patrocínio (circulado), 2007 .....	53
Figura 2	A. Coleta de soro na mesa de sangria de frigorífico; B. Tubos devidamente identificados, em repouso para dessoragem, em Patrocínio, Minas Gerais, 2007 .....	54
Figura 3	A. Conteúdo caseoso em linfonodo pré-escapular. B. Corte em cruz no membro dianteiro indicador de descarte em função de lesão típica de linfadenite caseosa .....	56
Figura 4	Gel de agarose com PCR multiplex do DNA extraído de isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i> A. Canaleta 1: marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); canaleta 2: isolado positivo; canaleta 3: isolado negativo; canaletas 4-9: isolados positivos; canaleta 10: controle positivo amostra 1002; canaletas 11-20: isolados positivos; canaleta 21 .....	62

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACCOMIG	Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais
BA	Bahia
BHI	Infusão Cérebro Coração
CAMP	Christie, Atkins, Munch, Petersen (prova de CAMP)
CE	Ceará
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade ótica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EV-UFMG	Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
FAPEMIG	Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais
GEPOC	Grupo de Extensão da Pesquisa em Ovinos e Caprinos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
IHS	Inibição da hemólise sinérgica
H	hora
HCl	Ácido clorídrico
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
Kb	quilobases ( $10^3$ pb)
KCl	Cloreto de potássio
LASOC	Laboratório de Sanidade em Ovinos e Caprinos (EV – UFMG)
LGCM	Laboratório de Genética Celular e Molecular (ICB – UFMG)
$\mu$ L	Micro litro
$\mu$ M	Micromolar
M	Molar
Mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
Min	minutos
mL	Mililitro
mM	milimolar
NaAc	Acetato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
°C	Graus Celsius
OIE	Escritório Internacional de Epizootias
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T20	Tampão salina fosfato acrescido de Tween 20
PCRm	Reação em cadeia da polimerase multiplex
RNA	Ácido ribonucléico
Rnase	Ribonuclease
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SRD	Sem raça definida
Taq	Thermus aquaticus
U	Unidade
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## RESUMO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, de distribuição mundial e causa consideráveis prejuízos econômicos que vão desde a condenação de peles e carcaças em razão de abscessos, até expressivas perdas em eficiência na reprodução ou na produção de lã, carne e leite. Diante da necessidade constante de atualização de informações sobre o agente e a doença, decidiu-se fazer artigo de revisão sobre a LC, apresentado nessa tese. A carência de informações relativas ao status sorológico da LC em Minas Gerais motivou a realização de levantamento sorológico com teste de ELISA indireto em 642 soros ovinos coletados em 97 propriedades do Estado no ano de 2002, bem como aplicação de questionário junto aos criadores. A prevalência real encontrada foi de 75,8% nos ovinos testados e 95,9% de propriedades positivas. Não houve relação entre soropositividade e sexo dos animais, mas houve com animais com idade acima de 12 meses e com os puros nacionais, representados pelas raças Santa Inês, Morada Nova e Somalis. Nenhum ovinocultor afirmou utilizar vacina contra LC no rebanho. Apenas 11,3% afirmaram ter LC no rebanho, em contraste com alta soropositividade de animais e de propriedades. A grande maioria, 93,8%, afirmou não separar animais com sinais clínicos de LC; 77,3% não identificam individualmente os animais e 58,8% relatou possuir assistência técnica. Em 2007, foi feita a caracterização das propriedades fornecedoras de ovinos para frigorífico de Patrocínio, Minas Gerais, realizada através da aplicação de questionário aos responsáveis pelas propriedades, em que foi detectado manejo deficiente para controle da LC, pois nenhum criador citou a eliminação do animal com LC clínica, apenas 3,3% queimavam e enterravam o material proveniente da manipulação dos abscessos, 98,3% não utilizavam dreno após tratamento desses, 86,7% não faziam anotação dos animais com sinais clínicos. A visualização dos abscessos foi mais frequente na região da cabeça e pescoço, apenas 1,7% descartavam o animal em casos de recidivas de abscessos, 10% conheciam o potencial zoonótico da LC e 11,7% possuíam assistência veterinária; para a caracterização soroepidemiológica da LC, foram coletados 805 soros de ovinos procedentes de em 23 propriedades e 285 amostras de material caseoso provenientes de 21 propriedades fornecedoras de ovinos para mesmo frigorífico, coletadas em 2007. A positividade para LC foi de 46,8% dos ovinos abatidos e 100% das propriedades fornecedoras; 15,3% (348/2270) das carcaças apresentaram linfonodos superficiais acometidos, 8,9% (203/2270) apresentaram abscessos em órgãos (pulmão, fígado e intestinos) e 0,6% (14/2270) das carcaças foram condenadas. O *C. pseudotuberculosis* foi isolado e identificado em 72,6% (207/285) das amostras coletadas de material purulento, através de características morfotintoriais, provas bioquímicas e PCR multiplex.

Palavras-chave: Epidemiologia, linfadenite caseosa, caracterização soroepidemiológica, ovinocultura, Minas Gerais, frigorífico ovino

## ABSTRACT

Caseous Lymphadenitis (CL) is a disease of worldwide occurrence caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. It inflicts considerable economic losses due to decreased wool, meat, and milk production, impaired reproduction efficiency, and carcass and leather condemnation due to abscesses. A review of the literature concerning CL was made and incorporated into this thesis. The lack of information about the serological status of sheep herds in Minas Gerais, Brazil, motivated the serological survey herein described. Ovine sera (n=642) collected from 97 properties in the State of Minas Gerais, Brazil, in 2002 were analyzed by Indirect ELISA tests. Additionally, questionnaires were filled out for the producers surveyed. The real prevalence of positive animals was 75.8%, with 95.9% of herds positive for CL. There was no relation between positive serology and gender, although age over 12 months and pure Brazilian breeds (Santa Inês, Morada Nova, and Somalis breeds) were related to positive serology. No producer stated to use vaccine against CL. Despite the high positive serology of both animals and herds, only 11.3% of producers stated to have CL in their properties. Most producers (93.8%) affirmed not to segregate animals with clinical signs of CL from the herd, 77.3% don't identify animals individually, and 58.8% reported to have technical assistance available. In 2007, suppliers of sheep to a slaughterhouse in Patrocínio, Minas Gerais, Brazil, were characterized by a questionnaire. Defficient management for control of CL was detected in the answers, since no producer stated to eliminate animals with clinical CL, only 3.3% burned and buried the material from manipulation of abscesses, 98.3% didn't use any drainage after abscess manipulation, and 86.7% of producers kept no record of animals with clinical signs of CL. Moreover, abscesses were visualized most frequently around the head and neck, only 1.7% of producers culled animals with recidiving abscesses, 10% knew the zoonotic potential of CL, and 11.7% of concerns had veterinary assistance available. Still in 2007, a seroepidemiological characterization of CL in this same region was performed. Ovine sera (n=805) from 23 supplier properties and caseous material (n=285) from 21 supplier properties were sampled. All concerns were positive for CL, while 46.8% of slaughtered animals were positive. Superficial lymph nodes were diseased in 15.3% (348/2,270) of carcasses, 8.9% (203/2,270) of viscera (lungs, liver, and intestines) had at least one abscess, and 0.6% (14/2,270) of carcasses were condemned. *C. pseudotuberculosis* was isolated and identified by morphologic and staining characteristics, biochemical analysis, and multiplex PCR in 72.6% (207/285) of pus samples collected.

Key-words: Epidemiology, caseous lymphadenitis, characterization seroepidemiological, sheep breeding, Minas Gerais, sheep slaughterhouse



## 1. INTRODUÇÃO

O *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) é reconhecido como um microrganismo de distribuição mundial e altamente prevalente em países que possuem grandes criações de ovinos. A LC determina expressivas perdas para os ovinocultores e para a indústria de carne ovina. Na Austrália, país que é o maior produtor e consumidor de carne ovina, os prejuízos foram estimados, no ano de 1992, entre 30 a 35 milhões de dólares e para os abatedouros desse país, o custo anual da doença é de aproximadamente um milhão de dólares, por perdas por condenação de carcaça (Paton, 1997). Estima-se que 75% do tempo dos inspetores de carne ovina sejam gastos conferindo e removendo abscessos nos abatedouros da Austrália Ocidental (Walker, 1996).

Até a década de 80, a LC estava restrita ao Rio Grande do Sul e ao nordeste brasileiro, mas o intenso trânsito de ovinos e de caprinos causou sua disseminação para regiões onde a doença não se mostrava expressiva (norte, sudeste e centro-oeste brasileiros). O conhecimento da epidemiologia da LC no rebanho mineiro, do manejo adotado nas propriedades, bem como a identificação do agente etiológico é o primeiro passo para o controle da LC no rebanho nacional. A região nordeste brasileira, em especial, apresenta alta frequência de LC devido à grande população de ovinos, à existência de vegetação com espinhos que favorece a ocorrência de ferimentos na pele e à falta de informação adequada por parte dos proprietários quanto à sanidade do rebanho. Como essa região é fornecedora de matrizes tipo corte, pode estar ocorrendo a disseminação dessa infecção para outras regiões. Os animais raramente morrem de LC, porém os prejuízos econômicos são significativos e um só abscesso pode

resultar em perda de 40% do valor da pele de ovinos deslanados devido às cicatrizes. Apesar de oferecerem certo grau de proteção, a eficácia das vacinas desenvolvidas até o presente ainda está aquém do desejado (Chaplin et al., 1999). Em face disso, o conhecimento da epidemiologia da doença e das características do agente etiológico é primordial para o desenvolvimento de vacinas e estratégias governamentais eficazes para o controle da LC.

O efetivo ovino no Brasil é de 16.628.571 de cabeças (Censo agropecuário..., 2008). A expansão da demanda por produtos da ovinocultura (carne e derivados) está transformando o cenário produtivo no Brasil. Indústrias frigoríficas nacionais passaram a interessar-se pela matéria prima representada por cordeiros jovens, bem terminados, com adequada cobertura de gordura, para atender as exigências do mercado nacional e internacional. O número de frigoríficos com abates inspecionados tem crescido e a ocorrência da LC pode se apresentar como um dos principais agravos para a condenação de carcaças e depreciação de peles, até então, de importância pouco destacada, em função do predomínio do abate clandestino.

No Brasil, somente um trabalho foi realizado voltado a pesquisa da frequência da LC em frigorífico com abate ovino (Silva et al, 1982), e mesmo não tendo efetuado cultura do agente, com base na frequência e características das lesões encontradas, já naquela época, os autores destacam o papel limitante da LC na produção de carne ovina e sua exportação.

A ocorrência de LC tem impacto negativo nas atividades ovina e caprina e encontra-se disseminada em várias regiões brasileiras, com presença estabelecida com diferentes ferramentas de diagnóstico (Tabela 1).

Tabela 1 – Ocorrência de linfadenite caseosa em ovinos e caprinos no Brasil por ano, unidade da Federação e ferramentas de diagnóstico, 2009.

Autores	Ano	UF	Espécie	Ferramenta	% (Individual)	% (Rebanho)
Silva et al	1974	PE	Caprina	Questionário	-	42,0
Silva et al	1982	RS	Ovina	Inspeção em abatedouro	-	8,0
Tinoco	1983	BA	Caprina	Questionário	-	82,4
Tinoco	1983	BA	Ovina	Questionário	-	36,5
Magalhães et al	1985	MG	Caprina	Questionário	-	33,4
Souza Neto e Gutierrez	1987	PE	Caprina	Questionário	-	78,0
Baker e Souza	1987	RN	Caprina	Questionário	-	25,0
Cardoso e Schimidt	1987	RS	Caprina	Relato de caso	-	Isolamento
Brown et al	1987	CE	Caprina	IHS	-	59,9
Langenegger e Langenegger	1991	RJ	Caprina	IHS e teste alérgico	-	29,4%
Pinheiro et al	2001	CE	Caprina	Questionário	-	66,9
Guimarães e Gouveia	2006	MG	Caprina	Questionário	-	36,2
Guimarães e Gouveia	2006	MG	Ovina	Questionário	-	6,1
Carmo et al	2009	CE	Caprina	ELISA	26,3	84,5
Carmo et al	2009	SP	Ovina	ELISA	6,1	-
Carmo et al	2009	DF	Ovina	ELISA	42,1	50,0
Seyffert et al	2009	MG	Caprina	ELISA	78,9	98,0
Guimarães et al	2009	MG	Ovina	ELISA	75,8	95,9

## 1.1 OBJETIVOS

A ausência de levantamentos sorológicos para LC em MG e no Brasil, de estudos sobre a sua ocorrência em frigorífico, de pesquisas que relacionem sorologia positiva com lesões, de bacterioteca de isolados do *C. pseudotuberculosis* e o pequeno número de trabalhos realizados com isolamento e identificação do agente etiológico da LC, justificaram a realização do presente trabalho, que teve os seguintes objetivos:

### 1.1.1. Objetivo geral

Estudar a epidemiologia da linfadenite caseosa ovina em Minas Gerais.

### 1.1.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar soroepidemiologicamente a linfadenite caseosa ovina em animais e propriedades do Estado de Minas Gerais (2002);
2. Caracterizar as propriedades fornecedoras de ovinos para indústria frigorífica em Minas Gerais (2007);
3. Caracterizar soroepidemiologicamente a linfadenite caseosa ovina em frigorífico no Estado de Minas Gerais;
4. Constituir bacterioteca de isolados de *C. pseudotuberculosis* de ovinos de Minas Gerais.

## **2 - CAPÍTULO 1**

(artigo científico de revisão submetido em periódico internacional)

## CASEOUS LYMPHADENITIS: EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND CONTROL

Alessandro de Sá Guimarães <sup>a,b</sup> Filipe Borges do Carmo <sup>a,b</sup> Rebeca Barbosa Pauletti <sup>a</sup>, Núbia Seyffert <sup>c</sup>; Dayana Ribeiro <sup>c</sup>; Andrey Pereira Lage <sup>a,b</sup>; Marcos Bryan Heinemann <sup>a,b</sup>; Anderson Miyoshi <sup>c</sup>; Vasco Azevedo <sup>b,c</sup>, Aurora Maria Guimarães Gouveia <sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Sanidade de Ovinos e Caprinos, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>b</sup>Grupo de Extensão da Pesquisa em Ovinos e Caprinos – GEPOC

<sup>c</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Belo Horizonte, MG, Brasil.

\*Author for correspondence: Aurora Maria Guimarães Gouveia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 567, Campus da UFMG. CEP 30123-970 - Belo Horizonte, MG Fone: +55 31 3221-6966 E-mail adress: [aurora@vet.ufmg.br](mailto:aurora@vet.ufmg.br)

## Abstract

Caseous lymphadenitis, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is one of the most important diseases of sheep and goats, causing considerable losses for herd owners. Due to the chronic and generally subclinical nature of infection, control is difficult and prevalence in animals and herds is high. This review describes the principal characteristics of *C. pseudotuberculosis*, including pathogenesis, epidemiology and principal manifestations of caseous lymphadenitis, as well as management practices, diagnostic tests and vaccination as disease control tools.

Keywords: caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sheep, goat.

## Introduction

Caseous lymphadenitis is a chronic and subclinical disease of sheep and goat of worldwide distribution, presenting high animal and flock prevalences. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, its causal agent, affects sheep and goats, though it can also infect cattle and horses, and rarely, humans; thus, it is considered an occupational zoonosis. The pathogen has been isolated from other species, including pigs, buffaloes, deers, porcupines, llamas, camels and laboratory animals (Williamson, 2001; Dorella et al., 2006). Distributed throughout much of the world, this disease is found in North and South America, Australia, New Zealand, Europe, Asia and Africa; it causes considerable economic losses, from condemnation of skins and carcasses because of abscesses, to expressive losses in reproductive efficiency, and in wool, meat and milk production. It is the main cause of condemnation of sheep carcasses in slaughterhouses in Australia, one of the world's largest producers of meat and wool (Smith and Sherman, 1994; Stanford et al., 1997; Arsenault et al., 2003; Paton et al., 2003).

This disease is characterized by abscessing of the lymph nodes; both superficial and visceral. In the superficial form, the peripheral lymph nodes swell and abscess, while in the visceral form there are systemic complications that can lead to chronic thinning (Radostits et al., 2002). *C. pseudotuberculosis* is easily disseminated throughout the herd by normal management practices and by environmental contamination (Brown and Olander, 1987).

## Classification of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

*Corynebacterium pseudotuberculosis* belongs to the genus *Corynebacterium*, family *Corynebacteriaceae*, suborder *Corynebacterineae*, order *Actinomycetales*, subclass *Actinobacteridae*, class *Actinobacteria* (Stackebrandt et al., 1997). The genus *Corynebacterium* belongs to the Actinomycetes group, which also includes the genera *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* (Dorella et al., 2006). Though the species of these genera, also denominated the CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*) group, are quite diverse, they have some characteristics in common, such organization of the cell wall, composed principally of peptidoglycans, arabinogalactan, and mycolic acids, and a high proportion of guanine and cytosine in the genome (G + C = 47 - 74%). The CMN group includes many species of medical and veterinary importance, including *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* and *M. leprae*, etiological agents of human and bovine tuberculosis, and of leprosy, respectively, and *C. pseudotuberculosis*.

The bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis* is classified into two biovars (Biberstein et al., 1971), the biovar *Ovis*, which mainly affects sheep and goats, causing superficial and visceral abscesses, and the biovar *Equi*, which mainly affects horses, causing ulcerating lymphangitis of the distal extremities, ventral abscesses of the thorax and abdomen, and furunculosis (Williamson, 2001). The existence of these two biovars has been confirmed by

biomolecular techniques (Songer et al., 1988; Sutherland et al., 1996; Costa et al., 1998; Connor et al., 2000; Connor et al., 2007).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a Gram-positive, nonencapsulated, nonsporing, fimbriated bacterium (Jones and Collins, 1986). The cell wall is composed of mesodiaminopimelic, arabinogalactan and corinomycolic acids (lipids), similar to mycolic acid from *Mycobacterium tuberculosis*, but it is not acid-alcohol resistant (Jones and Collins, 1986). The attenuation generated by successive passages is due to thinning of this lipid layer (Hard, 1975).

In stained smears, the rods appear isolated and have pleomorphic forms, from coccoids to filamentous rods, grouped in parallel cells or in a format similar to Chinese letters (Quinn et al., 2005). According to Collet et al. (1994), the microorganism, when removed from culture, does not appear pleomorphic; this was also found for 207 strains of *C. pseudotuberculosis* isolated and identified at the Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, obtained from cultures of caseous material collected at a slaughterhouse. The cells are

small (0.5-0.6 µm x 1.0- 3.0 µm), facultative anaerobes and generally contain metachromatic granules (Jones and Collins, 1986; Collet et al., 1994).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is identified by its morphology, colony characteristics, and biochemical features, mainly carbohydrate fermentation. It produces catalase, sulfidric acid, phospholipase D (PLD) and hydrolyzes urea. Nitrate reduction varies; it differentiates biovar Ovis, which is nitrate reductase negative, from biovar Equi, nitrate reductase positive (Biberstein et al., 1971). In sheep blood agar, incubated at 37°C, cream-colored colonies, with a β-hemolysis zone, are observed after 48 h. It presents a reverse CAMP test, because there is inhibition of β-hemolysis by *Staphylococcus aureus* and synergy with *Rhodococcus equi* (Jones and Collins, 1986; Quinn et al., 2005). In liquid culture, it forms a surface film, though the culture remains clear; this film is broken by agitation, forming flakes (Jones and Collins, 1986). The principal characteristics of *C. pseudotuberculosis* that are important for its identification are shown in Table 1 (Jones and Collins, 1986; Quinn et al., 2005).

Table 1. Principal phenotypic characteristics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* used for identification.

Test		Carbohydrate fermentation	
Metachromatic granules	+	Starch	-
β-hemolysis	+	Arabinose	V
CAMP	Reverse	Fructose	+
<i>S. aureus</i>	inhibition	Galactose	+
<i>R. equi</i>	increase	Glucose	+
Motility	-	Lactose	-
Oxidase	-	Maltose	+
Catalase	+	Mannitol	V
Nitrate Reduction	V	Mannose	+
Methylene Red	+	Ribose	+
Hydrolysis of:		Sucrose	V
Casein	-	Trehalose	-
Esculin	-	Xylose	-
Gelatin	V		
Hippurate	-		
Pyrazinamide	-		
Urea	+		

+: more than 90% positive; v: 21–89% positive; -: more than 90% negative. Adapted from Jones & Collins (1986) and Quinn et al. (2005).

## Epidemiology and economic impact

Caseous lymphadenitis is distributed worldwide and generally follows the distribution of sheep and goat herds, though in some regions its prevalence may be under-notified. Dissemination of this disease throughout the world probably occurred through importation of infected animals (Baird and Fontaine, 2007). From 1996 - 2004, among the 201 countries that reported their sanitary situation to the World Animal Health Organization (OIE) (Figure 1), 64

declared that they had animals with caseous lymphadenitis within their borders (OIE, 2009). These countries are distributed in the Americas (19 of 42 countries), Africa (18 of 51), Asia (11 of 43), Europe (14 of 51) and Oceania (2 of 14) (World..., 2009). However, the number of countries that have problems with this disease is probably under-notified, because the declaration to OIE is only done by the official sanitary authorities of each country; some countries that have had this disease reported in scientific papers have not made an official declaration, including Brazil.



Figure 1- 201 countries that reported their sanitary situation to the World Animal Health Organization (OIE), 1996 – 2004.

Prevalences of caseous lymphadenitis as high as 61% were found in Australia (Middleton et al., 1991); however, more recent studies indicate a prevalence of 20 - 30%, after vaccination began (Paton et al., 2003). In the USA, prevalences of up to 43% have been estimated (Stoops et al., 1984), similar to the range of 21 - 36% found among sheep in Quebec province in Canada (Arsenault et al., 2003). In Alberta, also in Canada, vaccination was effective in the

reduction of the prevalence of infection (Stanford et al., 1997). In the United Kingdom, 45% of the producers that were interviewed reported abscesses in their sheep (Binns et al., 2002).

In Brazil, the first report of caseous lymphadenitis was made by Duport in 1918 (Garcia et al., 1987). Epidemiological studies have estimated that most Brazilian herds are infected and that clinical prevalence

exceeds 30%. In goats, Pinheiro et al. (2001) reported 66.9% of animals to have clinical signs of caseous lymphadenitis in Ceará. In Rio de Janeiro, prevalence in goats was reported to vary from 3.6 - 100% (Langenegger et al., 1991) and in a seroepidemiological ELISA study made by our group, in the State of Minas Gerais, we found prevalence figures of 75.8% for sheep (Guimarães et al., 2009b) and 78.9% for goats (Seyffert et al., 2009). In an ELISA analysis for *C. pseudotuberculosis* in 805 serum samples from sheep from a federally-inspected slaughterhouse in Minas Gerais; we found 377 positive animals, and a high frequency of alterations in the lymph nodes and internal organs (Figure 2). This confirms the great economical importance of *C. pseudotuberculosis* infection for the sheep industry due to the high rate of carcass condemnation. Various molecular

techniques have been used to type *C. pseudotuberculosis*, including RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) of chromosomal DNA (Songer et al., 1988; Costa et al., 1998), RFLP of ribosomal 16S DNA (Sutherland et al., 1996; Costa et al., 1998), ribotyping (Sutherland et al., 1996; Costa et al., 1998), PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) (Connor et al., 2000, Connor et al., 2007) and RAPD (randomly amplified DNA polymorphisms) (Foley et al., 2004; Stefanska et al., 2008). Though these various techniques have been useful for separating the biovars Ovis and Equi, the species *C. pseudotuberculosis* has been found to be genetically very homogeneous. The two techniques that have given promising results for typing *C. pseudotuberculosis* strains are PFGE and RAPD.

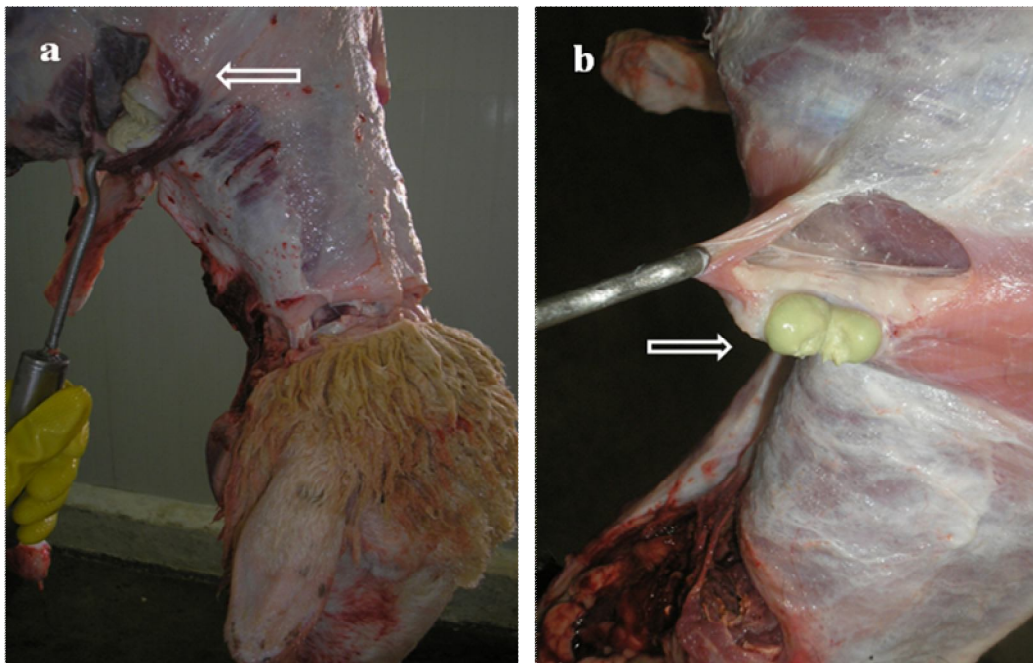


Figure 2 - Condemnation of sheep carcass at slaughterhouse inspection. A. Pre-scapular lymph node. B. Superficial lymph node. Arrows indicate pre-scapular lymph nodes with caseous material, characteristic of caseous lymphadenitis in federally inspected slaughterhouse.



Pulsed-field electrophoresis was used to characterize 50 strains of *C. pseudotuberculosis* isolated from goats, sheep and horses in the United Kingdom (Connor et al., 2000); six “pulsetypes” were observed, which allowed the researchers to determine the origin of an outbreak of caseous lymphadenitis. However, in a study of 36 sheep samples and six goat samples from Australia, Canada, Eire, Holland and Northern Ireland, the same research team reported four different “pulsetypes”, with the conclusion that these *C. pseudotuberculosis* strains, both those from sheep and goats, were quite homogeneous (Connor et al., 2007).

RAPDs were useful in a study of 54 strains of *C. pseudotuberculosis* isolated from horses in four different states of the USA, identifying 10 different genotypes (Foley et al., 2004). Also, RAPDs made with other initiators made it possible to define eight genotypes among 61 strains of *C. pseudotuberculosis* isolated from goats in Poland, with a diversity index of 0.539 (Stefanska et al., 2008).

The importance of caseous lymphadenitis in Brazil can be estimated by the increase in the participation of goats and sheep in national animal husbandry and its relationship with the economic impact of this disease. Brazil has 16,239,455 sheep and 9,450,312 goats, totaling 25,689,767 animals (Censo agropecuário..., 2007). The economic losses include decreased milk production, decreased weight gain, reduced value of skins due to scarring, and the cost of the drugs and labor needed to treat superficial abscesses. Losses are increased when the affected lymph nodes are in critical areas (jaw, crural region, udder) negatively affecting chewing, locomotion and milk and meat production; however, economic losses due to this disease have not yet been computed. In industry, losses are due to the lower percent utility of carcasses from affected animals, damage to skins, along with the need for detailed inspection of carcasses. In the Brazilian Northeast, where goat and sheep husbandry are important sources of food and income, the situation is

even more critical because of the type of vegetation (spiny) and the low level of schooling of the farmers (Unanian et al., 1985; Pinheiro et al., 2000). It is also becoming more of a problem in the Southeastern, Northern and Midwestern regions, in which this activity is increasing rapidly, negatively affecting the meat-processing industries (Guimarães et al., 2009a,b).

### **Sources of infection and form of transmission**

The main source of infection is infected animals, with or without clinical symptoms; these animals contaminate the soil, water, feed, pastures and facilities with nasal secretions, feces and pus from abscesses that drain spontaneously (Figure 3). Infected animals that do not present clinical symptoms can eliminate the bacteria through their respiratory tract (O'Reilly et al., 2008). Evaluation of the coefficients of transmission of *C. pseudotuberculosis* by respiratory tract infection and by pus from spontaneously-draining abscesses, using a mathematical model of transmission, showed that pulmonary abscesses have a small coefficient of transmission, but they are more important for maintaining the infection in the herd (endemic phase) (O'Reilly et al., 2008).

Transmission can occur through direct or indirect contact or through wounds that come into contact with pus from the abscesses of sick animals (Nairn and Robertson, 1974). Materials that are used in the management of the animals, such as during castration, identification with ear tags or by tattooing, contact with an uncauterized umbilical stump, and drainage of abscesses, can transmit the agent (Figure 3). Vectors such as insects (especially flies) should be considered in the transmission of the disease, since *C. pseudotuberculosis* has been isolated from the bodies of domestic flies (mechanical vector) and from fly intestines and feces (biological vector). This bacterium has also been isolated from flies contaminated with milk from cows with

mastitis in Israel (Yeruham et al.; 1996, Braverman et al.; 1999, Spier et al., 2004). In horses, flies have considerable epidemiological importance in the dissemination of *C. pseudotuberculosis*,

because the higher frequency of infection in this species occurred during periods when there are large populations of flies (Costa et al., 1998).

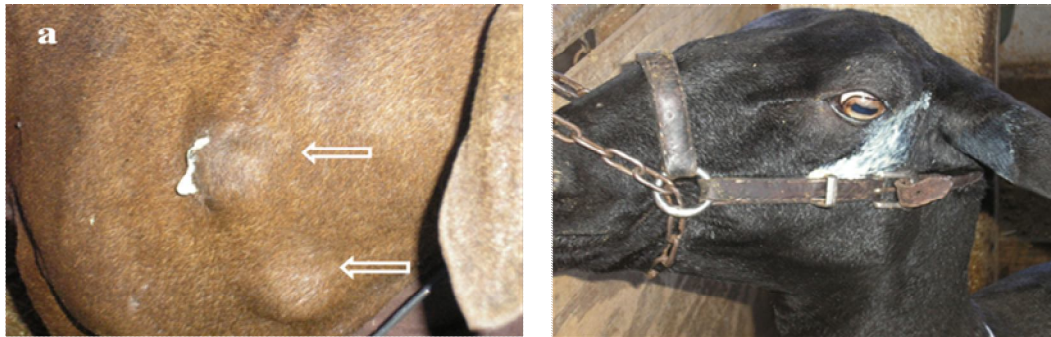


Figure 3 – A. Two caecous abscesses, one spontaneous opened and other closed. B. Ocular and cutaneous infection of sheep with caseous material

*Corynebacterium pseudotuberculosis* survives long periods in the soil. Through experimental contaminations of soil and of sheep and goat facilities, it was found that *C. pseudotuberculosis* can survive up to eight months at various temperatures (Brown and Olander, 1987). In bedding straw, it can remain viable for three weeks, during two months in hay, four months in shearing stalls and for more than eight months in the soil. This bacterium has been isolated after five months in places where there has been contamination with pus (Nairn and Robertson, 1974) and the concentration of viable microorganisms in the purulent material is estimated to be from  $10^6$  to  $10^7$  bacteria per gram of pus; consequently, environmental contamination due to a leaking abscess is very high and persistent (Brown et al., 1987).

The use of barbed-wire fences or troughs and posts with sharp, cutting edges can cause lesions in the skin of the animals, opening passage for the entry of bacteria (Guimarães et al., 2009a). On farms that rear sheep for wool, the equipment and facilities used for shearing can transmit *C. pseudotuberculosis* among animals. Immersion baths immediately after shearing can disseminate the infectious agent,

because these solutions can harbor bacteria for up to 24 h (Rizvi et al., 1997). In the Brazilian Northeast, where non-wool sheep predominate almost completely, shearing and tail removal are not common and the sheep are rarely ear tagged (Pinheiro et al., 2000); however, the bacteria can penetrate through the respiratory system, transcutaneously or through skin wounds caused by the caatinga vegetation of this region (Unanian et al., 1985).

Goat and sheep meat producers tend to make few periodic inspections of their herds because of the extensive type of rearing system, in which they do not identify individual animals, arguing that these animals are slaughtered within a short time interval. Conversely, goat milk producers tend to identify animals individually and are more likely to detect abscesses during daily contact, favoring the control of caseous lymphadenitis in these herds; this is proved by the fact that 103 (36.3%) of the 284 goat farmer interviewed in Minas Gerais, Brazil, have reported this disease in their herds, while only 13 (6.1%) of the 213 sheep farmers state the same (Guimarães and Gouveia, 2006). In this State most goat herds are for milk production, while most

sheep flocks are for meat production (Guimarães and Gouveia, 2006).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is sensitive to common disinfectants, such as hypochlorite, formalin and cresol; however, the surfaces should be cleaned before disinfection, because organic matter interferes with the action of these agents (Ismail and Hamid, 1972). Iodine is recommended for chemical disinfection of wounds in order to reduce bacterial transmission after surgical draining of the abscesses (Smith and Sherman, 1994).

### **Pathogenicity and virulence factors**

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a facultative intracellular bacterium, multiplying within macrophages and surviving the action of phagolysosomal enzymes, because of the external lipid layer of the cell wall (Dorella et al., 2006; Baird and Fontaine, 2007). After penetrating into the host, which generally occurs through the oral, nasal and ocular mucosa, or through skin wounds, the agent disseminates freely or within macrophages, mainly through the afferent lymphatic system, to local lymph nodes and internal organs. This process depends on the ability of the agent to infect macrophages, resist phagolysosomes and kill cells, liberating new bacteria and causing necrosis (Batey, 1986). Three minutes after intraperitoneal inoculation in mice, phagocytic vacuoles are observed (Hard, 1969); after an hour, 60-80% of the goat macrophages contain bacteria, and two hours after inoculation, acid phosphatase is present in the vesicles containing the bacteria (Tashjian and Campbell, 1983). A strong local reaction occurs four hours after challenge in sheep (Pépin et al., 1988), and a few hours later macrophages are degenerated and polymorphonuclear cell infiltrates containing bacteria are seen (Hard, 1969; Tashjian and Campbell, 1983; Guilloteau et al., 1990). A day after experimental cutaneous infection, microabscesses develop in draining lymph nodes, and pyogranulomas are formed three to 10 days post-infection (Ellis et al., 1990; Pépin et al., 1997; Radostits et al., 2002).

The lipid cell layer of the bacteria is pyogenic and immunogenic. This same layer makes phagocytosis of the bacteria difficult, increasing its virulence (cytotoxicity), and survival inside macrophages; abscesses form through the release of lysosomal enzymes (Williamson, 2001). Besides participating in pathogenicity, mycolic acid appears to be important for the survival of this bacteria in the environment (West et al., 2002).

Phospholipase D (PLD) increases vascular permeability and bacterial survival in the host. It is important for the dissemination of the bacteria from the location of the primary infection (local lymph node) to other organs (lungs, regional lymph nodes, mesenteric lymph nodes, etc.), because it lyses mammal cell membranes, rich in phospholipids, causing microhemorrhages and vascular lesions, with increased vascular permeability (Dorella et al., 2006).

### **Immune response**

Immunity against *C. pseudotuberculosis* is complex and involves cellular and humoral immune responses (Prescott et al., 2002). Studies point to a greater cellular immune response, chiefly a Th1 response, because of the facultative intracellular nature of the microorganism, with production of gamma-interferon (IFN- $\gamma$ ) and other cytokines that are important for controlling infection (Simmons et al., 1998; Lan et al., 1999; El-Enbaawy et al., 2005). The humoral immune response is observed to present, from 6 to 11 days post-infection, a low production of IFN- $\gamma$ , which significantly increases thereafter (Paule et al., 2003). Inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, are mainly produced at the site of inoculation, while T cell-associated cytokines, such as IFN- $\gamma$ , are chiefly produced in drainage lymph nodes (Pépin et al., 1997).

### **Clinical signs**

Caseous lymphadenitis in its superficial form is characterized by infection of external lymph nodes, such as the submandibular, parotid, pre-scapular, subiliac, popliteal and

supramammary lymph nodes, while the visceral form is characterized by abscessing of internal organs, such as lungs, liver, kidneys, uterus, spleen and internal lymph nodes, such as the mediastinal and bronchial lymph nodes. These two forms can coexist; however, other less common sites can be involved, such as mammary gland, scrotum, the central nervous system and joints. Internal abscesses are normally associated with weight loss and weakness, known in sheep as thin-ewe syndrome. The mature abscesses easily leak through fistulas, releasing purulent whitish-green discharges into the environment or into the affected organ. Abscesses usually recur, months or years later, in the same animal, due to the failure to eliminate the infection (Williamson, 2001). In some cases, infections produce few characteristic clinical signs, and a *post-mortem* examination becomes necessary for diagnosis; this makes it difficult to obtain objective data about disease prevalence (Brown et al., 1987).

Differences in the place of the abscesses between sheep and goats have been reported, the visceral form being more frequent among sheep and the superficial form among goats (Brown and Olander, 1987). External abscesses in the lymph nodes of the head and neck are more common in goats, while the subiliac and pre-scapular lymph nodes are more commonly affected in sheep (Brown and Olander, 1987; Smith and Sherman, 1994). Differences in the appearance of abscess content have also been reported between sheep and goats; in sheep the contents have a laminar form when cut, similar to the layers of an onion, caused by the formation of layers of fibrous tissue and thick caseous material, while abscesses in goats have a thin and pasty exudate (Brown and Olander, 1987). However, onion-like abscesses were not always present in sheep. Sheep carcass inspection at a federally inspected slaughterhouse in Minas Gerais, Brazil, showed that most of the abscesses in sheep were located in the head and neck lymph nodes and their content was essentially pasty. Isolation of *C. pseudotuberculosis* from these materials confirms the infection

status of the animals. It is possible that older abscesses become more consistent, with a tendency towards fibrosis and calcification, progressing to an onion-like appearance, independent of animal species.

In horses, there have been reports of abortions and cases of mastitis associated with visceral abscesses (Quinn et al., 2005). In Israel, this bacterium was isolated from subcutaneous abscesses in milking cows; which could occur in outbreaks and cases of mastitis, affecting the whole mammary gland, resulting in total loss of milk production (Yeruham et al., 2003).

### Clinical and laboratory diagnosis

Abscesses in goats and sheep are very suggestive of caseous lymphadenitis, especially if animals of the same lot have similar clinical signs, however bacterial isolation is necessary to identify the causative agent, since other bacteria such as *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Actinobacillus licheniformis* and *Pasteurella multocida*, can be found in abscesses (Pekelder, 2003). In animals with respiratory problems, a thoracic X-ray can reveal masses in the pulmonary parenchyma and lymph nodes; which also must be confirmed by culture of tracheal washes (Pugh, 2004).

The use of aspirating puncture with a fine needle in the diagnosis of *C. pseudotuberculosis* was evaluated (Ribeiro et al., 2001). It proved to be easily performed, to have a low cost and to cause little damage to the tissues when compared to histopathology. It allows presumptive cytological diagnosis of the infection, before the affected lymph nodes abscessed, aiding in early adoption of prophylactic measures for the rest of the flock.

Gram and Giemsa staining can be used for cytological identification of the microorganism. Although Gram staining is not primarily indicate for staining tissues, the bluish color taken on by *C. pseudotuberculosis*, in contrast with the reddish color of the cellular and

inflammatory material from the aspirated lymph nodes, helps in the identification of the infectious agent (Radostits et al., 2002).

In order to make a definitive diagnosis of caseous lymphadenitis, the agent should be isolated from purulent material from abscessed lymph nodes samples from live animals. Besides aspirating puncture, the material can be obtained by excision after trichotomy and careful antiseptic cleaning of the skin (Collett et al., 1994; Smith and Sherman, 1994). It can also be collected at necropsy or during slaughter, when internal

abscesses, affecting the liver, lungs, intestine, kidneys, internal lymph nodes and other tissues, become accessible (Riet-Correa et al., 2001).

In the laboratory, after isolation, the identification of *C. pseudotuberculosis* was done by its morphology, staining characteristics, profile and fermentation of various carbohydrates (Jones and Collins, 1986). The main phenotypic characteristics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* used for identification are shown in Table 1.

Table 2. Principal phenotypic characteristics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* used for identification.

Test		Carbohydrate fermentation	
Metachromatic granules	+	Starch	-
β-hemolysis	+	Arabinose	V
CAMP	Reverse	Fructose	+
<i>S. aureus</i>	inhibition	Galactose	+
<i>R. equi</i>	increase	Glucose	+
Motility	-	Lactose	-
Oxidase	-	Maltose	+
Catalase	+	Mannitol	V
Nitrate Reduction	V	Mannose	+
Methylene Red	+	Ribose	+
Hydrolysis of:		Sucrose	V
Casein	-	Trehalose	-
Esculin	-	Xylose	-
Gelatin	V		
Hippurate	-		
Pyrazinamide	-		
Urea	+		

+: more than 90% positive; v: 21–89% positive; -: more than 90% negative. Adapted from Jones & Collins (1986) and Quinn et al. (2005).

Various diagnostic techniques have been developed for caseous lymphadenitis in goats and sheep, such as serological neutralization for antitoxins, immunodiffusion in agar gel, indirect hemagglutination, complement fixation and hypersensitivity tests (Langenegger et al., 1991; Williamson, 2001; Baird and Fontaine, 2007).

Immunoenzymatic tests (ELISA), using bacterial cells, toxins and secreted proteins

of *C. pseudotuberculosis*, such as phospholipase D (Ter Laak et al., 1992; Dercksen et al., 2000; Carminati et al., 2003; Binns et al., 2007), have been reported to be effective in caseous lymphadenitis control and eradication programs. Indirect ELISA based on secreted proteins has shown a diagnostic sensitivity and specificity of 93.5% and 100%, respectively, in the diagnosis of caseous lymphadenitis in small ruminants (Carminati et al., 2003).

Detection of INF- $\gamma$  by ELISA, an indicator of cell-mediated immunity, has been used for diagnosis of infection by *C. pseudotuberculosis*, with a sensitivity of 91% and a specificity of 98%, demonstrating its potential for use in caseous lymphadenitis eradication programs (Prescott et al., 2002; Sunil et al., 2008).

Molecular techniques have also been used for the diagnosis of caseous lymphadenitis. Polymerase chain reaction (PCR), used to identify *C. pseudotuberculosis*, is an alternative to conventional diagnostic methods, with the advantage of being faster and more specific (Çetinkaya et al, 2002). Multiplex PCR based on amplification of the genes 16S rDNA, *rpoB* and *pld*, presented 94.6% diagnostic sensitivity, for *C. pseudotuberculosis* isolates as well as for clinical material (Pacheco et al., 2007). It facilitates the diagnosis by differentiating *C. pseudotuberculosis* from other pathogens present in abscesses, chiefly *C. ulcerans* (Pacheco et al., 2007).

Recently, the genome of two *C. pseudotuberculosis* strains isolated from goats and sheep has been sequenced by a Minas Gerais Genome Network and Pará Genomic and Proteomic Network. The genomic data will help to identify new specific targets, useful in the diagnosis as well as in the development of drugs and vaccines and in the understanding of *C. pseudotuberculosis* pathogenicity mechanisms.

### Differential diagnosis

Pyogranulomatous lesions, such as found in actinobacillosis, tuberculosis and superficial abscesses caused by *Staphylococcus aureus* and *Actinomyces pyogenes*, must be differentiated from caseous lymphadenitis (Collett et al., 1994). The superficial form of the disease should also be differentiated from submandibular edema caused by parasites, *Fasciola hepatica* and *Haemonchus* sp., salivary cysts, lymphosarcoma and subcutaneous inoculation of vaccines. The debilitating visceral form can be clinically similar to

chronic parasitism, thinning due to abnormal waste of teeth, alveolar periodontitis, malnutrition and chronic diseases, such as pulmonary adenomatosis, neoplasias and scrapie (Collett et al., 1994).

Pneumonias caused by *Mycobacterium bovis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* or ovine progressive pneumonia, due to Maedi-Visna virus infection, can make the diagnosis of caseous lymphadenitis even more difficult (Pugh, 2004).

In sheep, orchitis and epididymitis caused by *C. pseudotuberculosis* needs to be differentiated from similar lesions caused by *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis* and *Pasteurella* spp. (Collett et al., 1994; Saunders et al, 2007).

### Treatment

Treatment of affected animals consists of the drainage of abscesses, followed by cleansing and chemical cauterization, usually with 10% iodine, or even removal of the affected superficial lymph nodes (Nozaki et al, 2000). Although it is an important control measure, this procedure might not be as effective as expected due to the presence of internal abscesses. Drainage of the abscess should be done in a way that avoids environmental contamination, with disinfection of the surgical material before and after the procedure, and all of the disposable materials should be incinerated and buried, including plastics and paper used to cover the area.

Another treatment option is antibiotic therapy, which is not very efficient, even though *C. pseudotuberculosis* is sensitive *in vitro* to almost all antibiotics that have been tested. The intracellular location of the bacteria and the formation of biofilm in natural infections reduces drug efficacy, making antimicrobials inefficient under these conditions (Brown and Olander, 1987; Olson et al., 2002). The inefficacy and high cost of antibiotic treatment make it an inviable option for herd-level disease management.

## Control and prophylaxis

An effective program for the control of caseous lymphadenitis should be based on clinical inspection and periodic serology of all animals in the flock, which includes recently-acquired animals and those that return to the herd, culling the ones that have clinical signs or that are serologically positive. Once infected, an animal hardly eliminates the *C. pseudotuberculosis* (Campbell et al., 1982). The main source of infection for a flock is introduction of infected or abscessed animals into a herd, which results in a high frequency of abscesses after two or three years. This stresses the importance of employing biosecurity procedures in all flocks, chiefly during the introduction of animals.

Measures designed to reduce the environmental risk of wounding should also be adopted, such as the use of smooth wire fences, troughs and facilities without sharp edges, disinfection of surgical, ear tagging and shearing instruments, systematic use of individual disposable needles, effective control of insects, and disinfection of newborns' navels and any other wounds with 10% iodine. Although it is not recommended to be applied to swelled lymph nodes because of its irritating and caustic action on tissues (skin, mucosa and lungs), 10% formaldehyde should be used for disinfection of herd facilities (Brown and Olander, 1987; Williamson, 2001; Baird and Fontaine, 2007).

All control programs should be based on sanitary education of herd owners and technical personnel, otherwise success will be compromised. Information about losses throughout the production cycle, as well as concerning the zoonotic potential of *C. pseudotuberculosis*, should be supplied to the people who work with the herds directly or indirectly (Peel et al., 1997), reinforcing their importance in the success of the control program.

Control measures vary with the prevalence of infection. In countries free of this disease, importation should only be permitted from

herds that have been certified free of caseous lymphadenitis for three years, all animals should be tested by ELISA before importing and they should initially be placed in quarantine. In countries with a low disease prevalence, the clinically affected animals should be separated and submitted to ELISA testing, lambs and kids should be reared away from their mothers, and installations and equipment should be well disinfected. In countries with a high incidence, rigorous sanitary measures should be implemented, associated with vaccination (Brown and Olander, 1987; Collet et al., 1994; Williamson, 2001; Baird and Fontaine, 2007).

Disease eradication can be achieved in endemically-infected herds by initially discarding all animals that have clinical signs and those that are positive in serological tests (Radostits et al., 2002); however, this is difficult to accomplish because of the rapid dissemination of the agent within the herd and the difficulty in identifying animals that have a subclinical form of the disease (Riet-Correa et al., 2001; Çetikaya et al., 2002).

## Vaccination

Given that caseous lymphadenitis treatment is ineffective and expensive, the best strategy for control and prevention of the disease is immunization, as it was observed in countries with high prevalence of infection (Patton et al., 2003). The vaccines commercially available have different relevant features that should be considered on their use. Not all of the vaccines licensed for use in sheep have the same efficiency in goats, and normally it is necessary to adjust the vaccination program to the farm conditions and instruct the people who will apply the vaccine. Also, the protection provided by vaccination is only partial, as external and internal abscess development can still occur (Williamson, 2001).

The principal component of *C. pseudotuberculosis* used in vaccine formulations is phospholipase D. The justification for its use as a vaccination antigen is the good rates of protection

obtained after immunization of goats and sheep with this toxin. Most commercial vaccines against *C. pseudotuberculosis* use inactivated phospholipase D associated to antigens of various pathogens, such as *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* type D, *Clostridium novyi*, *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*, along with some that are associated with the endectocide moxidectin. This formulation is the basis of the Glanvac vaccine (Vetrepharm, Inc London), licensed for use in sheep and goats in Canada, Australia and New Zealand and the Biodectin vaccine (Fort Dodge Austrália PTY LTD), licensed in Brazil for use in sheep.

Glanvac vaccine has been evaluated in various countries (Eggleton et al., 1991). Vaccination of sheep and goats with Glanvac resulted in protection against experimentally-induced infection with *C. pseudotuberculosis*, evidenced by a decrease in the number of lesions (Fontaine et al., 2006). Another commercial vaccine that has been evaluated, Caseous D-T (PBS Animal Health), has two formulations, one that only contains toxoids (clostridial and from *C. pseudotuberculosis*) and another that is a combination of clostridial toxoids and the bacterium *C. pseudotuberculosis*. Preliminary results indicate that this second formulation confers better protection against experimental infection than the first, reducing the number of internal and external lesions (Piontkowski and Shivvers, 1998). The use of PLD toxoid for the immunization of goats can have some negative consequences, including reduced milk production, fever, ventral edema, ataxia and convulsions; consequently, recommendations for use in this species are made with restrictions (Williamson, 2001).

The reasons for the partial protection provided by immunization of goats and sheep with commercial vaccines have to do with the type of immune response. Protection against *C. pseudotuberculosis* is mainly dependent on a immune response that involves INF- $\gamma$  production and cytotoxic T-cells. A humoral response alone is insufficient to protect the animal, and a good

cellular response is not achieved with inactivated vaccines (Dorella et al., 2009).

Consequently, various attempts have been made to obtain an attenuated vaccine that is effective against caseous lymphadenitis (Hodgson et al., 1994; Simmons et al., 1998). Attenuation can happen naturally or through manipulations using temperature, chemical and genetic (recombinant) agents. With this type of vaccine strategy, the microorganism maintains its capacity to replicate, imitating natural infection and producing humoral and cellular responses. Also, this is the type of vaccine that confers the best and longest-lasting immune response, due to its similarity to natural infection (Dorella et al., 2009). Techniques such as deletion of multiple genes involved in virulence, and insertion of fragments that interrupt these genes in the pathogen, practically eliminate the risk that the pathogen can revert to its virulent form (Jiskoot et al., 2002). Live vaccines that have been attenuated in the laboratory (recombinants) usually have the PLD gene as a target for attenuation, because of its importance as a virulence factor (Carne and Onon, 1978).

In Brazil, the Bahia State Agency for Agricultural Development (EBDA) developed and a laboratory commercializes line 1002, produced from a natural low-virulence strain. It gave significant protection levels of 83% in vaccine trials; however, immunization still presents collateral effects, such as local reactions, and field trials have not been as successful as the initial vaccine tests, with highly variable protection levels (Hage, 2000). Another attenuated live vaccine, LinfoVac (Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda), indicated for use in sheep and goats, was recently made available in Brazil. The results obtained in the field with these attenuated vaccines demonstrate the need to develop a more effective and safe vaccine (Dorella et al., 2009).

## Conclusions

Caseous lymphadenitis continues to be an important challenge for sheep and goat



production, limiting the net profits of these production systems. The prevalence of this disease is quite high, indicating that specific control measures should be adopted. There are various difficulties that affect the development and application of diagnostic tests that are effective and that can be used within the context of an organized caseous lymphadenitis control program. In order to have useful vaccines, more effective immunogens need to be made available.

The intense commercialization and transit of small ruminants without using the necessary security measures, are important obstacles to the control of caseous lymphadenitis. Also, deficient control, with inadequate use of vaccines, lack of hygiene precautions and of serological diagnostic techniques, both on farms and in expositions and fairs, allow the introduction and rapid dissemination of the *C. pseudotuberculosis* in the herds. Few sheep and goat farmers demand sanitary certificates or use quarantines when they acquire animals or when they return from these events. Breeders and technicians need to make timely diagnoses and implement more effective control of caseous lymphadenitis in order to reduce losses in the properties and in the slaughter houses (Guimarães and Gouveia, 2006; Guimarães et al., 2009b).

### Acknowledgements

ASG, APL and VA have scholarships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (CVZ APQ 3283-5.04/07) and from CNPq.

### References

Arsenault, J.O., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D. O., Galarneau, J.-R., Boisclair, J., Simard, C., Bélanger, D., 2003. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.* 59, 67–81.

Baird, G.J., Fontaine, M.C., 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology.* 137, 179-210.

Batey, R.G., 1986. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust. Vet. J.* 63, 269-272.

Biberstein, E.L., Knight, H.D., Jang, S., 1971. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Vet. Rec.* 89, 691–692.

Binns, S.H., Bairley, M., Green, L.E., 2002. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Vet. Rec.* 150, 263-268.

Binns, S.H., Green, L. E., Bailey, M., 2007. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol.* 20, 169-179.

Braverman, Y., Chizov-Ginzburg, A., Saran, A., Winkler, M., 1999. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 18, 681-690.

Brown C.C., Olander H.J., Alves S.F., 1987. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. *Can. J Vet. Res.* 51, 46–49.

Brown, C.C., Olander, H.J., 1987. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. *Vet. Bull.* 57, 1-11.

Campbell S.G., Ashfaq M.K., Tashjian J.J., 1982. Caseous lymphadenitis in goats in the USA. In: *Proceedings 3rd International Conference on Goat Production and Disease.* Tucson. Arizona. 449-454.

Carminati, R., Bahia, R., Costa, L.F.M, Paule, B.J.A., Vale, V.L., Regis, L., Freire, S.M., Nascimento, I., Schaer, R., Meyer, R.,

2003. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. R. Ci. Méd. Biol. 2, 88-93.
- Carne, H.R., Onon, E.O., 1978. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on the endothelial cells of blood vessels. Nature. 271, 246-248.
- Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T., Vanechoutte, M., 2002. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. Vet. Microbiol. 88, 75–83.
- Collett, M. G., Bath, G. F., Cameron, C.M., 1994. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: Coetzer, J.; Thomson, G.R. Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa, Capetown: Oxford University Press, 2.ed., 1387-1395.
- Connor, K. M., Quire, M., Baird, G., Donachie, W., 2000. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol.. 38, 7, 2633-2637.
- Connor, K.M., Fontaine, M.C., Rudge, K., Baird, G.J., Donachie, W., 2007. Molecular genotyping of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. Vet. Res. 38, 613-623.
- Costa, L. R.R.; Spier, S.J.; Hirsh, D.C., 1998. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. Vet.Microbiol. 62, 135-143.
- Dercksen, D.P., Brinkhof, J.M.A., Dekker-Nooren, T., Van Maanen, K., Bode, C.F., Baird, G., Kamp, E.M., 2000. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. Vet. Microbiol. 75, 167-175.
- Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S. C., Miyoshi, A., Azevedo, V., 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet.Rec. 37, 201–218.
- Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., Portela, R.W., Miyoshi, A., Azevedo, V., 2009. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. Expert Review of Vaccines. 8, 205–213.
- Eggleton, D.G., Middleton, H.D., Doidge, C.V., Minty, D.W., 1991. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. Aust.Vet. J. 68, 317-319.
- El-Enbaawy, M.I., Saad, M.M., Selim, S.A., 2005. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. Egyptian J. Immun.. 12, 13–20.
- Ellis, J.A., Hawk, D.A., Holler, L.D., Mills, K.W., Pratt, D. L., 1990. Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. J. Am.Vet. Med. Assoc. 196, 1609-1613.
- Foley, J.E., Spier, S.J., Mihalyi, J., Drazenovitch, N., Leutenegger, C.M., 2004. Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. Am. J. Vet. Res. 65, 1734 – 1737.
- Fontaine, M.C., Baird, G., Connor, K.M., Rudge, K., Sales, J., Donachie, W., 2006. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vaccine. 24, 5986-5996.
- Garcia, M., Araújo, W.P., Carvalho, V.M., Costa, E.O., 1987. Isolamento e identificação do *Corynebacterium*

- pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Fac. Med. Vet. Zootec. Universidade de São Paulo. 24, 23-25.
- Guilloteau, L., Pepin, M., Pardon, P., Pape, A.L., 1990. Recruitment of <sup>99m</sup>Tc- or <sup>111</sup>In-labelled polymorphonuclear leucocytes in experimentally induced pyogranulomas in lambs. J. Leukocyte Biol. 48, 343–352.
- Guimarães, A.S., Gouveia, A.M.G., Abreu, A.B., Haddad J.P.A., Leite, R.C., Heinemann M.B., Lage, A.P., Cruz, J.C.M., Carmo, F.B., 2009a. Características zoossanitárias das caprinoculturas de leite e corte em Minas Gerais. Rev. Vet. e Zootec. em Minas, 101, 23-29.
- 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., 2009b. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: prevalence and management surveys. Small Rumin. Res., 87, 86–91.
- Guimarães, A.S., Gouveia, A.M.G., 2006. Caracterização da caprinovinocultura em Minas Gerais 84 pp (Masters thesis of the Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais).
- Hage, J.A., 2000. Vacina da EBDA é novidade mundial. EMBRAPA - Pesquisa Estadual em Foco. 05/08, 9.
- Hard, G.C., 1969. Electron microscopic study of the differentiation of mouse peritoneal macrophages stimulated by *Corynebacterium ovis* infection. Lab. Invest. 21, 309–315.
- Hard, G.C., 1975. Comparative toxic effect on the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. Infec. Immun. 12, 4139–4449.
- Hodgson, A.L.M., Tachedjian, M., Corner, L.A., Radford, A.J., 1994. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infec. Immun. 62, 5275-5280.
- Censo agropecuário 2007. Online. Available at: www.ibge.gov.br. Accessed 10 jul 2009.
- Ismail, A.A.; Hamid, Y.M.A., 1972. Studies on the effect of some chemical disinfectants used in veterinary practice in *Corynebacterium ovis*. J. Egyptian Vet. Med. Assoc. 32, 195-202.
- Jiskoot, W., Kersten, G.F.A., Beuvery, E.C., 2002. Vaccine. In: Crommelin, D.J.A.; Sindelar, R.D., (2ed.) Pharmaceutical Biotechnology – An introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists. London: Taylor and Francis Group. 12, pp. 259-282.
- Jones, D., Collins, M.D., 1986. Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In: Sneath, P.H.A. et al. (2Ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 1261–1282.
- Lan, D.T.B, Makino, S., Shirahata, T., Yamada, M., Nakane, A., 1999. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\gamma$  interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. J. Vet. Med. Sci. 61, 1203–1208.
- Langenegger, C.H., Langenegger, J., Scherer, P.O., 1991. Prevalência e diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos do Estado do Rio de Janeiro. Pesq. Vet. Brasil. 11, 31-34.
- Middleton, M.J, Epstein, V.M., Gregory, G.G., 1991. Caseous lymphadenitis on Flanders Island: prevalence and management surveys. Aust.Vet.J. 68, 311-312.
- Nairn, M.E.; Robertson, J.P., 1974. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. Aust.Vet. J. 50, 537-542.

- Nozaki, C.N., Faria, M.A.R., Machado, T.M.M. 2000. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. *Arq. Inst. Biol.* 67, 187-189.
- O'Reilly, K.M., Green, L.E., Malone, F.E., Medley, G.F., 2008. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. *Prev. Vet. Med.* 83, 242-259.
- World animal health situation, 2009. Available at: [http://www.oie.int/hs2/sit\\_mald\\_cont.asp?c\\_mald=156andc\\_cont=6andannee=2004](http://www.oie.int/hs2/sit_mald_cont.asp?c_mald=156andc_cont=6andannee=2004). accessed: 26 sept. 2009.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W.; Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66, 86-92.
- Pacheco, L.G.G., 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, S.F.S., Miyoshi, S., Azevedo, V., 2007. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.* 56, 1-7.
- Paton, M.W., Walker, S.B., Rose, I.R., Watt, G.F., 2003. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.* 81, 91-95.
- 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., 2003. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 129-139.
- Peel, M.M., Palmer, G.G., Stacpoole, A.M., Kerr, T.G. 1997. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* 24, 185-191.
- Pekelder, J.J. (3.ed.), 2003. Caseous lymphadenitis. In: Martin, W.B.; Aitken, I.D. *Diseases of Sheep*. Blackwell Science, Oxford.
- Pepin, M., Pardon, P., Marly, J., Lantier, F., 1988. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in the external ear. *Am. J. Vet. Res.* 49, 459-463.
- Pepin, M., Seow, H.F., Corner, L., Rothel, J.S., Hodgson, A.L., Wood, P.R., 1997. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.* 28, 149-163.
- Pinheiro, R.R., Gouveia, A.M.G., Alves, F.S.F., Haddad, J.P.A., 2000. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52, 534-543.
- Piontkowski, M.D., Shivvers, D.W., 1998. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 1765-1768.
- Prescott, J.F., Menzies, P.I., Hwang, Y.T., 2002. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. *Vet. Microbiol.* 88, 287-297.
- Pugh, D.G. (1.ed.), 2004. *Clínica de ovinos e caprinos*. Roca, São Paulo.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. (1.ed.), 2005. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Artmed, Porto Alegre.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. (9ed.), 2002. *Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

- Ribeiro, M.G., Dias Junior, J.G., Paes, A.C., Barbosa, P.G., Nardi Júnior, G., Listoni, F.J.P., 2001. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. Arq. Inst. Biol. São Paulo. 68, 23-28.
- Riet-Correa, F., Schild, A.L., Méndez, M.C., Lemos, R.A.A. (1ed.), 2001. Doenças de ruminantes e eqüinos. Varela, São Paulo.
- Rizvi, S., Green, L.E., Glover, M.J., 1997. Caseous lymphadenitis: An increasing cause for concern. Vet. Rec. 140, 586-587.
- Saunders, V.F., Redacliff, L.A., Berg, T., Hornitzky, M. 2007. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. Aust. Vet. J. 85, 72 – 77.
- 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., 2009. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Res. Vet. Sc. 88, 50-55.
- Simmons C.P., Dunstan S.J., Tachedjian M., Krywult J., Hodgson A.L., Strugnell R.A., 1998. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infect. Immun. 66, 474–479.
- Smith, M.C., Sherman, D. (1ed.), 1994. Caseous Lymphadenitis. Goat Medicine. Lea and Febier, Iowa.
- Songer J.G., Beckenbach K., Marshall M.M., Olson G.B., Kelley L., 1988. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 49, 223–226.
- Spier, S. J., Leutenegger, C. M., Carroll, S. P., Loye, J. E., Pusterla, J. B., Carpenter, T. E., Mihalyi, J. E., Madigan, J. E., 2004. Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. Am. J. Vet. Res. 65, 829-834.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 479 – 491.
- Stanford, K., Brogden, K.A., McClelland, L.A., Kozub, G.C., Audibert, F., 1997. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. Can. J. Vet. Res. 62, 38-43.
- Stefańska, I., Rzewuska, M., Binek, M., 2008. Evaluation of three methods for DNA fingerprinting of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from goats in Poland. Polish J. Microbiol. 57, 105-112.
- Stoops, S.G., Renshaw, H.W., Thilsted, J.P., 1984. Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. Am. J. Vet. Res. 45, 557-561.
- Sunil, V., Menzies, P.I., Shewen, P.E., Prescott, J.F., 2008. Performance of a whole blood interferon-gamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. Vet. Microbiol. 30, 288-297.
- Sutherland, S. S., Hart, R. A., Buller, N. B., 1996. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. Vet. Microbiol. 49, 1-9.
- Tashjian, J.J., Campbell, S.G., 1983. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. Am. J. Vet. Res. 44, 690–693.

Ter Laak, E.A., Bosch, J., Bijl, G.C., Schreuder, B.E., 1992. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J.Vet. Res.* 53, 1125-1132.

Unanian, M.M., Feliciano Silva, A.E.D., Pant, K.P., 1985. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. *Trop. An. Health Prod.* 17, 57-62.

West, D.M., Bruere, A. N., Ridler, A. L., 2002. Caseous lymphadenitis. In: *The Sheep: Health, Disease and Production*, Foundation for Veterinary Continuing Education. Massey University, New Zealand.

Williamson, L.H., 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am.* 17, 359-371.

Yeruham, I., Braverman, Y., Shpigel, N.Y., Chizov-Ginzburg, A., Saran, A., Winkler, M., 1996. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. *Vet. Q.* 18, 87-89.

Yeruham, D., Elad, S., Friedman and S. Perl., 2003. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli dairy cattle. *Epidemiol. Infect.* 131, 947-955.

**3 - CAPÍTULO 2**  
(artigo publicado)

**CASEOUS LYMPHADENITIS IN SHEEP FLOCKS OF THE STATE OF MINAS GERAIS,  
BRAZIL: PREVALENCE AND MANAGEMENT SURVEYS**

A.S. Guimarães<sup>a,d</sup>, N. Seyffert<sup>b</sup>, B.L. Bastos<sup>c</sup>, R.W.D. Portela<sup>c</sup>, R. Meyer<sup>c</sup>, F.B. Carmo<sup>a,d</sup>, J.C.M. Cruz<sup>a,d</sup>, J.A. McCulloch<sup>b,e</sup>, A.P.Lage<sup>a,d</sup>, M.B. Heinemann<sup>a,d</sup>, A. Miyoshi<sup>b</sup>, V. Azevedo<sup>b,d\*</sup>, A.M.G. Gouveia<sup>a,d\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bacteriologia Aplicada, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Departamento de Bio-Interação, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, CEP 40110-100, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>d</sup>Grupo de Extensão da Pesquisa em Ovinos e Caprinos – GEPOC

<sup>e</sup>Laboratório de Polimorfismo de DNA, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, CP 8607, CEP 66075-900 - Belém, Pará, Brazil

\* Share responsibility as senior authors

Author for correspondence: Aurora Maria Guimarães Gouveia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Av. Antônio Carlos 6627 Caixa Postal 567, Campus da UFMG CEP 30123-970. Belo Horizonte, MG Fone: +55 31 3221-6966 e.mail: aurora@vet.ufmg.br



## Abstract

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiologic agent of caseous lymphadenitis, which is a serious, economically important problem for sheep production. We examined the seroprevalence of infection by *C. pseudotuberculosis* and possible risk factors associated with caseous lymphadenitis in sheep herds of the state of Minas Gerais, Brazil. Samples were collected from 642 sheep from 97 farms. Sera of all of the sheep were tested with ELISA for antibodies against *C. pseudotuberculosis*. A questionnaire was applied to gather data on the farm, the sheep herd, the farmer, and individual animal data (breed, sex and age). This is the first sero-epidemiological survey for caseous lymphadenitis in sheep herds in Minas Gerais. We found a high real prevalence, much higher than that suggested from information obtained with the questionnaire, which points to the scarcity of vaccination against caseous lymphadenitis in the sample evaluated. Only a small proportion of the farmers declared that cases of this disease were present in their flocks. The frequency of sero-positive sheep varied significantly with breed ( $\chi^2$  test,  $P = 0.021$ ). Age group also significantly affected the percentage of sero-positivity ( $\chi^2$  test,  $P = 0.049$ ), the highest frequency being found in adult animals (more than 12 months old), when compared to the 5 – 12 month-old group ( $\chi^2$  test,  $P = 0.021$ ). The prevalence of infection with *C. pseudotuberculosis* in sheep in the state of Minas Gerais was estimated to be 70.9% (95% confidence interval (CI): 64.7 - 77.0%) and the prevalence of infected flocks being 95.9% (95% CI: 89.8 - 98.9%). We concluded that *C. pseudotuberculosis* infection is widely disseminated in sheep flocks in Minas Gerais and that caseous lymphadenitis control and eradication programs are necessary in this state.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; caseous lymphadenitis, sheep, prevalence, Minas Gerais, epidemiology, Brazil

## 1. Introduction

Caseous lymphadenitis is a chronic suppurative disease that mainly affects goats and sheep. Its etiological agent is *Corynebacterium pseudotuberculosis* and can cause debility in animals, presenting itself in cutaneous and visceral forms. The disease is distributed worldwide, with cases being reported in Europe, Australia, North and South America, Africa and the Middle East (Dorella et al., 2006).

Caseous lymphadenitis causes considerable economic losses, which range from condemnation of skins and carcasses, due to abscesses, to expressive losses in reproductive efficiency, as well as in wool, meat and milk production. Subclinical infections are also important, because they allow *C. pseudotuberculosis* to disseminate within and between herds (Paton, 1994). Also, caseous lymphadenitis can become a public health problem as it is a zoonosis (Peel et al., 1997; Join-Lambert et al., 2006). Resistance of *C. pseudotuberculosis* to antibiotics and its strenuous perseverance in the environment, associated with the difficulty in detecting infected animals, make caseous lymphadenitis hard to eradicate (Williamson, 2001).

The first case of caseous lymphadenitis in Brazil was reported in 1972 (Garcia et al., 1987) and even though this disease is found in Brazilian sheep herds, few epidemiological studies have been carried out in this country (Silva et al., 1982; Tinôco, 1983, Guimarães, 2006). There are no previous records of serological studies in herds from the state of Minas Gerais. The serological status of the herd is an indication of the presence of the infectious agent and can be used to orient control programs so that they are compatible with the actual infection rate.

Since 2000, commercial sheep husbandry has increased considerably in the state of Minas Gerais ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)), with the acquisition of animals from other regions of the country where caseous lymphadenitis is

frequent, resulting in a considerable transit of animals into Minas Gerais (ARCO, 2008). Also, the lack of species-specific sanitary legislation and the reduced availability of commercial immunogens in the Brazilian market limit the use of systematic vaccination against the etiological agent of caseous lymphadenitis (Guimarães, 2006).

The aim of this study was to assess the seroprevalence of infection with *C. pseudotuberculosis* in sheep in the state of Minas Gerais and looked for risk factors that could be associated with caseous lymphadenitis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study area and sampling

The state of Minas Gerais is located in southeastern Brazil (Fig. 1). It has an area of 588,383 km<sup>2</sup>, a mostly tropical climate, and a mean annual temperature of 21.2°C. Annual rainfall varies from 1000 to 2000 mm, with well-defined dry and wet seasons. Sampling was organized at two levels: farms and animals. To calculate the number of herds that should be sampled, we used simple sampling with an estimated

prevalence of 50%, a confidence interval of 95% and an error of 10% (Noordhuizen et al., 1997). Based on a combined list of sheep farms from the Association of Sheep and Goat Farmers of the State of Minas Gerais (Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais: Caprileite/ACCOMIG) and the state government agency for animal health (Instituto Mineiro de Agropecuária: IMA), 97 sheep farms were selected, representing 9 of the 12 mesoregions of Minas Gerais (Fig. 1). Animals were randomly selected and a fixed sampling of eight animals from each property was used (Bennett et al., 1991); for properties with less than eight sheep, all were sampled. The total animal sample was calculated as 776 sheep. Blood was collected by jugular vein puncture and the serum was separated and stored at -20°C until used for analysis.

### 2.2. Data animals

A previously tested questionnaire (Pinheiro et al, 2000) was filled out for each herd, demanding data on the farm, the herd, the farmer, and individual animal characteristics (breed, sex, age). The questionnaires were completed and the sera collected in 2002 by IMA veterinarians.

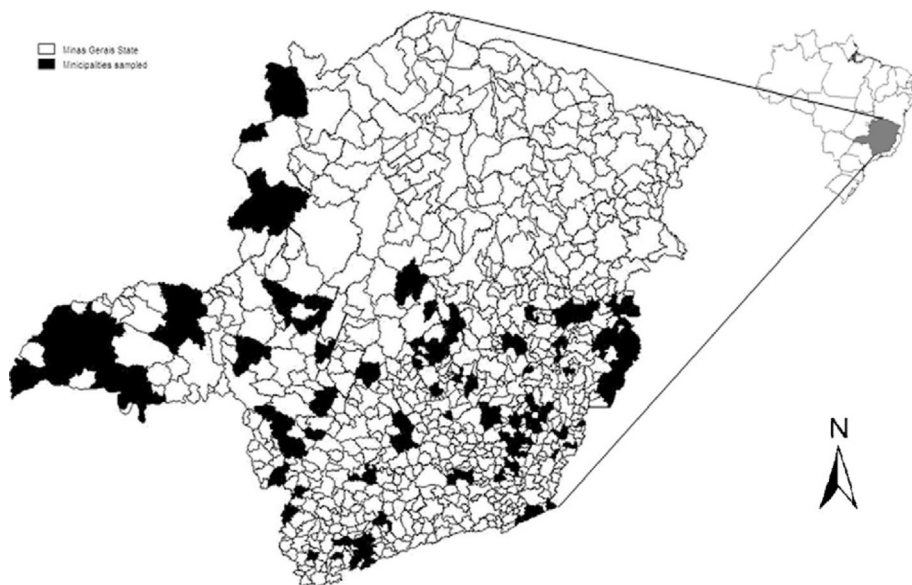


Figure 1. Municipalities with sampled flocks in Minas Gerais State, Brazil.

### 2.3. ELISA

An indirect ELISA for measuring seropositivity against *C. pseudotuberculosis* was carried out using microplates (Maxisorp, Nunc, USA) prepared with total secreted antigens of *C. pseudotuberculosis*, according to the procedures detailed by Seyffert et al. (2009). The sera were tested at a dilution of 1:100, in duplicate, with positive and negative controls included in all of the plates. The cut off point for the test was established based on the mean optical density reading (equal to OD<sub>450nm</sub> 0.150) of sera from uninfected sheep from areas that are not endemic for caseous lymphadenitis, plus three times the standard deviation (Seyffert et al. 2009). All of the optical density values that differed more than 20% between duplicates were repeated for confirmation. Readings were made with a spectrophotometer (BIO-RAD, USA) at 450 nm.

### 2.4. Data analyses

A data bank was developed using software Epi Info 6.04, (Dean et al., 1995). Serological data, prevalence calculations, confidence intervals, effects of delineation (D) and of the intra-group correlation coefficient ( $\rho$ ) were calculated and analyzed according to Bennett et al., (1991). The results were weighted as a function of the size of the herd of origin (Bennett et al., 1991; Noordhuizen et al., 1997). The real prevalence of infected animals was calculated based on sensitivity and specificity values of 93.5 and 100%, respectively (Carminati et al., 2003). Aggregate sensitivity and specificity were calculated using the software Herdacc (Jordan, D.; Guelph, Ontario, Canada) (Martin et al., 1992; Jordan, 1996). Correlations were calculated between the

frequency of seropositives and individual characteristics (sex, age, breed group) using the Chi-square test and an  $\alpha$  error level of 0.05 (Epi-Info 6.04) (Dean et al., 1995, Sampaio, 2002). The following variables: individual identification of animals, technical assistance, participation in expositions, sanitizing of the navel, husbandry system, requisition of sanitary certification when purchasing animals, origin of the herd and reproduction management were tested to see how these affected the prevalence of lymphadenitis, using the software WinEpiscope® 2.0 (Noordhuizen et al., 1997; Thrusfield et al., 2001; Dohoo et al., 2003).

## 3. Results

Questionnaires were filled out and serum samples collected from 752 animals from 97 farms in 94 municipalities located in nine of the 12 mesoregions of the state of Minas Gerais (Fig. 1). Five of the farms had fewer than eight sheep. Serum samples from 110 animals were not analyzed because of operational problems (the tube broke, excessive hemolysis or insufficient serum volume). Thus, sera from 642 were available for analysis. Prevalence of infection with *C. pseudotuberculosis* among the 642 sheep with analyzable serum samples was estimated to be 70.9% (95% CI: 64.7 - 77.0%), the real prevalence was calculated as 75.8% and the prevalence of farms with infected animals was 95.9% (95% CI: 89.8 - 98.9%). The mean number of sheep analyzed per farm was 6.6, varying from 1 to 9. The observed effect of experimental design (D) was 3.4 and the intra-conglomerate correlation coefficient ( $\rho$ ) was calculated to be 0.4. The frequency distribution of the sheep seropositive for caseous lymphadenitis, classified by sex, breed and age, is given in Table 1.

Table 1 - Frequency distribution of seropositive sheep based on ELISA for *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Minas Gerais, Brazil, 2002.

Variable	Group	Positive (n) <sup>1</sup>	Positive (%)	Total tested (n)
Sex	Females	283 <sup>a</sup>	62.1	456
	Males	108 <sup>a</sup>	58.4	185
Racial group	PE <sup>2</sup>	22 <sup>ab</sup>	61.1	36
	PN <sup>3</sup>	212 <sup>a</sup>	66.7	318
	Mixed <sup>4</sup>	16 <sup>b</sup>	48.5	33
	Unknown <sup>5</sup>	128 <sup>b</sup>	55.2	232
Age (months)	≤4	11 <sup>ab</sup>	52.4	21
	5 – 12	90 <sup>b</sup>	53.9	167
	> 12	291 <sup>a</sup>	64.1	454

<sup>1</sup> Different letters for the same variable indicate significant differences (P < 0.05).

<sup>2</sup>PE: Pure Exotic, pure animals of foreign races

<sup>3</sup>PN: Pure National, pure animals of domestic races

<sup>4</sup>Mixed: Crosses of domestic and/or foreign races

<sup>5</sup>Unknown: No race defined

Sex did not significantly affect seropositivity (P = 0.386). The animals were grouped as pure foreign (Texel, Suffolk and Merino), pure national (Morada Nova, Somális, and Santa Inês), mixed breed (crosses between national and/or foreign races) and undefined race, for the analyses. The frequency of seropositivity varied significantly among the four racial groups (P = 0.021). Differences were also found between the pure national and pure foreign groups (P = 0.037) and between pure national and undefined race (P = 0.006). There was also a significant

difference among age groups (P = 0,049). The highest frequency was among adult animals (over 12 months), significantly higher than the 5-12 months old group (P = 0.021). The criterion used to select variables for analysis of risk ratios was their potential influence on the epidemiology of caseous lymphadenitis. The main management practices identified and the risk analysis of variables that are predictors of risk for caseous lymphadenitis in the sheep herds are given in Tables 2 and 3, respectively.

Table 2. Principal management practices identified among the 97 sheep herds studied to determine caseous lymphadenitis incidence in the state of Minas Gerais, Brazil, 2002.

Variable	n	%
Reported vaccination against caseous lymphadenitis	0	0
Declared that they had caseous lymphadenitis in their herd	11	11.3
Slaughters animals at more than 12 months	23	23.7
Does not separate animals with clinical signs of caseous lymphadenitis	91	93.8
Does not separate animals by age group	89	91.7
Does not identify animals individually	75	77.3
No technical assistance	57	58.8
Participates in expositions	8	8.2
Asks for a sanitary certificate when purchasing sheep	18	18.6
Does not disinfect to navel of newborns	23	23.7
Extensive/semi-extensive rearing system	53	54.6

Table 3. Risk analysis of variables that are predictors of risk for caseous lymphadenitis in sheep farms in Minas Gerais

Sheep farm characteristic	Prevalence ratio	Confidence interval
Animals not individually identified	1.060	1.001 - 1.122
No technical assistance	1.064	0.992 - 1.141
Participate in expositions	1.067	1.008 - 1.129
Extensive/semi-extensive management system	1.082	1.002 - 1.168

#### 4. Discussion

Our study was the first sero-epidemiological study of caseous lymphadenitis in sheep herds in the state of Minas Gerais. The prevalence we found was high, with a seropositivity of 75.8%. This contrasts with information supplied by farmers, as only a small number reported this disease in their herds and most did not vaccinate against caseous lymphadenitis (Table 2). Difficulty in detecting this disease, and management information tailored for and directed towards sheep farmers and the lack of a comprehensive control program for caseous lymphadenitis probably had an influence on the ignorance about this disease on the part of the sheep farmers.

The high serological prevalence that we found, compared with the low rate of cases of caseous lymphadenitis reported by the farmers demonstrates that this disease is neglected in these farms or that the farmers are not prepared to handle it. Also, the long incubation period (up to 180 days) and the occurrence of the visceral form of this disease (Williamson, 2001; Valli et al., 2007; Dorella et al., 2006), which is detected only by serological tests during *post-mortem* exams or at slaughter, contribute to the fact that farmers have little concern for this disease, increasing the risk of dissemination of the infectious agent.

Few epidemiological studies have been made on caseous lymphadenitis in sheep in Brazil. We found only two such studies, one in the southern region of the country and the other in the Northeast. Silva et al. (1982)

examined 9,410 sheep from eight municipalities in the state of Rio Grande do Sul; these had been butchered with federal inspection. They found a frequency of positivity of 1.5% among castrated males and 8.1% in ewes. Tinôco (1983) reported a frequency of 36.5% of sheep farms that reported infection with caseous lymphadenitis, based on questionnaires answered by sheep farmers. We found a much higher prevalence among sheep herds and individual sheep in Minas Gerais, though the results are difficult to compare due to differences in methodologies, region and time of year.

The lack of serological studies to determine the prevalence of caseous lymphadenitis in other Brazilian states and the lack of data on the damage caused by this pathogen to farms and slaughterhouses, reinforces the notion that the actual economic importance of this disease for ovine breeding in Brazil is underestimated. In Australia, Paton et al. (1994) estimated losses of 4.1 to 6.6% in wool production, with annual losses of 17 million Australian dollars, without including subclinical losses, which are important for farmers, because they negatively impact on production, though the extent of such damage is unknown (Paton, 2003).

Among the farms that were sampled, 95.9% (93/97) had at least one positive sheep. Nearly all of the sampled farms had animals infected by *C. pseudotuberculosis*; among the 94 municipalities, 90 (95.7%) had at least one positively-testing animal. Diagnosis of herds based on finding a single animal to be infected was possible due to its high sensitivity and specificity, calculated as

a function of the characteristics of the diagnostic procedure and the observed and expected levels of prevalence (Martin et al., 1992; Jordan, 1996).

The estimate of the prevalence of animals infected by *C. pseudotuberculosis* in Minas Gerais was also acceptable, as the actual prevalence calculated from the ELISA data, 75.8%, was within the estimated confidence interval for prevalence. The intraclass correlation coefficient ( $\rho$ ) value found in this study was within the range observed by McDermott and Schukken (1994), which varied from 0.0017 to 0.46, but was larger than that estimated by Otte and Gumm (1997), 0.20, and than that observed by many other authors (McDermott and Schukken, 1994), between 0.01 and 0.15, for most infectious diseases. This reflects the lack of homogeneity in the distribution of the disease in each flock, which had a high variation from herd to herd, from 12.5 to 100% in infected flocks (data not shown), although the great majority of them were infected.

Design effect is calculated based on sampling error, which is higher in cluster sampling (Bennett et al., 1991). In our study, it was mainly influenced by the irregular size of the samples in each herd. This resulted from differences in herd size, which varied from two to 1,843 sheep (mean 80.7 sheep, data not shown), and material lost between collection and laboratory analysis. Although sampling and blood collection were well conducted, some problems with the transportation of sera resulted in the loss of many serum samples, which influenced the design effect.

Only four of the flocks were not found to bear animals presenting infection. Samples obtained from those herds may not have been large enough to detect the disease. The high frequency of herds with infected sheep again shows that caseous lymphadenitis is widespread in the state of Minas Gerais, which is the state with the second largest sheep population in the southeastern region of Brazil ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)).

The prevalence of this disease in adult sheep in Australia was over 61% before they began vaccinating for caseous lymphadenitis (Middleton, 1991). It then fell to 20 – 29% (Paton et al, 2003). Currently, three commercial immunogens are available in Brazil; however, few farmers systematically vaccinate their sheep for caseous lymphadenitis or have no information on the health situation of their herds, especially regarding the serological status for the disease, which is fundamental for developing control strategies (Dorella et al. 2009). It is apparent that a control program that includes vaccination would be quite useful for reducing infection with *C. pseudotuberculosis* in this state.

Seroreactivity did not differ significantly between males and females ( $p>0.05$ , Table 1), as was also found by Silva et al. (1982). Seropositivity was more frequent in the pure local breeds. There were significant differences in the comparison between pure local and no defined race, and also between pure local and mixed breed (Table 1). The race Santa Inês and the group “no defined race” are the main contributors to the racial mix of the Minas Gerais sheep population, which was mainly founded by animals from the northeastern region of Brazil (ARCO, 2008), where the incidence of caseous lymphadenitis is high and sheep and goats are often kept together (Tinôco, 1983; Pinheiro et al, 2000). Pure-bred animals are generally reared in an intensive system and many such sheep are sold in auctions and expositions, favoring the dissemination of the infectious agent when these animals are used to form or genetically improve herds.

When buying sheep, only 11.7% of the farmers asked for health certification, and most were not aware of the importance of this measure to maintain the health of their herds. Among producers who asked for health certificates, they were concerned with brucellosis, tuberculosis, rabies and anthrax, which are normally a concern for transit of bovines. None of the sheep farmers indicated that they required that the animals they purchased be free of caseous lymphadenitis.

The high frequency of serologically positive animals in the up-to-four-month-old category and the lack of a significant difference in this rate when compared to adult animals (Table 1) may be due to acquisition of infection early in the life of the animal, as hinted by the high frequency of infection in young animals (Table 1). This suggests that control efforts, to reduce or eliminate transmission of *C. pseudotuberculosis*, should be directed towards this age group.

Seropositive frequency was highest among adult animals (Table 1). O'Reilly et al. (2008) demonstrated that besides contact with the purulent material from abscesses, and environmental contamination, respiratory transmission (aerosols) can influence the maintenance of the infectious agent in the herd. Among the 97 farms that were sampled, 23 (23.7%) slaughtered the sheep at a later age, at 12 months or more; also, 93.8% (91/97) did not adopt control measures, such as segregation of clinically affected animals, and they did not separate the animals by age group (Table 2), which would explain why caseous lymphadenitis is common in sheep over one year old. These conditions are favorable for the dissemination of the infectious agent, because along with high risk of contact with infected purulent material, the probability of pulmonary lesions is higher in older animals (O'Reilly et al 2008).

Determining risk factors associated with prevalence helps with the planning of control programs, in order to attend market requirements for more and improved quality sheep meat and reduce losses for farmers. We found prevalence ratios of above one for the variables: lack of individual animal identifications, lack of technical assistance, participation in expositions and extensive/semi-extensive rearing system (Table 3). Nevertheless, these variables should not be considered key risk factors, because their indication of sero-positivity prevalence was only marginally above 1; also, for one of them, lack of technical assistance, the confidence interval ratio included unity (Noordhuizen et al., 1997; Dohoo et al., 2003; Medronho, 2006).

These results could be a consequence of the type of study, transversal, which is not the best for identifying risk factors, and the high frequency of farms with seropositive animals, as only four herds were not seropositive (Dohoo et al., 2003; Medronho, 2006).

Even though they were not identified as significant risk factors for caseous lymphadenitis in sheep herds in the state of Minas Gerais, changes in the management schemes for the variables with ratios above 1 (Table 3) could help control the disease. The correct identification of animals results in improved control of the herd, because it allows separation of animals found to be infected, with introduction of specific management measures for controlling caseous lymphadenitis. This requires involvement of the farmer and monitoring of the control program for each farm, as well as training and education for farm workers. Participation in expositions and auctions is always a risk factor for the introduction of caseous lymphadenitis. These events are important for the commercialization of breeding stock and ewes.

Nevertheless, due to a lack of a routine laboratory diagnostic procedure that would attend to sanitary legislation, diagnosis is based on clinical exams alone. The sensitivity of this procedure is low, which allows animals without clinical signs characteristic of caseous lymphadenitis, both visceral and subclinical, to participate in events, disseminating *C. pseudotuberculosis*. Therefore, participation in events should be restricted to only those farms that use techniques that are sensitive enough for the diagnosis of caseous lymphadenitis, such as ELISA, for selecting animals. Increased observation of animals, associated with individual identification, even in extensive rearing operations, can help avoid factors that predispose towards this disease, such as exposition to mechanical agents that cause skin lesions, including barbed wire, narrow gates and passageways, cutting edges of feeding stations, and spiny vegetation, all of which are found in rural properties in the state of Minas Gerais.

Our findings support the notion that control of caseous lymphadenitis is done without effective diagnosis that would be needed for segregation and discard of seropositive animals. The lack of these measures and of vaccination, which we found in our study, allows for the dissemination of this infectious agent throughout the production network. Consequently, we conclude that caseous lymphadenitis is amply disseminated in the sheep population of the state of Minas Gerais and is overlooked by most farmers, favoring the endemicity of this disease.

### Acknowledgements

We thank the Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) and their veterinarians for their help during the course of this project, collecting sera and filling out questionnaires on sheep herds in Minas Gerais. Financial support was provided by the Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (FEP-MVZ). ASG, APL, VA are indebted to CNPq for their fellowships.

### References

- ARCO. 2008. Arquivo da Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO). Available from the site [www.arcoovinos.com.br](http://www.arcoovinos.com.br). Accessed: March 10, 2009.
- Baird, G.J. & Fontaine, M.C., 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Path.* 137, 179-210.
- Bennett, S., Woods, T., Liyanage, W.M., Smith, D.L., 1991. A simplified general method for cluster-sample surveys of health in developing countries. *Rapp. Trimest. Sanit. Mond.* 44, 97-106.
- Carminati, R., Bahia, R., Costa, L.F.M., Paule, B.J.A., Vale, V.L., Regis, L., Freire, S.M., Nascimento, I., Schaer, R., Meyer, R., 2003. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos, *R. Ci. Méd. Biol.* 2, 88-93.
- Dean, A. G., Dean, J. A., Burton, A. H., Dicker, R. C., 1995. Epi info, version 6: A word processing, database and statistic program for epidemiology on micro-computers. Center for Disease Control, Atlanta, Georgia.
- Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2003. *Veterinary epidemiologic research*. Charlottetown: AVC, 706pp.
- Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Oliveira, S.C., et al., 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37, 201-218.
- Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., Portela, R.W., Meyer, R., Miyoshi, A., Azevedo, A., 2009. Antigenes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Exp. Rev.* 2, 205-213.
- Fontaine, M.C. & Baird, G.J., 2008. Caseous lymphadenitis. *Small Rumin. Res.* 76, 42-48.
- Garcia, M., Araújo, W.P., Carvalho, V.M., Costa, E.O. 1987. Isolamento e identificação do *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.* 24, 23-25.
- Guimarães, A.S., Gouveia, A.M.G. 2006. Caracterização da caprinovincultura em Minas Gerais 84pp. (Masters thesis of the Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais).
- IBGE. Censo agropecuário 2007; Minas Gerais. Available at: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Accessed: March 10, 2009.



- Join-Lambert, O. F., Ouache, M., Canioni, D., Beretti, J.L. Blanche, S., Berche, P. Kayal, S. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. The Pediatr. Infect. Dis. J. 25, 9.
- Jordan, D. 1996. Aggregate testing for the evaluation of Johne's disease herd status. Aust Vet J. 73, 16-19.
- Martin, S.W., Shoukri, M., Thorburn, M.A., 1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. Prev. Vet. Med. 14, 33 – 43.
- McDermott, J.J., Schukken, Y.H., 1994. A review of methods used to adjust for cluster effects in explanatory epidemiological studies of animal populations. Prev. Vet. Med. 18, 155-173.
- Medronho, R.A., Carvalho, D.M., Bloch, K.V., Luiz, R.R. Werneck, G.L. 2006. Epidemiologia. Edição 2006, Ed. Atheneu, São Paulo, 493pp.
- Middleton M.J, Epstein V.M., Gregory G.G., 1991. Caseous lymphadenitis on Flinders Island: prevalence and management surveys. Aust. Vet. J. 68, 311.
- Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van Der Hoofd C.M., Graaf E.A.M., 1997. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen Pers, Wageningen, The Neth. 445pp.
- O'Reilly, K.M., Green, L.E., Malone, F.E., Medley, G.F., 2008. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis* transmission in sheep. Prev. Vet. Med. 83, 242–259.
- Otte, M.J., Gumm, I.D., 1997. Intracluster correlation coefficient of 20 infections calculated from the results of cluster-sample surveys. Prev. Vet. Med. 31, 147-150.
- Paton, M. W., Rose, I. R., Hart, R. A., Sutherland, S. S., Mercy, A. R., Ellis, T.M.; Dhaliwal, J. A., 1994. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. Aust. Vet. J. 71, 47-49.
- Paton, M.W., Walker, S.B., Rose, I.R., Watt, G.F., 2003. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. Aust. Vet. J. 81, 91–95.
- Peel, M.M. Palmer, G.G., Stacpoole, A.M., Kerr, T.G., 1997. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. Clin. Infect. Dis. 24 185-191.
- Pinheiro, R.R., Gouveia, A.M.G., Alves, F.S.F., Haddad, J.P.A., 2000. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 52, 534-543.
- Sampaio, I.B.M., 2002. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 2 ed. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte. 265 p.
- 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., 2009 High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Res. Vet. Sci. (in press).
- Silva, S.F., Santos, A.F., Lauzer J.J., Costa, D.F., 1982. Linfadenite caseosa em ovinos abatidos na região de Campanha do Rio Grande do Sul. Rev. Cent. Cienc. Rur. 12, 149-154.
- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J.P., Frankena, K., 2001. Win Episcopes 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. Vet. Rec. 148, 567-572.
- Tinôco, A.L.A., Diagnóstico de situação da ovino/caprinocultura em três municípios do sertão baiano – Euclides da Cunha, Quijingue, Monte Santo – Bahia, 1981/1982.

Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 13pp. (Seminário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais).

Valli V.E.O., Gentry P. 2007. Hematopoietic System. In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. ed. M.

Grant. Maxie. vol 3. 5ed. Saunders Ltd.,107-324

Williamson, L.H. 2001. Caseous lymphadenitis in small ruminants; Vet. Clinic. North. Amer. Food. Anim. Pract.. (17) 359–371.

#### **4 - CAPITULO 3**

**LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO DE MINAS  
GERAIS: CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FORNECEDORAS DE  
OVINOS AO FRIGORÍFICO E SOROEPIDEMIOLÓGICA A PARTIR DE SOROS  
COLETADOS**

## 4.1 – Introdução

A ovinocultura de subsistência é uma atividade presente em criações de animais de corte concentrados no norte de MG desde as décadas de 60 e 70, mas houve grande crescimento no número de criatórios na década de 90, principalmente a partir de 1998, o qual continua até hoje com grande demanda de animais e de carne (Guimarães e Gouveia, 2006). A pouca informação sobre os sistemas de produção parece ser a regra em quase todas as regiões do país (Medeiros et al., 2005).

Para que a ovinocultura possa se estabelecer como efetiva alternativa econômica, torna-se fundamental conhecer os aspectos epidemiológicos que envolvem a atividade, com especial atenção para aquelas propriedades envolvidas diretamente com o fornecimento de matéria prima para a indústria de abate ovino, visto que o frigorífico é o elo final da cadeia produtiva da carne ovina e a qualidade do produto final depende diretamente da qualidade da matéria prima, ou seja, é consequência direta do manejo adotado nas propriedades fornecedoras.

Desde que a LC foi diagnosticada no Brasil (Duport, 1918, citado por Garcia, 1987), somente um trabalho em frigorífico com abate sistemático de ovinos foi realizado. Silva et al. (1982) examinaram 9410 ovinos procedentes de oito municípios do Rio Grande do Sul abatidos em frigorífico com inspeção federal e encontraram positividade de 1,5% em machos castrados e 8,1% em ovelhas, porém não foram realizadas coletas de amostras de conteúdo de nódulos caseosos e nem soros entretanto, já naquela época, os autores destacam o papel limitante da LC na produção da indústria de carne ovina e sua exportação.

A falta de levantamentos sorológicos para LC no Brasil com objetivo de diagnosticar a doença e também de dados relativos aos prejuízos causados pelo agente às

propriedades acometidas e aos frigoríficos reiteram o desconhecimento da sua importância econômica para a ovinocultura.

A disponibilidade de parceria público-privada (setor produtivo, indústria e pesquisa) com a total abertura por parte da indústria para execução de pesquisa voltada para a caracterização da LC ovina possibilitou o levantamento sobre manejo nas propriedades fornecedoras, com foco nas medidas adotadas junto aos rebanhos de criação de ovinos, na prevenção da LC e o delineamento de ações de pesquisa iniciadas dentro da indústria, envolvendo pesquisadores, com apoio da equipe oficial envolvida na inspeção (SIF). O objetivo dessa etapa foi caracterizar a situação da LC nas propriedades e fazer caracterização soroepidemiológica através da análise de dados obtidos a partir de soros e conteúdo de lesões coletados na linha de abate, que foram processados em laboratório para quantificar a presença do *C.pseudotuberculosis* em carcaças ovinas com inspeção federal, destinadas ao mercado interno.

## 4.2 – Material e Métodos

### 4.2.1. - Marco amostral

Um questionário específico para LC (Anexo 3) contendo questões relativas aos aspectos da propriedade e do rebanho foi proposto pelo Grupo de Extensão da Pesquisa em Ovinos e Caprinos (GEPOC) para a indústria com objetivo de orientá-la no conhecimento do perfil e coletar informações sobre medidas de controle da LC adotadas nas 60 propriedades fornecedoras de ovinos. A aplicação do questionário aos responsáveis pelas propriedades foi realizada por funcionário do frigorífico, técnico agrícola, encarregado de visitar as propriedades para avaliação e compra dos animais. Os dados foram armazenados em programa Windows Excel 2007 e a frequência de cada variável na amostra foi levantada. Deve-se ressaltar

que o universo amostral foi constituído exclusivamente pelas propriedades fornecedoras do frigorífico e, portanto, a hipótese foi de que nessas propriedades, medidas de manejo tais como identificação individual, poderiam ser superiores aos índices médios do Estado, em consequência de maior exigência sanitária por parte da indústria em relação a seus fornecedores.

As informações tabuladas a partir das variáveis contidas nos questionários foram utilizadas para conhecer o perfil dessas

propriedades em aspectos de manejo zoossanitário relacionados com a LC. O perfil definido com esse questionário serviu para confeccionar cartilha direcionada aos ovinocultores com objetivo de orientá-los no controle da enfermidade. Essas informações possibilitaram ainda, conhecer o perfil da LC em propriedades fornecedoras de matéria prima para indústria de abate ovino.

As 60 propriedades credenciadas como fornecedoras do frigorífico estão localizadas em 29 municípios de MG (Figura 1)

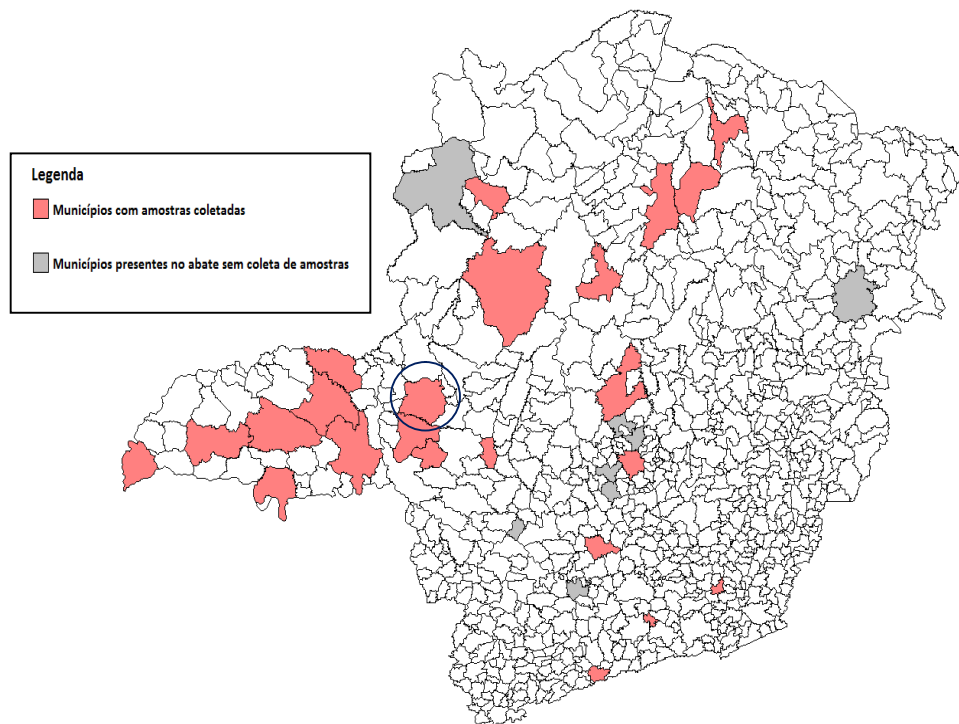


Figura 1 – Municípios em Minas Gerais com propriedades fornecedoras de ovinos para abate inspecionado em Patrocínio (circulado), 2007.

Esta etapa da pesquisa foi realizada nas instalações de frigorífico, credenciado para exportação, sob inspeção federal do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SIF/MAPA), localizado no município de Patrocínio, MG, voltado para abate de suínos, mas com adaptações na linha que possibilitavam o abate de ovinos, aos sábados, uma ou duas vezes ao mês, começando as 7 h da manhã e terminando as 18 h, entre os meses de julho e dezembro de 2007. Foram coletadas amostras de conteúdo caseoso de ovinos procedentes de 21 propriedades e soros de 23 propriedades.

#### **4.2.2 - Exame e identificação *ante mortem* dos ovinos e coleta de material no frigorífico**

Os animais foram selecionados aleatoriamente de acordo com a disponibilidade de tempo para coleta, pois a velocidade da linha de abate era tal que alguns animais não tiveram coletadas amostras de sangue e/ou material caseoso, já que os técnicos envolvidos na coleta não

podiam interferir no processo de abate, tendo que se adequarem à rotina e velocidade de trabalho.

Os ovinos envolvidos nessa pesquisa foram inspecionados clinicamente com palpação dos linfonodos submandibular, parotídeo e pré-escapular e identificados com brincos numerados em ordem crescente por dois médicos veterinários, sempre na noite anterior ao dia do abate, no momento de sua chegada nos currais de espera, onde ficavam em jejum sanitário por 12 h.

Os animais eram atordoados por eletrocução e a coleta de sangue ocorreu durante o processo de sangria, na mesa e com animal devidamente imobilizado, em tubos de vidro, esterilizados e identificados de acordo com o número do brinco (Figura 2A); os frascos eram mantidos em repouso para coagulação (Figura 2B) e transportados sob refrigeração até o Laboratório de Sanidade de Ovinos e Caprinos (LASOC) da Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG).

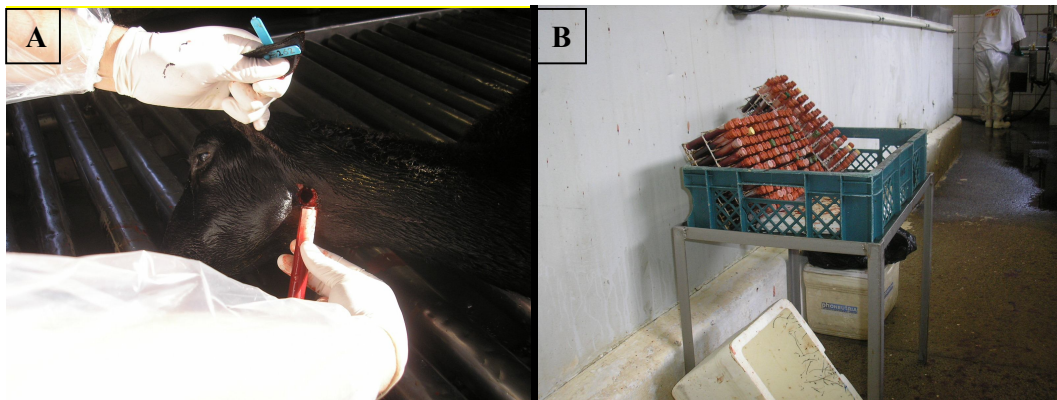


Figura 2 – A. Coleta de soro na mesa de sangria de frigorífico; B. Tubos devidamente identificados, em repouso para dessoragem, em Patrocínio, Minas Gerais, 2007

#### **4.2.3 – Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis***

Os ensaios de ELISA foram realizados segundo Carminati e colaboradores (2003) modificados para espécie ovina, com 93,5% de sensibilidade e 100% de especificidade, utilizando antígenos totais secretados de *C. pseudotuberculosis* cultivado em meio quimicamente modificado. Placas da marca Nunc Maxisorp foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno diluído 1:100 em tampão bicarbonato 0,05M pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 h a 4°C, bloqueadas com caseína a 2% por 2 h a 37°C, em seguida foram lavadas quatro vezes com PBS (0,15 M NaCl, 0,01 M PO<sub>4</sub>, pH 7,2) mais Tween 20 a 0,05% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) (PBS-T). Cinquenta microlitros do soro teste diluído 1:100 em PBS-T mais albumina sérica bovina a 1% (Bibrás, Montes Claros, Brasil) foram adicionados em duplicata e incubados por 1 h a 37°C. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T e incubadas por 45 minutos à 37°C com 50 µL soro anti-ovinos conjugado com peroxidase (Dako Laboratories) diluído 1:20000 em PBS-T. Após lavagem adicional com PBS-T, as reações foram reveladas com 50 µL de cromógeno TMB (tetramethylbenzidine) (Pierce) como substrato. A reação foi bloqueada com adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 1 N e os resultados foram lidos em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 – 620 nm (BIO-RAD). O ponto de corte do ensaio foi calculado pela média dos resultados de 45 soros ovinos de áreas não endêmicas para LC (0,15), somada a três desvios padrão, para confirmar o status de soropositivo, obtendo-se densidade ótica (DO) de 0,32 como ponto de corte. Resultados com diferença acima de 20% entre amostras foram repetidos para confirmação. O conjugado anti-anticorpo para LC em ovinos, foi previamente diluído em PBS-T a 1:10000, 1:20000 e 1:30000, testado em duplicatas com soros sabidamente positivos e negativos, os melhores resultados foram obtidos com a diluição 1:20000; o cromógeno foi comprado pronto para uso.

Foram abatidos 5680 ovinos no período entre Julho e Dezembro de 2007, dos quais 805 soros foram coletados de 2270 ovinos amostrados provenientes de 23 propriedades em 20 municípios, totalizando sete visitas ao frigorífico.

#### **4.2.4 – Coleta de conteúdo de abscessos**

As condições sanitárias das carcaças foram avaliadas na sala de abate depois da retirada da pele por funcionários designados especificamente para isso. Objetivando ótimos rendimentos de carcaça e características organolépticas da carne, a idade mínima permitida pelo frigorífico para abate era de quatro meses e a máxima de 1,5 ano.

A inspeção dos linfonodos por técnicos do SIF ocorreu em sala fisicamente separada da sala de abate, conhecida como “sala limpa”, incluindo palpação e incisão dos linfonodos pré-escapulares. Abscessos localizados nesses linfonodos (Figura 3A) tiveram seu conteúdo coletado por veterinário, aluno de pós-graduação da EV-UFMG, sem nenhum contato direto, pois todo o manuseio ocorreu utilizando instrumental específico dos inspetores do SIF. As amostras foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos, lacrados, identificados e transportados sob refrigeração até o LASOC, onde foram processados. Nas últimas coletas, o veterinário responsável pelo SIF, acatou a sugestão de acrescentar a inspeção dos linfonodos submandibulares, visto que esses também são muito acometidos pela *C. pseudotuberculosis*, a partir desse momento seu conteúdo caseoso passou a ser coletado também.

De acordo com as normas do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (RIISPOA/MAPA) as carcaças de bovinos que apresentem apenas um linfonodo acometido com adenites sofrem condenação da região e quando dois ou mais estão alterados procede-se a



condenação total da carcaça (RIISPOA, 2008). Nesse trabalho, quando somente um linfonodo da região da cabeça e pescoço estava acometido era feito um corte em forma de cruz (Figura 3B) nos músculos da paleta para que outro funcionário, a frente na linha de inspeção, fizesse a retirada completa do membro e posterior inspeção minuciosa dos demais linfonodos da

carcaça e, caso outros nódulos fossem encontrados, ela era condenada.

Dados de lesões encontradas nas carcaças durante o período de coleta de material foram fornecidos pelo SIF, com as informações quanto à localização dianteira (D) e/ou traseira (T) ou condenação.

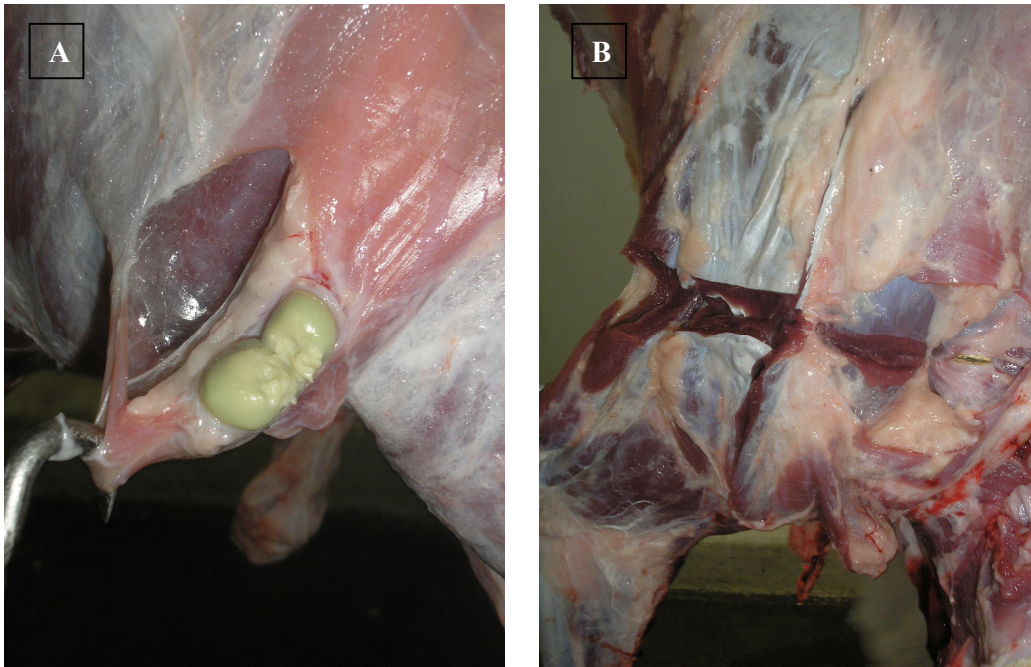


Figura 3 – A. Conteúdo caseoso em linfonodo pré-escapular; B. Corte em cruz no membro anterior dianteiro, indicador de descarte em função de lesão típica de linfadenite caseosa

#### 4.2.5 – Isolamento bacteriano nas amostras coletadas

Com objetivo de planejar a etapa de coleta de amostras clínicas, transporte, armazenamento pré-cultivo e otimizar o processamento laboratorial simultâneo de maior número de amostras, foi efetuado pré-experimento para definir o tempo de viabilidade do *C. pseudotuberculosis* em material clínico caseoso. Amostras coletadas em frigorífico foram mantidas sob congelamento (-20°C) por período variável até a cultura em placas de Petri com ágar brain-heart-infusion (BHI) acrescido de 5%

de sangue ovino desfibrinado; foi constatado que o *C. pseudotuberculosis* permaneceu viável no material caseoso por um período médio de 42 dias pós coleta.

As amostras clínicas de material caseoso foram congeladas *in natura* em microtubos de 1,5 mL até o procedimento de isolamento e identificação bacteriano. Os espécimes clínicos foram semeados em placas de Petri com ágar BHI mais 5% de sangue ovino desfibrinado e incubados a 37°C por 48 h. Após dois ou três repiques, realizados da mesma forma que o repique primário, as colônias com coloração creme, opacas e



com zona de hemólise ao redor, características de *C. pseudotuberculosis* foram armazenadas em meio de congelamento, BHI líquido (80%) e glicerol (20%), para os testes bioquímicos posteriores.

#### 4.2.6 - Identificação bioquímica dos isolados

O *C. pseudotuberculosis* caracteriza-se como bacilo GRAM positivo, curto, irregular e muito pleomórfico (0,5 a 0,6 µm por 1 a 3

µm), podendo apresentar aspecto cocóide, isolado ou formando grupamentos irregulares ou em paliçada. São organismos imóveis, aeróbicos tolerantes e anaeróbicos facultativos; metabolizam e fermentam carboidratos; não formam esporos, produzem β-hemólise e multiplicação lenta em meios enriquecidos, como ágar sangue, ágar ou caldo BHI (Dorella, et al., 2006).

A Tabela 2 apresenta as espécies de bactérias utilizadas como controles para provas bioquímicas.

Tabela 1 – Bactérias utilizadas como controles positivo e negativo para provas bioquímicas, para identificação de *C. pseudotuberculosis* de Minas Gerais, 2007.

Controles	Positivo (ATCC)	Negativo (ATCC)
Sacarose	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	<i>Salmonella sp</i> (14028)
Manose	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	<i>Proteus mirabilis</i> (25933)
Glicose	<i>Proteus mirabilis</i> (25933)	<i>Rhodococcus equi</i>
Maltose	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	<i>Proteus mirabilis</i> (25933)
Manitol	<i>Escherichia coli</i> (1341)	<i>Listeria monocytogenes</i> (19115)
Xilose	<i>Proteus mirabilis</i> (25933)	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)
Ribose	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	<i>Proteus mirabilis</i> (25933)
Urease	<i>Proteus mirabilis</i> (25933)	<i>Escherichia coli</i> (1341)
Motilidade	<i>Proteus mirabilis</i> (25933)	<i>Escherichia coli</i> (1341)
Ácido sulfídrico	<i>Proteus mirabilis</i> (25933)	<i>Escherichia coli</i> (1341)
Redução de nitrato	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	<i>Listeria monocytogenes</i> (19115)
Catalase	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	<i>Escherichia coli</i> (1341)
GRAM	<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	<i>Escherichia coli</i> (1341)

As amostras congeladas em meio BHI e glicerol (-20°C) foram recultivadas em meio BHI acrescidos de 5% de sangue ovino desfribinado e submetidas a avaliação morfo-tintorial (GRAM) e aos seguintes testes bioquímicos para identificação: catalase, motilidade e produção de ácido sulfídrico, redução de nitrato a nitrito, produção de urease e prova de CAMP para confirmação de hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* e inibição da hemólise com *Staphylococcus aureus*, além das provas fermentativas de sacarose, manose, glicose, maltose, manitol, xilose e ribose (MacFaddin, 1980, Smibert e Krieg, 1994). A leitura de todas as provas foi realizada 48 h após inoculação, seguindo os seguintes critérios de identificação do *C. pseudotuberculosis*:

- GRAM positivo com pleomorfismo
- Catalase: positiva
- Urease: positiva
- Redução de nitrato a nitrito: negativa
- CAMP: hemólise sinérgica com *R. equi* positiva e inibição da hemólise com *S. aureus*
- Fermentação positiva: sacarose, manose, glicose, maltose, manitol, xilose e ribose dentro dos parâmetros estabelecidos em tabela do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994.

#### 4.2.7 - Extração do DNA total a partir de culturas

As amostras de material cultivado, consideradas positivas para *C. pseudotuberculosis* nas provas bioquímicas, tiveram o DNA extraído conforme apresentado a seguir:

As amostras previamente cultivadas no LASOC foram levadas para Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) onde se procedeu a extração do DNA genômico. O material proveniente de culturas novas foi coletado com alças descartáveis, acondicionado em microtubos de 1,5 mL com 1 mL de PBS (0,15M NaCl, PO<sub>4</sub> 0,01M, pH 7,2), foram centrifugadas a 3000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 1 mL da solução I (Anexo 2) (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM; NaCl 300 mM; pH 7,0). Após agitação em vortex, a mistura foi novamente centrifugada, a 3000 g, por 10 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao sedimento 1 mL de solução II (Anexo 2) (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10mM; NaCl 300 mM; lisozima 10 mg/mL, pH 8,0), em seguida a amostra foi incubada em banho-maria por 30 min a 37°C. A seguir foram adicionados 30 µL de sarcosil 30%, homogeneizados por 15 min e mantidos em banho-maria a 65°C por cinco min, seguido por incubação a 4°C por cinco min.

Para purificação do DNA extraído, foi utilizado um protocolo padrão de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Sambrook e cols., 1989). Em resumo, 1 mL da solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico foi adicionado à amostra. Após agitação em vortex, as amostras foram centrifugadas a 3000 g por sete minutos; a fase superior foi retirada e transferida para um novo microtubo de 2 mL e o passo de purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico repetido. Ao final, a fase superior foi transferida para um novo microtubo para precipitação do DNA genômico; etanol

absoluto foi adicionado numa quantidade equivalente a duas vezes o volume da amostra e acrescentado solução de acetato de sódio (3M) em quantidade equivalente a 10% do volume da amostra, e solução de glicogênio equivalente a 1% do volume total. Em seguida incubou-se a solução por 18 h a 20°C. Após centrifugação a 2000 g por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol a 70% e o DNA ressuscitado em água ultra pura (mili-Q) estéril.

#### 4.2.8 - Primers e PCR multiplex de material cultivado

Todas as amostras de DNA foram analisadas por PCR multiplex (PCRm) (Pacheco et al, 2007) seguindo o seguinte protocolo:

As reações foram preparadas em microtubos de 200 µl (PerkinElmer) e realizadas em um termociclador (PTC-100, MJ Research Inc.), com todos reagentes da marca Invitrogen e com volume de reação final de 10 µl contendo 1.5 U de Taq DNA polimerase AccuPrime™, 1X PCR tampão 10X II (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs) e 2 µM de cada um dos primers: 16S-F/ 16S-R, C2700F/ C3130R and PLD-F/ PLD-R2. PCR foi feito com amostras de DNA extraídas de culturas puras de *C. pseudotuberculosis* com concentração aproximada de 10-100 ng of DNA molde. As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 min.; 40 ciclos de 95°C por 1 min., 58°C por 40 sec., e 68°C por 1 min. e 30 sec.; a extensão final foi a 68°C por 7 min. Os produtos amplificados, adicionados de brometo de etídeo (0,5 mg/mL), foram identificados em eletroforese a 60-70 V por 1 hora em gel de agarose a 1,5% (Çetynkaia, 2002, Pacheco, 2007). Os produtos da PCR que apresentaram os três amplicons com peso molecular de 203 (pld), 446 (rpoB) e 816 (16S rRNA) pb foram considerados de *C. pseudotuberculosis*. A Tabela 3 apresenta os primers utilizados no PCRm (Pacheco et al, 2007).

Tabela 2 - Primers de oligonucleotídeos utilizados na PCR multiplex, para identificação de *C. pseudotuberculosis* de Minas Gerais, 2007.

Gene	Primers	Seqüência (5' – 3')
16S rRNA	16S-F ACCGCACTTTAGTGTGTGTG 16S-R TCTCTACGCCGATCTTGTAT	816 pb
rpoB	C2700F CGTATGAACATCGGCCAGGT C3130R TCCATTTGCGCCAAGCGCTG	446 pb
pld	PLD-F ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA PLD-R1 ATCAGCGGTGATTGTCTTCC	203 pb

### 4.3 – Resultados

#### 4.3.1 – Resultados obtidos a partir do questionário aplicado em propriedades fornecedoras do frigorífico em Minas Gerais

Os resultados obtidos a partir da aplicação dos questionários estão apresentados a seguir. O sistema semi-extensivo foi o único

(60/60) citado como adotado nas propriedades fornecedoras. Setenta por cento dos criadores fornecedores de ovinos citaram a prática de identificação individual do rebanho, sendo que 50% desses citaram a utilização de brincos, 23,3% de tatuagens, 12,0% de medalhas.

Tabela 3 - Distribuição das propriedades fornecedoras de ovinos para frigorífico em Minas Gerais quanto à anotação dos animais com abscessos, idade em que apresentam abscessos, sua localização e atitude do responsável em caso de recidivas, 2007

Variável	Estrato	Propriedades	
		n	%
Faz anotação dos animais com abscessos	Não	52	86,7
	Sim	8	13,3
	Total	60	100,0
Idade em que os abscessos* são visualizados	Cordeiro	34	56,7
	Borrego	45	75,0
	Adulto	60	100,0
	Total	60	100,0
Localização dos abscessos*	Debaixo do queixo	60	100,0
	Atrás de orelha	60	100,0
	Pescoço	60	100,0
	Virilha	5	8,3
	Perna traseira	1	1,7
	Abaixo do rabo	0	0,0
	Descarta	1	1,7
Atitude em casos de recidivas de abscessos	Trata	40	66,7
	Nada	19	31,7
	Total	60	100,0

\*Mais de um estrato por propriedade

Tabela 4 - Distribuição das propriedades fornecedoras de ovinos para frigorífico em Minas Gerais quanto ao manejo dos animais com abscessos, destino do material descartado, utilização de dreno no local na incisão e cauterização interna do abscesso com iodo, 2007

Variável	Estrato	Propriedades	
		n	%
Manejo dos animais com abscessos	Deixa abrir espontaneamente	19	31,7
	Abre, não desinfeta o abscesso e retorna para rebanho	34	56,7
	Abre, desinfeta o abscesso e retorna para rebanho	6	10,0
	Abre, desinfeta o abscesso e isola animal	1	1,7
	Elimina o animal do rebanho	0	0,0
	Total	60	100,0
Destino do material descartado	Enterra	6	10,0
	Queima	33	55,0
	Queima e enterra	2	3,3
	Não abre	19	31,7
	Total	60	100,0
Utilização de dreno no local da incisão e cauterização com iodo	Não	59	98,3
	Sim	1	1,7
	Total	60	100,0

Tabela 5 - Distribuição das propriedades de ovinos em Minas Gerais quanto ao conhecimento do potencial zoonótico da linfadenite caseosa, destino dos animais e informação de perdas durante o abate por linfadenite caseosa no frigorífico, 2007

Variável	Estrato	Propriedades	
		n	%
Conhecimento do potencial zoonótico	Não	54	90,0
	Sim	6	10,0
	Total	60	100,0
Destino dos animais prontos para venda*	Frigorífico	59	98,3
	Abate na fazenda	53	88,3
	Vende vivo	53	88,3
	Não	0	0,0
Informação de perdas durante o abate por LC no frigorífico	Sim	60	100,0
	Total	60	100,0

\*Mais de um estrato por propriedade

Tabela 6 - Distribuição das propriedades com ovinos em Minas Gerais quanto à presença de assistência veterinária, desinfecção de instalações e tipo de cerca utilizada, 2007

Variável	Estrato	Minas Gerais	
		n	%
Possui assistência veterinária	Não	53	88,3
	Sim	7	11,7
	Total	60	100,0
Desinfecção de instalações	Não	35	58,3
	Sim	25	41,7
	Total	60	100,0
Tipo de cerca utilizada*	Tela	7	11,7
	Arame liso	7	11,7
	Arame farpado	52	86,7

\*Mais de um estrato por propriedade

Dentre as 60 propriedades fornecedoras, em sete, a vacina contra LC para ovinos foi citada.

#### 4.3.2 – Linfadenite caseosa em soros ovinos abatidos em frigorífico de Minas Gerais

Os resultados obtidos na soropositividade animal e de rebanho estão apresentados a seguir.

Tabela 7 – Distribuição de frequência de resultados sorológicos positivos por ELISA para detecção de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* em soros de ovinos procedentes de Minas Gerais, coletados em frigorífico, Patrocínio (MG), 2007

Variável	Frequência n (positivo/total)	Frequência (%)
Animais	377/805	46,8
Propriedades	23/23	100,0

#### 4.3.3 – Ocorrência de nódulos caseosos nas carcaças de ovinos em frigorífico de Minas Gerais

Considerando ocorrência de linfadenites, dianteiras e traseiras, registradas pelos fiscais do SIF durante os seis meses de trabalho na indústria, foram encontradas 15,3% (348/2270) de carcaças com abscessos externos, 8,9% (203/2270) de órgãos com abscessos, sendo 40

abscessos com localização pulmonar e os demais distribuídos entre fígado e intestinos e 0,6% (14/2270) de carcaças condenadas provenientes de 21 propriedades de 20 municípios.

O total de nódulos encontrados, externos e internos, foi de 551, sendo 63,2% (348/551) de nódulos superficiais (externos) e 36,8% (203/551) de nódulos em órgãos (internos), desses 19,7% (40/203) eram pulmonares.

#### 4.3.4 – Isolamento e identificação por provas bioquímicas e PCR multiplex (PCRm) de material cultivado

Foram coletadas 285 amostras de material caseoso, obtendo-se 72,6% (207) isolados classificados como positivos nas provas bioquímicas e PCRm que passaram a compor uma bacterioteca para futuros estudos do *C. pseudotuberculosis*.

Foram obtidas 10,6% (22/207) de amostras reductoras de nitrato à nitrito dentre as amostras identificadas como positivas nas provas bioquímicas e PCRm, característico de biovar *Equi*, as demais foram classificadas com biovar *Ovis*.

A Figura 4 apresenta gel com perfil eletroforético de amplificação dos genes 16S rRNA, rpoB e pld em PCRm realizada a partir do DNA obtido de alguns isolados de *C. pseudotuberculosis*.

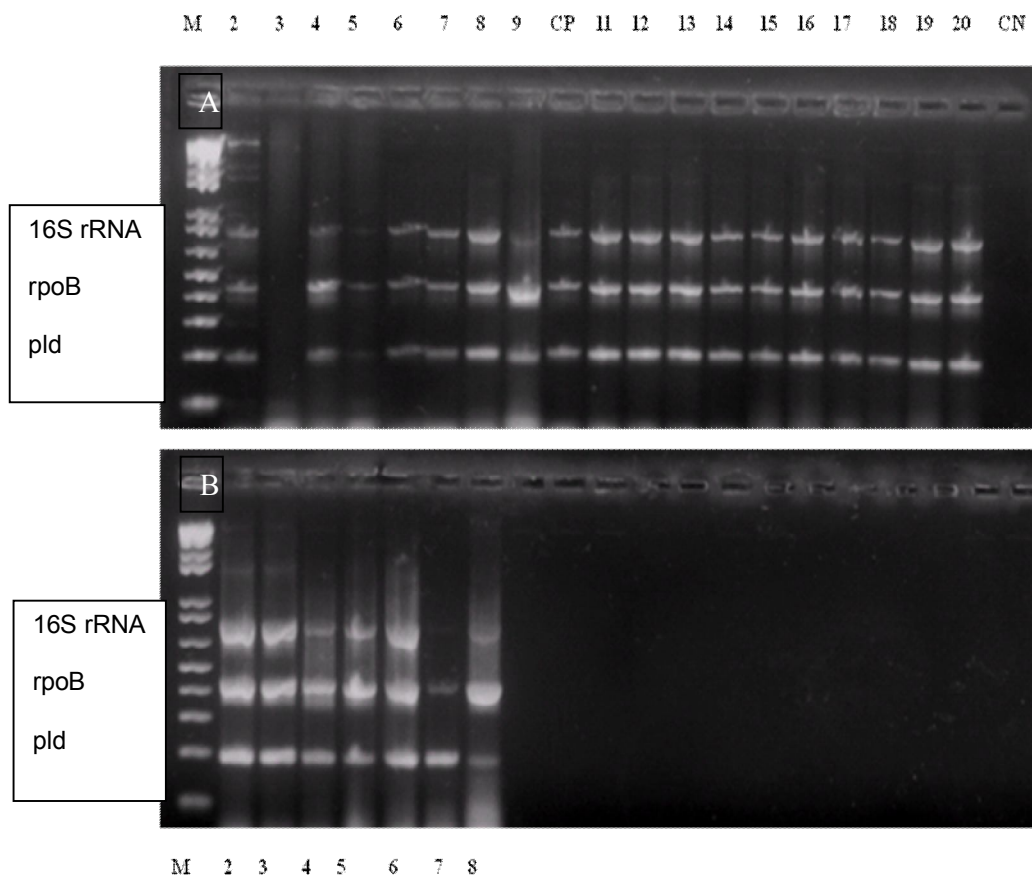


Figura 4 – Gel de agarose com PCR multiplex do DNA extraído de isolados de *C. pseudotuberculosis*. A. Canaleta 1: marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); canaleta 2: isolado positivo; canaleta 3: isolado negativo; canaletas 4-9: isolados positivos; canaleta 10: controle positivo amostra 1002; canaletas 11-20: isolados positivos; canaleta 21: controle negativo. B. Canaleta 1: marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: controle positivo amostra 1002; canaletas 3-8: isolados positivos.

#### 4.3.5 - Bacterioteca de isolados de *C. pseudotuberculosis* de Minas Gerais

Duzentos e sete isolados foram identificados como *C. pseudotuberculosis* pelas provas bioquímicas e PCRm, catalogados, acondicionados em criotubos com meio de congelamento, identificados e guardados a temperatura de -70°C para futuros trabalhos.

#### 4.4 – Discussão

##### 4.4.1 - Caracterização das propriedades fornecedoras para frigorífico em Minas Gerais

Todas as propriedades fornecedoras adotavam o sistema semi-extensivo, comum nas criações para produção de carne. Nesse sistema, os animais são criados a pasto na maior parte do ano, são pouco inspecionados (Guimarães et al., 2009a). A identificação individual, fundamental para o

controle da produção, encontrada em baixo índice de utilização em Minas Gerais em 2002 (Guimarães et al., 2009b), foi citada em 70% das propriedades fornecedoras do frigorífico, embora seja um pré-requisito exigido pela indústria, refletindo o desconhecimento de sua importância, por parte dos criadores de animais tipo corte que erroneamente presumem que a identificação individual seja menos necessária, porque os animais serão abatidos em curto espaço de tempo. O uso de brincos foi o método mais utilizado para identificação, seguido de tatuagens e medalhas. Essas últimas constituem o método mais seguro do ponto de vista sanitário, pois não abrem portas de entrada para o agente. Adicionalmente, poucos (13,3%) foram os ovinocultores que relataram anotar a ocorrência de abscessos externos nos animais e somente 1,7% descartavam ovinos com recidivas (Tabela 3), contribuindo para a manutenção do estado endêmico nos criatórios, revelado pelos resultados sorológicos dos ovinos provenientes dessas propriedades, dentre as quais todas apresentaram ovinos sororreagentes. A avaliação dos dados de propriedade, vistos em conjunto com os dados obtidos no frigorífico é preocupante; se a grande maioria dos criadores não faz anotações de animais clinicamente afetados, ainda que os animais sejam identificados individualmente, conclui-se que a identificação não está sendo utilizada para controle sanitário do rebanho.

Nesse estudo, houve tendência de maior observação de abscessos pelos criadores nos animais adultos, provavelmente em função do maior tempo de permanência desses na propriedade e, conseqüentemente, maior possibilidade de apresentar sinais clínicos da doença que possui período de incubação longo. Fica clara a necessidade de se abater animais jovens, tanto do ponto de vista econômico quanto sanitário, principalmente em relação à LC (Tabela 3).

O fato dos criadores observarem mais facilmente os abscessos localizados na região da cabeça e pescoço confirma os achados do frigorífico e dados de literatura,

de que uma das principais vias de infecção é a oral em que o agente é inicialmente drenado para linfonodos próximos a porta de entrada (Arsenault et al., 2003). A reincidência de abscessos de LC é comum e, nesses casos, os animais devem ser descartados, o que é feito por apenas 1,7%. Os demais, não fazem nada ou persistem no tratamento do abscesso, o que não deveria ocorrer (Tabela 3).

Ainda que do ponto de vista econômico, não pareça viável, do ponto de vista sanitário (e conseqüentemente econômico), o animal com sinal clínico de LC deve ser isolado e eliminado do rebanho, o que não ocorreu na amostra estudada, na qual um reduzido percentual de ovinocultores abre o abscesso, desinfeta-o e isola o animal até completa cicatrização. A maioria dos criadores deixa o abscesso abrir por si só ou o abre, mas não desinfeta e não usa dreno, e ainda retorna o animal para rebanho, o que não controla, mas acelera a disseminação do agente, pois todo o material supurado do abscesso é fonte de contaminação para instalações, cochos, baias e piquetes. Percentual semelhante de produtores tem a conduta correta quanto ao destino do material utilizado para abrir os abscessos, queimar e enterrar, visto que o tempo de viabilidade da bactéria no meio ambiente é longa (Tabela 4).

Raros foram os criadores que afirmaram saber que a LC acomete o ser humano (Tabela 5), o que indica o alto risco de exposição dos funcionários dessas propriedades ao *C. pseudotuberculosis* ao lidar com animais infectados e/ou com abscessos supurados. Também estão expostos aqueles que abatem os animais na fazenda para consumo próprio e os funcionários do frigorífico. A totalidade dos entrevistados afirmou ter informação de perdas durante o abate com a LC (Tabela 5), portanto, sabem de sua existência na propriedade, porém não a relacionavam com prejuízos no rendimento de carcaça porque o frigorífico pagava por peso vivo.

Pode se inferir que a alta soropositividade e ocorrência de abscessos encontrados nas carcaças amostradas estejam relacionadas

às falhas de manejo detectadas nas propriedades fornecedoras. O elevado percentual de criadores sem assistência veterinária talvez seja a falha mais grave (Tabela 6). O veterinário é fundamental na educação dos funcionários e na implantação e manutenção de programas de controle sanitário nas propriedades. A frequência de desinfecção de instalações foi baixa e uso de cercas com arame farpado alto; tradicional nessas propriedades, o arame farpado é inadequado para contenção de ovinos e agravante do ponto de vista de lesões de pele (Tabela 6).

#### **4.4.2- Caracterização soropidemiológica da linfadenite caseosa em ovinos**

Existem poucos trabalhos epidemiológicos sobre LC em ovinos realizados no Brasil. Tinôco (1983) encontrou, em três municípios da Bahia, 36,5% de propriedades positivas em resposta a questionário aplicado aos ovinocultores. O artigo apresentado no capítulo dois dessa tese é o primeiro levantamento soropidemiológico para LC em rebanhos ovinos em MG; já a ocorrência levantada a partir de soros ovinos de frigorífico é o primeiro trabalho de pesquisa no Brasil, com total disponibilidade de coleta de amostras de soro e adenites e das informações internas da indústria e de seus fornecedores. Os resultados obtidos tanto na sorologia realizada no Estado (Guimarães et al., 2009b) quanto nesta, realizada no frigorífico, apontam tendência de manutenção da alta frequência de soropositividade animal e de propriedades. Esses resultados demonstram o desconhecimento em relação à importância econômica da LC e da presença do agente nos rebanhos ovinos mineiros, bem como da necessidade de implantação de medidas efetivas de controle em nível de propriedade, de forma a viabilizar o fornecimento de matéria prima (cordeiros) em quantidade e qualidade requeridas pelo mercado interno e externo.

A ocorrência, no frigorífico, de carcaças com abscessos, comprova presença da LC nas propriedades de origem; somente um baixo percentual dos ovinocultores admitiu ter conhecimento de sua ocorrência no rebanho

(Guimarães et al 2009b), mas quase a totalidade dos rebanhos amostrados em MG e das propriedades fornecedoras para indústria apresentou alto índice de soropositividade e baixíssima frequência de vacinação para LC. Batey (1986a) encontrou abscessos em 41,8% de cordeiros e 53,7% de ovelhas, em frigorífico na Austrália, considerando o longo período de incubação, de até seis meses, o índice inferior encontrado no presente trabalho pode ser devido ao limite de idade para compra de animais estabelecido pelo frigorífico, entre quatro meses e 1,5 ano.

Animais com lesões, muitas vezes sem sinais clínicos, eliminam o agente durante sua vida. Foram encontrados 15,3% de nódulos caseosos em linfonodos pré-escapulares e submandibulares no abate e soropositividade de 46,8%, indicando que a grande maioria dos infectados não apresenta sinais clínicos da doença, mas dissemina o agente no rebanho. O material caseoso proveniente de abscessos, que normalmente fistulam espontaneamente nas fazendas, é a principal fonte de infecção. A bactéria já foi isolada após cinco meses em locais com descarga de conteúdo de abscessos (Nairn e Robertson, 1974) e as concentrações de microrganismos viáveis no material purulento são estimadas entre  $10^6$  a  $10^7$  bactérias por grama de pus (Brown et al., 1987), portanto, a contaminação ambiental por um abscesso rompido é muito alta, mas outras fontes também são importantes na epidemiologia da doença.

O'Reilly e colaboradores (2007) avaliaram, através de um modelo matemático, os coeficientes de transmissão por meio das vias respiratórias e do pus de abscessos drenados espontaneamente e concluíram que os abscessos pulmonares possuem menor coeficiente de transmissão, mas são importantes por manter a infecção no rebanho (fase endêmica) em concordância com Seddon (1929), citado por Arsenault e colaboradores (2003) e Robertson (1980). As conclusões basearam-se na epidemiologia da LC em rebanhos australianos, em que a prevalência aumentou rapidamente em ovinos apesar



da baixa ocorrência de lesões subcutâneas. Nesta pesquisa, o SIF registrou a presença de 40 lesões pulmonares, de acordo com o índice de isolamento obtido nesse estudo é possível que, no mínimo, 29 dessas lesões, possuíam *C. pseudotuberculosis*, clinicamente não diagnosticadas e responsáveis pela liberação das bactérias por aerossóis.

Segundo Batey (1986b), a presença de abscessos internos ou viscerais não foi associada com a redução do escore corporal e não foi encontrada relação entre LC e condenação em frigorífico por emaciação ou peso de carcaça. Outros dois estudos americanos sugerem que os abscessos internos causados por *C. pseudotuberculosis* causam a síndrome da ovelha magra, emaciação crônica de ovelhas, apesar do bom apetite e ausência de parasitismo ou de sinais clínicos específicos (Gates et al., 1977; Renshaw et al., 1979), entretanto, esses estudos carecem de grupo controle. Pode-se inferir que animais acometidos de abscessos em órgãos vitais apresentem, em maior ou menor grau, perdas na produtividade e condição corporal.

No Canadá, a legislação federal para inspeção de produtos de origem animal define que as carcaças sejam condenadas somente quando “muitos” abscessos estejam presentes ou associados com comprometimento de órgãos, caso contrário, a área afetada pode ser limpa e a carcaça aprovada, portanto, o impacto negativo da LC na condenação está associado apenas com a presença de abscessos (Arsenault et al., 2003). No Brasil, os parâmetros utilizados na inspeção das carcaças de ovinos são os estabelecidos pelo RIISPOA/MAPA para espécie bovina, ou seja, nenhuma adenite detectada em vísceras (pulmão, fígado e intestinos) é considerada para efeito de condenação de carcaças, somente aquelas detectadas em linfonodos superficiais.

Segundo Silva e colaboradores (1982) o linfonodo pré-escapular é o mais atingido, na sequência, o linfonodo pré-crural e em seguida os mediastinais. Na indústria objeto

dessa pesquisa, a condenação de carcaça ocorreu quando as adenites estavam localizadas nos linfonodos superficiais, pré-escapulares e submandibulares e, quando algum desses apresentava-se acometido, os demais (subilíaco, pré-crural, etc) também passavam por inspeção. Visto que o abate ovino inspecionado é recente em MG (2005) e a atividade está em pleno crescimento, torna-se urgente a aprovação de legislação espécie-específica, pois a alta soropositividade e ocorrência de lesões por LC obtidos nesse trabalho comprovam que os prejuízos são muito grandes, tanto para ovinocultor quanto para indústria, e carecem de trabalhos científicos para sua mensuração.

Diferenças entre as espécies ovina e caprina, quanto à localização dos abscessos, são relatadas, com a forma visceral ocorrendo predominantemente em ovinos e a superficial em caprinos (Brown e Olander, 1987). É possível que a localização desses abscessos seja influenciada pelo manejo na propriedade, por exemplo, caprinos criados confinados e alimentados em canzins, tendem a ter pequenas lesões na região da cabeça e pescoço, além do maior contato direto durante a alimentação, favorecendo a transmissão do *C. pseudotuberculosis*. O mesmo pode acontecer com ovinos criados em sistemas intensivos de produção, principalmente em confinamentos para terminação de cordeiros o que não foi encontrado nas propriedades fornecedoras de ovinos para frigorífico. Além disso, existe a influência do tipo de atividade, semi-extensiva voltada para corte, em que os responsáveis pelo manejo fazem menos inspeção periódica dos animais (Guimarães e Gouveia, 2006) e quando o rebanho é constituído por ovinos lanados, a inspeção e detecção dos abscessos são ainda mais difíceis.

Ainda com relação à comparação interespecies, Brown e Olander (1987) relatam diferenças na aparência no conteúdo dos abscessos entre ovinos e caprinos, com aparência laminar em ovinos, aspecto de cebola, causado pela formação de camadas de tecido fibroso e material

caseoso espesso e, abscessos com exsudato fino e de consistência pastosa, em caprinos. Nas amostras estudadas, a grande maioria dos abscessos tinha conteúdo pastoso. É possível que abscessos mais antigos sejam mais consistentes, com tendência à fibrose e calcificação, progredindo para aspecto de cebola, independente da espécie animal.

O SIF encontrou e registrou a inspeção 348 abscessos externos, 203 abscessos em órgãos e 14 condenações; supondo que a totalidade dessas condenações, efetuadas quando dois ou mais linfonodos superficiais eram acometidos por carcaça ( $14 \times 2 = 28$ ), pode-se inferir que aproximadamente 320 (348-28) membros anteriores (principalmente linfonodo pré-escapular) foram descartados pela presença de adenites.

De modo geral, a infecção em humanos é reconhecida como doença ocupacional (Peel et al., 1997), particularmente quando ovinos e caprinos infectados são esfolados manualmente. A forma mais comum de transmissão é através da perfuração das mãos e braços com facas contaminadas, levando ao quadro predominante de linfadenite axilar. Este mesmo quadro também é comum em açougueiros, trabalhadores de matadouros e manipuladores de tosquiadeiras, e precauções devem ser tomadas para prevenir o contato com o exsudato purulento ou com objetos contaminados (Peel et al., 1997). O grau de informalidade/clandestinidade no abate, popularmente conhecido como “frigomato”, oriunda de animais abatidos sem nenhum tipo inspeção (Costa e Medeiros, 2007) é muito alto e, como a LC é uma zoonose, a carne clandestina resultante do processamento informal coloca em risco as pessoas envolvidas no manuseio dos animais, das carcaças bem como o consumidor de produtos desses abates.

Além dos prejuízos dentro da indústria e da concorrência das carnes provenientes dos abates clandestinos, o frigorífico, que

pagava seus fornecedores em quilos de peso vivo como forma de incentivar a atividade, arcava com os prejuízos decorrentes das limpezas realizadas nas carcaças em função das linfadenites, que representaram a maioria das lesões encontradas; somente quando a carcaça era condenada na totalidade o prejuízo era também do produtor. Assim, os custos de produção do quilo de carne ovina para o frigorífico eram muito altos por causa dessas lesões, em função da menor velocidade na linha de abate para fiscalização e limpeza (maior custo hora/homem), do significativo aumento no consumo de energia, da redução de produtos ofertados e de menor qualidade.

Ainda considerando o impacto das perdas indiretas decorrentes da LC, o custo por quilômetro rodado de transporte dos cordeiros terminados, da propriedade rural até a indústria, é outro componente importante na composição do preço dos ovinos a ser pago ao criador. O animal condenado ocupou espaço no caminhão e, conseqüentemente, no frete, sem gerar receita, ocasionando diminuição no estoque esperado para o abate e de mercadoria muitas vezes já vendida, em função da grande demanda por certos cortes. Gouveia e Carvalho Jr. (2009) relatam custo médio de R\$ 1,40 por Km rodado e frete econômico de 200 Km, já calculado e incorporado no custo do produto final para venda. Nesse estudo, 74,2% das propriedades estavam localizadas num raio acima de 200 Km (Tabela 8). O frigorífico pagava todo o frete, independente da distância da propriedade, que teve média entre a indústria e os municípios das propriedades fornecedoras de 336,8 Km, portanto o custo médio total por viagem, 673,6 Km de ida e volta, foi de R\$ 943,00, pagos por lotes que apresentaram 15,3% de nódulos caseosos e 14 condenações, em 2270 animais amostrados. Em função disso, a indústria enfrenta dificuldades na aquisição de animais dentro dos padrões para abate e algumas vezes têm que recorrer às carnes importadas, principalmente do Uruguai para suprir os seus clientes.

Tabela 8 – Distância, em quilômetros, entre Patrocínio (MG), município sede da indústria frigorífica, e os municípios de Minas Gerais com propriedades que forneceram ovinos para abate no período de julho a dezembro, 2007

Município	Fornecimento*	Km	Município	Fornecimento	Km
Araguari	+	146	Pará de Minas	-	238
Araxá	+	116	Paraopeba	-	329
Bonfinópolis	+	325	Patrocínio	+	0
Campina Verde	+	323	Perdizes	+	67
Campos Altos	+	134	Pimenta	-	245
Carneirinho	+	462	Porteirinha	+	691
Curvelo	-	376	Prata	+	248
Esmeraldas	-	353	Rio Pomba	+	549
Francisco Sá	+	526	Santana do Garambéu	+	480
Frutal	+	318	Sete Lagoas	-	420
Itamonte	+	484	Teófilo Otoni	-	759
Itaúna	-	336	Uberaba	+	173
João Pinheiro	+	175	Uberlândia	+	148
Lavras	-	397	Unaí	-	349
Montes Claros	+	474	Várzea da Palma	+	332
Oliveira	+	351			

\* + Municípios com propriedades que forneceram animais durante período de coleta

Animais oriundos de rebanhos com diferentes manejos e de diferentes regiões são abatidos nos frigoríficos, o que os torna importantes geradores de informações relacionadas à ocorrência de doenças nos rebanhos nacionais, assim, o registro e transmissão de dados realizados por técnicos do SIF, precisam ser os mais fidedignos possíveis para embasarem decisões em nível de propriedade, de indústria e governamental.

O isolamento do *C. pseudotuberculosis* pode ter sido subestimado em função da possibilidade de alguns abscessos não abrigarem mais o agente ou pela presença de outras bactérias que podem interferir na obtenção de sua cultura pura. Os 10,6% de isolados que reduziram o nitrato, podem ser biovar *Equi*, pois a literatura cita que entre 90 e 100% de isolados ovinos podem ser redutores de nitrato a nitrito (Bergey's Manual, 1994).

As provas bioquímicas, padrão ouro para identificação de *C. pseudotuberculosis*, são de fácil execução, quando protocolos

validados são rigorosamente seguidos. Porém, surgiram algumas particularidades durante sua execução, nem sempre relatadas em livros ou manuais de microbiologia, Diante disso, as impressões pessoais e sugestões, importantes para outros pesquisadores, estão relatadas a seguir:

1. *C. pseudotuberculosis* cresce em intervalo que varia de 24 a 72 h. A realização de provas bioquímicas deve ser feita a partir de culturas com 48 h, caso contrário, os resultados podem não ser confiáveis, por concentração bacteriana baixa (24h) ou por culturas velhas (72 h);

2. A ribose é muito instável e com a autoclavação, o pH se torna ácido, porém alguns lotes não retornam ao pH normal devendo ser aferidos e rigorosamente corrigidos;

3. Alguns carboidratos, como manose e maltose, positivos em boa parte dos isolados, tendem a reagir com intensidade mediana, coloração intermediária entre resultado negativo e positivo, proporcional à quantidade de bactéria inoculada e a

padronização dos critérios de manipulação é muito importante, por exemplo, substituição da agulha por alça, principalmente quando dois ou mais técnicos estão trabalhando simultaneamente;

4. *C. pseudotuberculosis* não se desenvolve bem em meios alcalinos, portanto, no teste da produção da urease, normalmente ocorrem reações fracamente positivas, iniciando no fundo dos tubos em 48 h. Quando esses tubos são deixados a 37°C por até 72 h observa-se mudança completa de cor, característica das reações positivas;

5. Os testes bioquímicos podem ser realizados e padronizados em laboratório, desde que metodologias cientificamente validadas sejam seguidas, nesse trabalho, os protocolos foram obtidos segundo MacFaddin (1980) e os resultados analisados através de tabela do Bergey's Manual (1994).

Songer et al. (1988) esclarecem que diferenças entre os resultados de algumas provas bioquímicas, principalmente de fermentação de carboidratos, podem ocorrer, em virtude dos diferentes métodos usados por diversos autores; sugerem ainda que estas diferenças podem ser atribuídas à existência de variedades entre as linhagens estudadas. Embora o isolamento e a identificação de *C. pseudotuberculosis* continuem sendo "padrão-ouro" para o diagnóstico da LC, esses métodos possuem limitações devido a extensiva variabilidade nas características bioquímicas de diferentes isolados (Songer et al., 1988).

A PCRm, devidamente padronizada, requer laboratório e material adequados e mão de obra capacitada, por ser técnica laboriosa e precedida de extração de DNA total. Porém os resultados são dicotômicos, as bandas amplificadas são facilmente identificadas, pode ser utilizada em material purulento proveniente de casos clínicos sem necessidade de cultura prévia (Pacheco et al, 2007) e para diagnóstico diferencial de outras bactérias presentes em abscessos de ovinos e para pesquisa na diferenciação do *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*.

Os 207 isolados e respectivos DNAs extraídos estão armazenados no LASOC e no LGCM em temperatura de -70°C, devidamente catalogados, para formação da bacterioteca de isolados de *C. pseudotuberculosis* e respectivos DNAs, para futura caracterização molecular dos isolados.

#### **4.4.3 - Bacterioteca de isolados de *C. pseudotuberculosis* de Minas Gerais**

A construção da bacterioteca foi possível por ser o frigorífico parte final da cadeia de produção de ovinos; a coleta de amostras na linha de abate otimizou a abrangência das origens das amostras, o que possibilitou obter isolados de ovinos procedentes de propriedades de diversas regiões do Estado, além da grande quantidade de isolados com diversidade de propriedades, municípios e mesorregiões de MG.

## **5 - CAPÍTULO 4**

### **CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS**

## 5.1 - CONCLUSÕES

A LC ovina esta amplamente disseminada em MG, com tendência de manutenção da alta frequência de soropositividade animal e de rebanhos.

As propriedades fornecedoras de ovinos para frigorífico possuem manejo sanitário inadequado ao controle de LC e os ovinocultores desconhecem sua real importância, o que pode agravar o quadro de entrave ao desenvolvimento da cadeia produtiva de carne ovina.

Muitos animais clinicamente sadios apresentam lesões características da doença ao abate, o que pode ser importante obstáculo ao desenvolvimento da cadeia produtiva de carne ovina.

O *C. pseudotuberculosis* está presente na maioria das lesões caseosas encontradas em carcaças de ovinos abatidos em frigorífico e pode constituir fonte de contaminação durante sua manipulação na indústria.

O distanciamento tecnológico observado entre a maioria das propriedades fornecedoras de ovinos e a indústria deve ser minimizado por meio de educação sanitária e gestão do negócio carne ovina.

## 5.2 - PERSPECTIVAS

O desconhecimento das perdas econômicas decorrentes da LC aponta a necessidade de estudo de avaliação das perdas na indústria e nas propriedades com ovinos de tipo corte;

A ausência de legislação específica para abate de ovinos é fator limitante na fiscalização em frigorífico e torna-se urgente sua proposição, considerando os resultados obtidos nessa pesquisa e o crescimento da ovinocultura em MG e no Brasil;

Atividades de extensão rural são necessárias para divulgação da real situação da LC em MG aqui detectadas e da necessidade de implantação de medidas

eficazes de controle da doença nos rebanhos do Estado;

Futuros trabalhos serão desenvolvidos com os isolados que constituem a bacterioteca, em continuidade a nossa linha de pesquisa, para caracterizar molecularmente o *C. pseudotuberculosis* e conhecer as potenciais diferenças entre isolados de distintas regiões, podendo, dentre outros, orientar a produção de vacinas mais eficazes.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARQUIVO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE OVINOS (ARCO), 2008. Available from the site [www.arcoovinos.com.br](http://www.arcoovinos.com.br). Accessed: 10.3.2009.

ARSENAULT, J.O.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D. O.; GALARNEAU, J.-R.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from Maedi-Visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.*, v. 59, p. 67–81, 2003.

BAIRD, G.J. & FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J. Comp. Pathol.* v. 137, p. 179-210, 2007.

BAKER, G.; SOUZA NETO, J. Características gerais da caprinocultura leiteira no estado do Rio Grande do Norte. Sobral: EMBRAPA - CNPC, 1987, 30p. (Boletim de Pesquisa, 9).

BATEY, R.G. Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at a Western Australian abattoir. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 482–485, 1986a.

BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust. Vet. J.*, n. 63, p. 269-272, 1986b.

- BENNETT, S.; WOODS, T.; LIYANAGE, W.M.; SMITH, D.L. A simplified general method for cluster-sample surveys of health in developing countries. *Rapp. Trimest. Sanit. Mond.* v. 44, p. 97-106, 1991.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.* 9.ed. Philadelphia: Editado por John G. Holt et al., 1994, 540p.
- BIBERSTEIN, E.L.; KNIGHT, H.D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Vet. Rec.* v. 89, p. 691-692, 1971.
- BINNS, S.H.; BAIRLEY, M.; GREEN, L.E. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Vet. Rec.* v. 150, p. 263-268, 2002.
- BINNS, S.H.; GREEN, L. EBAILEY, M., Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol.*, v. 20, p. 169-179, 2007.
- BRAVERMAN, Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. *Rev. Sci. Tech. O I E (OFF INT EPIZOOT)*, v. 18, p. 681-690, 1999.
- BROWN, C.C.; OLANDER H.J.; ALVES S.F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. *Can. J. Vet. Res.*, v. 51, p. 46-49, 1987.
- BROWN, C.C.; OLANDER, H.J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. *Vet. Bull.* V. 57, p. 1-11, 1987.
- CAMPBELL, S.G.; ASHFAQ, M.K.; TASHJIAN, J.J. Caseous lymphadenitis in goats in the USA. In: PROCEEDINGS 3RD INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE. Tucson, Arizona: 1982. p. 449-454,
- CARDOSO, M.R.I. & SCHIMIDT, V. Primeiro isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos no Rio Grande do Sul. *Arq. Fac.Vet.UFRGS*, v. 16, p.11- 13, 1988.
- CARMINATI, R.; BAHIA, R.; COSTA, L.F.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; *Rev. Cienc. Méd. Biol.*, Salvador, v.2, n.1, p.88-93, 2003.
- CARMO, F.B.; GOUVEIA, A.M.G.; GUIMARÃES, A.S.; PAULETTI, R.B.; LAGE, A.P.; RAGOZO, A.M.A.; PORTELA, R.W.D.; GONÇALVES, V.S.P.; AZEVEDO, V.A.C.; HEINEMANN, M.B. Soroprevalência da linfadenite caseosa em criações comerciais de ovinos no Distrito Federal e no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25, 2009, Porto de Galinhas. *Anais...Sao Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia*, 2009. 30p.
- CARNE, H.R. & ONON, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on the endothelial cells of blood vessels. *Nature.* v. 271, p. 246-248, 1978.
- CENSO AGROPECUÁRIO 2007. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acessado: 10.07.2009
- CENSO AGROPECUÁRIO 2008. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acessado: 03.12.2009.
- ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE, T.; VENECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet. Microbiol.* v. 88, p.75-83, 2002.
- CHAPLIN, P.J.; DE ROSE, R.; BOYLE, J.S.; MCWATERS, P.; KELLY, J.; TENNENT, J.M.; LEW, A.M.; SCHERLINCK, J.P.Y. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium*

- pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.*, v.67, p.6434–6438, 1999.
- COLLETT, M.G.; BATH, G. F.; CAMERON, C.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: Coetzer, J.; Thomson, G.R. *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*, Capetown: Oxford University Press, 1994, p 1387-1395.
- CONNOR, K.M. ; QUIRE, M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* v. 38, p. 2633-2637, 2000.
- CONNOR, K.M.; FONTAINE, M.C.; RUDGE, K.; BAIRD, G.J.; DONACHIE, W. Molecular genotyping of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Res.* v. 38, p.613-623, 2007.
- COSTA, L.R.R.; SPIER, S.J.; HIRSH, D.C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. *Vet. Microbiol.* v. 62, p. 135-143, 1998.
- COSTA, N.G.; MEDEIROS, J.X. *A cadeia produtiva de carne ovina no Brasil rumo às novas formas de organização da produção*. 2007, 195f. Dissertação (Mestrado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Universidade de Brasília e Universidade Federal de Goiás, Brasília.
- DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; BURTON, A.H.; DICKER, R.C. *Epi-info, version 6: A word processing, database and statistic program for epidemiology on micro-computers*. Atlanta: Center for Disease Control, 1995.
- DERCKSEN, D.P.; BRINKHOF, J.M.A.; DEKKER-NOOREN, T.; VAN 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. *Vet. Microbiol.*, v. 75, p. 167-175, 2000.
- DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown: AVC, 2003. 706 p.
- DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C., MIYOSHI, A. AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.*, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.
- DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R.W.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigenes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*. v. 8, p. 205–213, 2009.
- DUPORT, O. Bacilo de Preisz-Nocard. *Ver. Vet. Zootec.*, Rio de Janeiro, v.9, n. 1, p. 29-32, 1918.
- EGGLETON, D.G.; MIDDLETON, H.D.; DOIDGE, C.V.; MINTY, D.W. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust. Vet. J.* v. 68, p. 317-319, 1991.
- EL-ENBAAWY, M.I.; SAAD, M.M.; SELIM, S.A. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Egyptian J. Immunol.* v. 12, p. 13–20, 2005.
- 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. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 196, p. 1609-1613, 1990.
- FOLEY, J.E.; SPIER, S.J.; MIHALYI, J.; DRAZENOVICH, N.; LEUTENEGGER, C.M. Molecular epidemiologic features of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from horses. *Am. J. Vet. Res.* V. 65, p. 1734 – 1737, 2004.



- FONTAINE, M.C.; BAIRD, G.; CONNOR, K.M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*. v. 24, p. 5986-5996, 2006.
- GARCIA, M.; ARAÚJO, W.P.; CARVALHO, V.M.; COSTA, E.O. Isolamento e identificação do *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ver. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo*. v. 24, p. 23-25, 1987.
- GATES, N.L.; EVERSON, D.O.; HULET, C.V. Effects of thin ewe syndrome on reproductive efficiency. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 171, p. 1266-1267, 1977.
- GOUVEIA, A.M.G. & CARVALHO Jr., C.A. Inserção do produtor na cadeia produtiva de ovinos na perspectiva de sustentabilidade. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE OVINO CULTURA – SUSTENTABILIDADE E PERSPECTIVAS V, 2009, Lavras. *Anais...Belo Horizonte: Conselho Regional de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2009. 280p.*
- GUILLOTEAU, L.; PEPIN, M.; PARDON, P.; PAPE, A L. Recruitment of <sup>99m</sup>technetium- or <sup>111</sup>indium-labelled polymorphonuclear leucocytes in experimentally induced pyogranulomas in lambs. *J. Leukocyte Biol.*, v. 48, p. 343-352, 1990.
- GUIMARÃES, A.S., GOUVEIA. A.M.G. *Caracterização da caprinovinocultura em Minas Gerais*. 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte).
- GUIMARÃES, A.S.; GOUVEIA, A.M.G.; ABREU, A.B; HADDAD, J.P.A.; LEITE, R.C.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; CRUZ, J.C.M.; CARMO, F.B. Características zoossanitárias das caprinoculturas de leite e corte em Minas Gerais. *Rev. Vet. e Zootec. em Minas*, v. 101, p. 23-29, 2009a.
- 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 Rum. Res.* v. 87, p. 86-91, 2009b.
- HAGE, J.A. Vacina da EBDA é novidade mundial. Sobral; EMBRAPA, 2000, p. 9 (*Pesquisa Estadual em Foco*. 05/08).
- HARD, G.C. Electron microscopic study of the differentiation of mouse peritoneal macrophages stimulated by *Corynebacterium ovis* infection. *Lab. Invest.*, v. 21, p. 309-315, 1969.
- HARD, G.C. Comparative toxic effect on the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* v. 12, p. 4139-1449, 1975.
- HODGSON, A.L.M.; TACHEDJIAN, M.; CORNER, L.A.; RADFORD, A.J. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* v. 62, p. 5275-5280, 1994.
- IBGE. Censo agropecuário 2007; Minas Gerais. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acessado: 10 de Março de 2009.
- ISMAIL, A.A. & HAMID, Y.M.A. Studies on the effect of some chemical disinfectants used in veterinary practice in *Corynebacterium ovis*. *J. Egyptian Vet. Med. Assoc.*, v. 32, p. 195-202, 1972.
- JISKOOT, W.; KERSTEN, G.F.A.; BEUVERY, E.C. Vaccine. In: Crommelin, D.J.A.; Sindelar, R.D. *Pharmaceutical Biotechnology – An introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists*. 2ed. London: Taylor and Francis Group. 12., p. 259-282, 2002.
- JOIN-LAMBERT, O.F.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J.L.; BLANCHE, S.;

- BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 25, p. 9, 2006.
- JONES, D. & COLLINS, M.D. Irregular, nonsporulating Gram-positive rods. In: Sneath, P.H.A. et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p. 1261–1282.
- JORDAN, D. Aggregate testing for the evaluation of Johne's disease herd status. *Aust. Vet. J.* v. 73, p. 16–19, 1996.
- LAN, D.T.B.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; YAMADA, M.; NAKANE, A. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\gamma$  interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* v. 61, p. 1203–1208, 1999.
- LANGENEGGER, H. & LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 11, n.1/2, p. 1-7, 1991.
- MAGALHÃES, H.H.; GOUVEIA, A.M.G.; CAPISTRANO, C.M.B. Diagnóstico da situação da caprinocultura em algumas microrregiões dos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. *Cabras e Bodes*, v.1, p.5-7, 1985.
- MCDERMOTT, J.J. & SCHUKKEN, Y.H. A review of methods used to adjust for cluster effects in explanatory epidemiological studies of animal populations. *Prev. Vet. Med.*, v. 18, p. 155–173, 1994.
- MACFADDIN, J.F. *Pruebas bioquímicas para La identificación de bacterias de importancia clínica*. Panamericana, Buenos Aires. 1980, 301 pp.
- MARTIN, S.W.; SHOUKRI, M.; THORBURN, M.A. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. *Prev. Vet. Med.*, v. 14, p. 33–43, 1992.
- MEDEIROS, J.X.; SANTO, E.E.; COSTA, N.G.; RIBEIRO, J.B.L. O Agronegócio da Ovinocultura no Brasil, In: SIMPÓSIO PARANAENSE DE OVINOCULTURA, 12, 2005, Maringá-PR, *Anais...Curitiba: Conselho Regional de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2005, p.1-15.
- MEDRONHO, R.A.; CARVALHO, D.M.; BLOCH, K.V.; LUIZ, R.R.; WERNECK, G.L. *Epidemiologia*. São Paulo: Atheneu, 2006. 493p.
- MIDDLETON, M.J., EPSTEIN, V.M., GREGORY, G.G. Caseous lymphadenitis on Flanders Island: prevalence and management surveys. *Aust. Vet. J.* v. 68, p. 311-312, 1991.
- NAIRN, M.E. & ROBERTSON, J.P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. *Aust. Vet. J.*, v.50, p.537-542, 1974.
- NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOFD, C.M.; GRAAF, E.A.M. *Application of quantitative methods in veterinary epidemiology*. Wageningen: Wageningen Pers, 1997, 445 p.
- NOZAKI, C.N.; FARIA, M.A.R.; MACHADO, T.M.M. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. *Arq. Inst. Biol.*, v. 67, p. 187-189, 2000.
- WORLD ANIMAL HEALTH SITUATION (OIE), 2009. Disponível em: [http://www.oie.int/hs2/sit\\_mald\\_cont.asp?c\\_mald=156&c\\_cont=6&annee=2004](http://www.oie.int/hs2/sit_mald_cont.asp?c_mald=156&c_cont=6&annee=2004). Acesso em: 26 set 2009.
- OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W.; BURET, A.G.; READ, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* v. 66, p. 86–92, 2002.
- O'REILLY, K.M.; GREEN, L.E.; MALONE, F.E.; MEDLEY, G.F. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

- transmission in sheep. *Prev. Vet. Med.*, v, 83, p. 242–259, 2008.
- OTTE, M.J. e GUMM, I.D. Intracluster correlation coefficient of 20 infections calculated from the results of cluster-sample surveys. *Prev. Vet. Med.*, v. 31, p. 147–150, 1997.
- PACHECO, L.G.G.; 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, S.F.S.; MIYOSHI, S.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *J. Med. Microbiol.*, v. 56, p. 1-7, 2007.
- PATON, M.W.; ROSE, I.R.; HART, R.A.; SUTHERLAND, S.S.; MERCY, A.R.; ELLIS, T.M.; DHALIWAL, J.A. Newinfection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust. Vet. J.*, v. 71, p. 47–49, 1994.
- PATON, M. The epidemiology of caseous lymphadenitis in Australia and observations on other production systems. In: PROCEEDING OF THE 101ST MEETING OF US ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, Louisville, KY, p. 18-24, 1997.
- 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. *Aust. Vet. J.*, v. 81, 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- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v. 96, p. 129–139, 2003.
- PEEL, M.M.; PALMER, G.G.; STACPOOLE, A.M.; KERR, T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* v. 24, p. 185–191, 1997.
- PEKELDER, J.J. Caseous lymphadenitis. In: Martin, W.B.; Aitken, I.D. *Diseases of Sheep*. 3.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2000. p. 270-274.
- PEPIN, M.; PARDON, P.; MARLY, J.; LANTIER, F. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in the external ear. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p. 459–463, 1988.
- PEPIN, M.; SEOW, H.F.; CORNER, L.; ROTHÉL, J.S.; HODGSON, A.L.; WOOD, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.* 28, 149–163, 1997.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000.
- PIONTKOWSKI, M.D. & SHIVERS, D.W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 212, p. 1765–1768, 1998.
- 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. *Vet. Microbiol.*, v. 88, p. 287–297, 2002.
- PUGH, D.G. *Clínica de ovinos e caprinos*. 1.ed. São Paulo: Roca, 2004. 528p.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças*

- Infeciosas*. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos*. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.
- REGULAMENTO INTERNO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL DO MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (RIISPOA/MAPA), 2008. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acessado: 04.12.09
- 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. *Am. J. Vet. Res.*, v. 40, p. 1110-1114, 1979.
- RIBEIRO, M.G.; DIAS JUNIOR, J.G.; PAES, A.C.; BARBOSA, P.G.; NARDI JUNIOR, G.; LISTONI, F.J.P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*. v. 68, p. 23-28, 2001.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. *Doenças de ruminantes e eqüinos*. 1ed. São Paulo: Varela, 2001. 425p.
- RIZVI, S.; GREEN, L.E.; GLOVER, M.J. Caseous lymphadenitis: An increasing cause for concern. *Vet. Rec.* v. 140, p. 586-587, 1997.
- ROBERTSON, J.P. *Studies on the diagnosis, epidemiology and immunity of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep*. MPhil Thesis. Murdoch University, Western Australia., 1980.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ed. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 1989. 545p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. ed. 2. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- SAUNDERS, V.F.; REDACLIFF, L.A.; BERG, T.; HORNITZKY, M. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Aust. Vet. J.*, v. 85, p. 72 – 77, 2007.
- SEDDON, H.R. A Discussion of the Method of Infection by *Bacillus of Preisz-Nocard*. *Aust. Vet. J.*, v. 5, p. 49-54, 1929.
- 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. *Res. Vet. Sc.* v. 88, p. 50-55. 2010.
- SILVA, S.F., SANTOS, A.F., LAUZER J.J., COSTA, D.F. Linfadenite caseosa em ovinos abatidos na região de Campanha do Rio Grande do Sul. *Rev. Cent. Cienc. Rur.* v. 12, p. 149-154, 1982.
- SIMMONS C.P.; DUNSTAN S.J.; TACHEDJIAN M.; KRYWULT J.; HODGSON A.L.; STRUGNELL R.A. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 474-479, 1998.
- SMIBERT, R.M. e KRIEG, N. R. *Phenotypic Characterization* In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (ed.) *Methods for general and molecular bacteriology*, 1ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1994. 607-654p.
- SMITH, M.C. & SHERMAN, D. *Caseous lymphadenitis. Goat Medicine*. 1.ed. Iowa: Lea & Febier, 1994, p.47-61.

- SONGER J.G.; BECKENBACH K.; MARSHALL M.M.; OLSON G.B.; KELLEY L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* v. 49, p.223–226, 1988.
- SILVA, S.F.; SANTOS, A.F.; LAUZER, J.J.; COSTA, D.F. Linfadenite caseosa em ovinos abatidos na região de Campanha do Rio Grande do Sul. *Rev. Cent. Ci. Rur.* v.12, p.149–154, 1982.
- SOUZA NETO, J. & GUTIERREZ, N. *Características gerais da caprinocultura leiteira no Estado da Paraíba*. Sobral: Embrapa Caprinos, 1987. (Boletim de Pesquisa).
- SPIER, S. J.; LEUTENEGGER, C. M.; CARROLL, S. P.; LOYE, J. E.; PUSTERLA, J. B.; CARPENTER, T. E.; MIHALYI, J. E.; MADIGAN, J. E. Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 65, p. 829-834, 2004.
- STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 47, p. 479 – 491, 1997.
- STANFORD, K.; BROGDEN, K.A.; MCCLELLAND, L.A.; KOZUB, G.C.; AUDIBERT, F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. Vet. Res.*, v. 62, p. 38-43, 1997.
- STEFAŃSKA, I.; RZEWUSKA, M.; BINEK, M. Evaluation of three methods for DNA fingerprinting of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from goats in Poland. *Polish J. Microbiol.*, v. 57, p. 105-112, 2008.
- STOOPS, S.G.; RENSHAW, H.W.; THILSTED, J.P. Ovine caseous lymphadenitis: disease prevalence, lesion distribution, and thoracic manifestations in a population of mature culled sheep from western United States. *Am. J. Vet. Res.*, v. 45, p. 557-561, 1984.
- 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. *Vet. Microbiol.*, v. 30, p. 288-297, 2008.
- SUTHERLAND, S.S.; HART, R.A.; BULLER, N. B. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. *Vet. Microbiol.*, v. 49, p. 1-9, 1996.
- TASHJIAN, J.J. & CAMPBELL, S.G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, p. 690–693, 1983.
- 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. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, p. 1125-1132, 1992.
- THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I.; NOORDHUIZEN, J.P.; FRANKENA, K. Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.*, v. 148, p. 567–572, 2001.
- TINÔCO, A.L.A. Diagnóstico de situação da ovino/caprinocultura em três municípios do sertão baiano – Euclides da Cunha, Quijingue, Monte Santo – Bahia, 1981/1982. 1983, 13f. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. (Seminário)
- UNANIAN, M.M.; FELICIANO SILVA, A.E.D.; PANT, K.P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. *Trop. An. Health Prod.*, v. 17, p. 57-62, 1985.

VALLI, V.E.O. e GENTRY, P. *Hematopoietic system*. In: Grant, M., Jubb, Kennedy and Palmer's. *Pathology of Domestic Animals.*, Maxie: Saunders Ltda., 2007. vol. 3, ed. 5, p. 107–324,

WALKER, B. *Cheesy gland caseous lymphadenitis in sheep*. 2. ed., New South Wales Department of Agriculture, 1996. p. 1-4,

WEST, D.M.; BRUERE, A. N.; RIDLER, A. L. Caseous lymphadenitis. In: *The Sheep: Health, Disease and Production, Foundation for Veterinary Continuing Education*. New Zealand: Massey University, 2002. P. 274-279.

WILLIAMSON, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am.*, v. 17, p. 359–371, 2001.

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N.Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. *Vet. Q.* v. 18, p. 87–89, 1996.

YERUHAM, D.; ELAD, S.; FRIEDMAN e S. PERL. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli dairy cattle. *Epidemiol. Infect.*, v. 131, p. 947-955, 2003.

## 7. ANEXOS

### 7.1 – Anexos 1

#### 7.1.1 - Artigos publicados e resumos apresentados em congressos durante o doutorado

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 Rum. Res.* v. 87, p. 86–91, 2009.

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*, 88, p. 50 – 55.

Carneiro A.C.A.V., Carneiro, M., Gouveia, A.M.G., Guimarães, A.S., Marques, A.P.R., Vilas-Boas, L.S., Vitor, R.W.A. Seroprevalence and risk factors of caprine toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v 160, p. 225 – 229, 2009.

Guimarães, A.S.; Seyffert, N., Gouveia, A.M.G., Lage, A.P., Portela, R.W.D., Meyer, R. Azevedo, V.A.C., Carmo, F.B., Cruz, J.C.M., Heinemann, M.B. Linfadenite caseosa em rebanhos ovinos no estado de Minas Gerais, Brasil:prevalência e informações de manejo. 8.º Congresso Brasileiro de Buiatria - Outubro de 2009 – Belo Horizonte - MG

Carmo, F.B., Gouveia, A.M.G., Guimarães, A.S., Pauletti, R.B., Lage, A.P., Ferreira, F., Portela, R.W.D., Pinheiro, R.R., Azevedo, V.A.C., Heinemann, M.B. Soroprevalência da linfadenite caseosa em caprinos em propriedades do Estado do Ceará. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia - Novembro de 2009 – Porto de Galinhas - PE

Carmo, F.B., Gouveia, A.M.G., Guimarães, A.S., Pauletti, R.B., Lage, A.P., Ragozo, A.M.A., Portela, R.W.D., Gonçalves, V.S.P., Azevedo, V.A.C., Heinemann, M.B. Soroprevalência da linfadenite caseosa em criações comerciais de ovinos no Distrito Federal e no Estado de São Paulo. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia - Novembro de 2009 – Porto de Galinhas – PE

Alessandro de Sá Guimarães, Aurora Maria Guimarães Gouveia, Cristina Pena Abreu, João Paulo Amaral Haddad, Juliano César Minardi Cruz, Filipe Borges do Carmo, Rômulo Cerqueira Leite. Características zoossanitárias das caprinoculturas de leite e corte em Minas Gerais Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária. Nº 101, 23 – 29, Abr\Mai\Jun 2009

Alessandro de Sá Guimarães, Aurora Maria Guimarães Gouveia, Cristina Pena Abreu, João Paulo Amaral Haddad, Juliano César Minardi Cruz, Filipe Borges do Carmo, Rômulo Cerqueira Leite. Características zoossanitárias da ovinocultura em Minas Gerais Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária. Nº 102, p. 34 – 40, Jul\Ago\Set 2009

Gouveia, A. M. G., Guimarães, A.S. Haddad, J.P.A., Abreu, C.P., Cruz, J.C.M., Carmo, F.B. Características zoossanitárias da caprinocultura leiteira em Minas Gerais, Brasil. Artigo publicado em [www.accomig.com.br](http://www.accomig.com.br). 07/05/2009.

Gouveia, A. M. G., Guimarães, A.S. Haddad, J.P.A., Abreu, C.P., Cruz, J.C.M., Carmo, F.B. Características zoossanitárias da caprinocultura de corte em Minas Gerais, Brasil. Artigo publicado em [www.accomig.com.br](http://www.accomig.com.br). 07/05/2009

Gouveia, A. M. G., Guimarães, A.S. Haddad, J.P.A., Abreu, C.P., Cruz, J.C.M., Carmo, F.B. Características zoossanitárias da ovinocultura em Minas Gerais, Brasil. Artigo publicado em [www.accomig.com.br](http://www.accomig.com.br). 19/05/09

**7.1.2 - Artigos submetidos em periódicos (no prelo)**

Guimarães et al artigo Revisão LC - Preventive Veterinary Medicine – submetido em 09/12/09

Guimarães et al artigo verminose em caprinos - Veterinary Parasitology - submetido em 09/12/09



## 7.2 – Anexos 2

### 7.2.1 - Soluções para extração de DNA bacteriano

Solução I - Tris-EDTA-RNase (Extração de DNA genômico): Misturar: 1 mL de Tris-HCl (1M; pH 7,0); 2 mL de EDTA (0,5M; pH 8,0); 6 mL de NaCl (5M); e RNase A; completar com água destilada para 100 mL. [Concentrações finais: Tris-HCl (10mM); EDTA (10mM); NaCl (300mM); RNase A (50 µg/mL)].

Solução II – Tris-EDTA-lisozima (Extração de DNA genômico): Misturar: 1 mL de Tris-HCl (1M; pH 7,0); 2 mL de EDTA (0,5M; pH 8,0); 6 mL de NaCl (5M); e 1 g de lysozima; completar com água destilada para 100 mL. [Concentrações finais: Tris-HCl (10mM); EDTA (10mM); NaCl (300mM); lisozima (10 mg/mL)].

Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico: Misturar em um recipiente de vidro escuro: 25 mL de solução saturada de fenol; 24 mL de clorofórmio; e 1 mL de álcool isoamílico.

### 7.3 – Anexos 3

#### 7.3.1 - Questionário aplicado aos fornecedores de ovinos para frigorífico

##### QUESTIONÁRIO DE PROPRIEDADE

###### 1. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTOR

Nome: \_\_\_\_\_  
Endereço completo do proprietário (para correspondência):  
Rua \_\_\_\_\_  
Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_  
CEP: \_\_\_\_\_ DDD/Tel.: \_\_\_\_\_  
Endereço eletrônico (e-mail): \_\_\_\_\_  
Profissão: \_\_\_\_\_  
Quem gerencia o Criatório? ( ) Proprietário ( ) Gerente Técnico

###### 2. PROPRIEDADE

Município da propriedade: \_\_\_\_\_  
Nome da propriedade: \_\_\_\_\_  
Áreatotal (ha): Quantos ovinos e caprinos possui: Ovinos: \_\_\_\_ Caprinos: \_\_\_\_  
Identificação individual dos animais: ( ) Não faz ( ) Brinco ( ) Tatuagem  
( ) Medalha ( ) Outro: \_\_\_\_\_  
Tipo e forma de exploração: ( ) Carne ( ) Leite ( ) Pele ( ) Mista (carne e leite)  
( ) Intensiva ( ) Semi-intensiva ( ) Extensiva  
Quais dessas espécies são criadas e já apresentaram caroços?  
( ) Caprinos ( ) Ovinos ( ) Bubalinos ( ) Equinos ( ) Bovinos  
O que faz quando vê animal com caroço (abscessos):  
( ) Espera abrir sozinho  
( ) Abre o caroço, não desinfeta e retorna com animal para rebanho  
( ) Abre o caroço, desinfeta e retorna com animal para rebanho  
( ) Abre o caroço, desinfeta e separa animal até cicatrizar  
( ) Elimina animal do rebanho  
Material usado para incisão é lavado e desinfetado:  
( ) Não ( ) Sim ( ) Descartável.  
Destino do material descartado: ( ) enterrado ( ) queimado ( ) lixo  
Material usado para incisão: ( ) bisturi ( ) canivete ( ) outro  
Desinfeta antes e depois de utilizado? ( ) Não ( ) Sim  
Deixa dreno? ( ) Não ( ) Sim  
Após incisão, utiliza iodo para cauterização interna? ( ) Não ( ) Sim  
Já usou ou usa a injeção de formol no abscesso? ( ) Não ( ) Sim

Quantidade e frequência de aplicação: \_\_\_\_\_

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

Anota na ficha quando o animal apresenta caroço? ( ) Não ( ) Sim

Abscessos aparecem em que idade? \_\_\_\_\_

Em caso de recidivas, descarta o animal ou trata de novo? \_\_\_\_\_

Localizações dos caroços: ( ) “debaixo do queixo” ( ) debaixo da orelha ( ) no pescoço  
( ) na virilha ( ) na perna traseira ( ) abaixo do rabo

Sabe que é transmissível ao homem? ( ) Não ( ) Sim

Destino dos animais: ( ) frigorífico ( ) abate na fazenda ( ) Vende vivo

Tem muita perda por descarte por LC no frigorífico? ( ) Não ( ) Sim

Já identificou abscessos internos nos animais abatidos? ( ) Não ( ) Sim

Tem acompanhamento veterinário? ( ) Não ( ) Sim Frequência: \_\_\_\_\_

Nome completo do veterinário : \_\_\_\_\_

Medidas de controle contra linfadenite caseosa:( ) Vacinação: ( ) Não ( ) Sim

Tipo de vacina: ( ) Biodectin ( ) Labovet ( ) autógena

Esquema de vacinação: categorias e Nº de doses: \_\_\_\_\_

Usa tela ou arame liso porque acha que o tipo de cerca é importante no controle:  
( ) Não ( ) Sim

Desinfeta instalações: ( ) Não ( ) Sim Qual frequência: \_\_\_\_\_

Desinfetante utilizado: \_\_\_\_\_

Outras medidas de controle: ( ) Cura umbigo ( ) desinfeta material usado para abrir caroço: ( ) Usa luvas para abrir o caroço ( ) isola animal até cicatrização

Se preocupa com presença de abscessos nos animais na compra ou na volta de leilões e exposições ( ) Não ( ) Sim

Faz quarentena dos animais quando chegam na propriedade?  
( ) Não ( ) Sim Quanto tempo de isolamento (dias): \_\_\_\_\_