

“LINFADENITE CASEOSA NO ALTO-ALENTEJO, PORTUGAL –

Estudo preliminar de prevalência da doença em rebanhos de pequenos ruminantes e Otimização da prova de PCR Clássico no diagnóstico e identificação de *Corynebacterium pseudotuberculosis*”.

Lina Costa

Maio 2016





PUBLICAÇÃO ZOETIS – SAÚDE ANIMAL – PORTUGAL

Revisão de texto: Doutora Helga Waap – INIAV

Dep. Legal: 413059/16

“Duvida sempre de ti mesmo, até que os dados não deixem lugar para dúvidas.” – Louis Pasteur

ÍNDICE

Agradecimentos.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Lista de Siglas e Termos Específicos.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
CAPÍTULO 1: Perspetiva Nacional.....	16
1.1. Linfadenite Caseosa em Portugal e no Alentejo.....	16
1.2. Produção de pequenos ruminantes em Portugal e no Alentejo.....	20
1.3. Objetivos do estudo.....	28
1.4. Metodologia.....	29
1.5. Avaliação da Especificidade e Sensibilidade da técnica de PCR Clássico na deteção de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	37
1.6. Resultados do estudo.....	40
1.7. Discussão.....	47
CAPÍTULO 2: Perspetiva Mundial.....	51
2.1. Evolução da Linfadenite Caseosa na Europa e no Mundo.....	51
2.2. Novos Estudos e Estratégias de Erradicação.....	55
CONCLUSÃO.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	62

Agradecimentos

Matadouro Regional de Sousel – Portugal – Dr. José Perdigão;

Vetdiagnos – Cantanhede – Portugal – Doutora Anabela Almeida;

Zoetis – Saúde Animal – Portugal – Dr. Mário Hilário;

INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária) – Portugal – Doutora Helga Waap;

Instituto Politécnico de Portalegre – Escola Superior Agrária de Elvas – Portugal – Dr^a. Amélia Canhoto;

Divisão de Intervenção Veterinária de Portalegre – Portugal;

Laboratório de Enfermedades Infecto-contagiosas – Universidad de Córdoba – España – Doctor Alfonso Maldonado y Doctora Belén Huerta;

Clilegre – Hospital Veterinário de Portalegre – Portugal – Fantástica equipa de profissionais e amigos;

Todos os produtores pecuários da região em estudo, que gentilmente permitiram a recolha de amostras e registos nas suas explorações e,

À minha **GRANDE Família de Portalegre e da Póvoa de Varzim.**

Resumo

Corynebacterium pseudotuberculosis, uma bactéria Gram-positiva é o agente causal da LC (Linfadenite Caseosa), uma doença crónica de ovelhas, cabras e outros animais de sangue quente. A prevalência atual da LC em pequenos ruminantes está subestimada e em Portugal não existem dados, nem de prevalência, nem do impacto desta afeção na produção de pequenos ruminantes. A LC é uma doença de distribuição mundial e o seu impacto económico na produção de ovinos e caprinos é uma preocupação atual dos ministérios de agricultura de países desenvolvidos. Tal como a LC, outras doenças causadas por microrganismos piogénicos apresentam uma prevalência elevada por todo o mundo, em ovinos e caprinos, sendo que algumas destas afeções são zoonoses sob o controlo das autoridades europeias de saúde pública. O presente trabalho é um estudo preliminar da prevalência da LC, realizado em 55 efetivos de pequenos ruminantes, com a identificação de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em lesões piogénicas de ovelhas e cabras, recolhidas em matadouro e em explorações, na região do Alto-Alentejo, Portugal. A prevalência da LC foi determinada pela técnica de PCR Clássico (*Polymerase Chain Reaction*) em amostras patológicas de pús e órgãos afetados, recolhidas de ovelhas e cabras demonstrando lesões viscerais ou externas. Um total de 55 amostras de lesões piogénicas (uma amostra por exploração) foram processadas pela técnica de PCR Clássico. Os resultados demonstram uma prevalência de 18% para a LC. Este estudo permitiu concluir que a LC é uma doença prevalente em rebanhos de ovelhas e cabras em Portugal, sendo importante direcionar a atenção das entidades oficiais e centros de investigação nacionais para o estudo do seu impacto económico, formas de controlo e erradicação.

Abstract

Corynebacterium pseudotuberculosis, a Gram-positive bacterium is the etiological agent of caseous lymphadenitis (CL), a chronic disease of sheep, goats and other warm-blooded animals. The actual prevalence of CL in small ruminants is underestimated and there are no data in Portugal, neither on the prevalence, nor on the economic impact of this disease. CL is a worldwide disseminated disease and its economic impact in sheep and goats flocks is a present concern of official development agriculture departments in developed countries. Like CL, other diseases caused by pyogenic microorganisms are prevalent in sheep and goats worldwide and some of those are zoonotic problems under the control of European public health authorities. The present work is a preliminary study on the prevalence of CL, conducted in 55 herds of small ruminant, with the identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* on pyogenic lesions in sheep and goats, collected in slaughterhouses and in production units in the region of Alto-Alentejo, Portugal. The prevalence of CL was determined by classic PCR (*Polymerase Chain Reaction*) in pathological samples of pus and affected organs collected from sheep and goats showing external or visceral lesions. A total of 55 pyogenic lesions (one sample per herd) were processed by the Classic PCR technic. The results demonstrate a prevalence of 18% for CL. In conclusion, this study shows a high prevalence of CL in Portuguese sheep and goat flocks and it is important to direct attention of national government and research centers to the study of its real economic impact, control and eradication measures.

Lista de Siglas e Termos Específicos

Sigla	Significado
Bp	Pares de bases
DGADR	Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Regional
DGAV	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOP	Denominação de Origem Protegida
DSMZ	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)</i>
EET's	Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FAOStat	<i>Statistics at FAO</i>
Fw	<i>Forward</i>
IG	Indicação Geográfica
IGP	Indicação Geográfica Protegida
INE	Instituto Nacional de Estatística
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
LC	Linfadenite Caseosa
Ng	Nanogramas
nM	Nanomolares (concentração de <i>primers</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLD	<i>Phospholipase D</i>
Rpm	Rotações por minuto
Rv	<i>Reverse</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAE buffer	Tampão Tris – Acetato – EDTA
Tm	Temperatura de emparelhamento
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

INTRODUÇÃO

A LC ou Pseudotuberculose é uma doença piogénica e contagiosa, reportada pela primeira vez por Preisz e Guinard em 1891 e Nocard em 1896 (Baird & Fontaine, 2007). Em Portugal a doença foi descrita pela primeira vez em 1968 pelo Professor Jacinto Ferreira e o mesmo autor fala do tratamento cirúrgico da Linfadenite em cavalos, em 1957 (Ferreira, 1968). A presença da Linfadenite é reconhecida há mais de cem anos e já foi reportada em ovelhas infetadas na Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Médio Oriente, América do Norte e América do Sul, Inglaterra, e na maioria dos países do norte e sul da Europa.

É uma doença crónica e insidiosa que afeta principalmente pequenos ruminantes e é causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Actinomycetales: Corynebacteriaceae), uma bactéria do grupo dos actinomicetos, bastonetes Gram-positivos. Este microrganismo é muito resistente no meio exterior, o que parece atribuir-se à existência de um componente lipídico na sua membrana, muito resistente à dessecação (Brown et al., 1987).

A bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, para além de afetar pequenos ruminantes, também é ocasionalmente encontrada em bovinos, cavalos, búfalos e no Homem.

A doença foi reportada no cervo de cauda branca, com isolamento do *C. pseudotuberculosis* (Stauber et al., 1973). Outros ruminantes, como os antílopes também podem ser infetados por este agente (Clark et al., 1972). Em países onde exista a possibilidade de coabitação destes animais de espécies silvestres e ruminantes domésticos, como Portugal e Espanha, prevê-se que haja transmissão do agente etiológico entre ambos, o que dificulta o controlo da LC nestes países.

A autora descreveu (Costa, 2014) o isolamento do *C. pseudotuberculosis* em bovinos, em coinfeção com outros agentes bacterianos primários (*Escherichia coli* e *Arcanobacterium pyogenes* – nomenclatura atual: *Trueperella pyogenes*). Sendo considerado um oportunista, ao estar presente em lesões viscerais (principalmente

no pulmão), sob a forma de piogranulomas, favorece a virulência dos agentes bacterianos primários e o aumento da resistência antibiótica.

Apesar de *C. pseudotuberculosis* ser considerado o agente etiológico da LC em pequenos ruminantes, tais como cabras e ovelhas, este agente patogénico está associado a casos de linfadenite em cavalos e a linfangite ulcerativa em bovinos (Baird & Fontaine, 2007).

A infeção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos encontra-se disseminada mundialmente (Guedes et al., 2015), podendo levar a diferentes quadros clínicos. Estes são frequentemente pouco específicos e podem ser confundidos com outras patologias. O diagnóstico diferencial deve ser feito em caso de suspeita de mormo, dermatofitose, celulite estafilocócica, infeções por *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Corynebacterium pyogenes* e *Rhodococcus equi* (Yeruham et al. 1996, Motta et al., 2010 citados por Guedes et al., 2015). A doença nos equinos tem também um carácter crónico e contagioso, com uma forma clássica conhecida por Linfangite ulcerativa ou abscesso do peito, ou ainda como febre de pombo (“Pigeon fever”). Esta é a forma mais grave, por estar associado a um comprometimento sistémico. A taxa de mortalidade nos animais que não recebem tratamento é de 100% (Aleman et al., 1996 citado por Guedes et al., 2015). A LC nos equinos pode também ser assintomática ou manifestar-se sob uma forma simples, com abscessos externos.

Os sinais clínicos da Pseudotuberculose em pequenos ruminantes incluem o aumento dos linfonodos superficiais, tais como os linfonodos submandibular, pré-escapular, pré-femural, supra-mamário e poplíteo, ou dos órgãos internos, como os pulmões.

A doença caracteriza-se por supuração e inflamação necrozante de um ou mais linfonodos e os animais apresentam lesões de natureza necrótico-purulenta, com múltiplas localizações orgânicas, lesões que normalmente adquirem natureza caseosa. Estudos baseados no exame clínico e características clínicas da doença demonstram que os gânglios mandibular (Fig. 1) e pré-escapular são, dos linfonodos superficiais, os mais frequentemente afetados, facto que pode estar relacionado com a via de entrada de bactérias, bem como com o tipo de pastoreio, a prática da tatuagem e identificação dos animais (cabeça, normalmente nas

orelhas), a prática de vacinação e aplicação injetável de fármacos na zona pré-escapular e a tosquia.



Figura 1: Abscesso superficial localizado no linfonodo mandibular que, após drenagem, deixa sair um pús espesso e de odor fétido (ovino macho de uma exploração de aptidão carne na região em estudo, 2014) (Fonte: original).

Os abscessos podem desenvolver-se também em órgãos internos, como o pulmão (Fig. 2), os rins, o fígado e o baço, reconhecendo-se cada vez mais, o envolvimento de nódulos internos na chamada forma visceral ou caquetizante (Fig. 3) da LC.



Figura 2: Microabscessos no pulmão e pneumonia exsudativa/purulenta em caprino por *C. pseudotuberculosis* (caso clínico 2009 – Portugal) (Fonte: Costa, 2014).



Figura 3: (a) e (b) Forma clínica caquetizante (visceral) (caso clínico 2009 – Portugal) (Fonte: Costa, 2014).

Num estudo recentemente desenvolvido em 13 explorações de cabras na província de Quebeque, Canadá, com o objetivo de determinar as principais causas de mortalidade, com especial enfoque na LC como causa de morte ou refugo (Debien, et al., 2013), verificou-se a presença de abscessos internos em 54,1% dos casos.

A autora reportou uma forma sistémica em caprinos com elevada taxa de mortalidade no ano de 2009 (Costa, 2014) e, no ano 2015, identificou uma forma visceral-mamítica em ovinos leiteiros, com a presença de abscessos causados por *C. pseudotuberculosis* e agaláxia num elevado número de animais em produção (Fig. 4). A mastite por *Corynebacterium* caracteriza-se pela formação de nódulos e abscessos à superfície da mama. Estes abscessos espessos, ao romperem, deixam fluir um pús espesso, de coloração esverdeada e cheiro nauseabundo. A condição geral do animal não fica normalmente comprometida (Ermini & Antenucci, 2014).

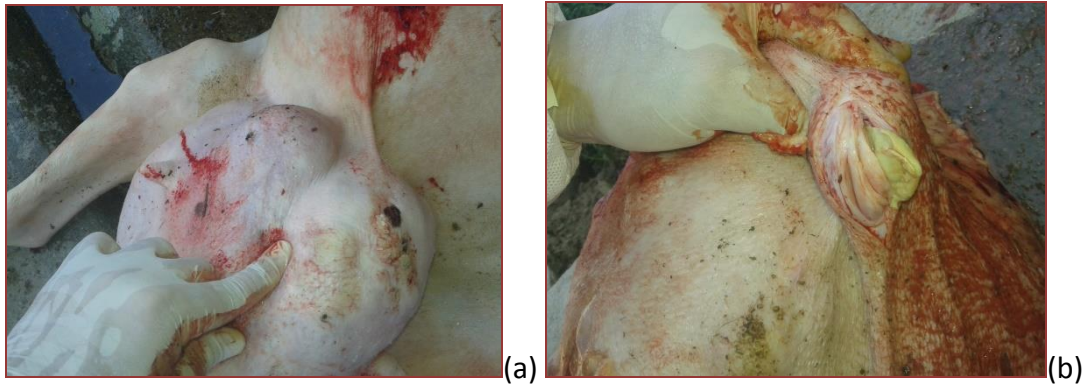


Figura 4: Imagem (de necrópsia) recolhida em surto de mamites por *C. pseudotuberculosis* diagnosticado em 2015 num efetivo ovino de exploração leiteira, na região em estudo. (a): Nódulos evidentes e palpáveis à superfície do úbere. (b): Ao corte saída de pús espesso e de coloração amarelo-esverdeada. (Fonte: original).

A patogenicidade das estirpes de *C. pseudotuberculosis* está relacionada com a secreção de fatores toxígenos, da Fosfolipase D (PLD – *phospholipase D*) e com o conteúdo lipídico das suas paredes celulares.

O contágio da doença pode ocorrer por contacto direto (entrada através de soluções de continuidade na pele e mucosas) ou por inalação. *C. pseudotuberculosis* pode penetrar a pele através de abrasões (Barba et al., 2015).

Apesar de o contágio poder ocorrer por diferentes vias, os animais com lesões pulmonares são a principal fonte de infeção (Gómez-Gascón et al., 2013). No entanto, os animais com abscessos superficiais representam outra importante fonte de contágio, uma vez que destas lesões se liberta uma grande quantidade de bactérias viáveis (10^6 e 5×10^7 células/g) para a pele e para a lã, que podem contaminar o meio externo e infetar outros animais (Baird & Fontaine, 2007). Os mesmos autores descrevem que, mesmo sendo *C. pseudotuberculosis* uma bactéria Gram positiva não formadora de esporos, e com comportamento de agente intracelular facultativo, a sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente é uma das suas características chave, contribuindo para a elevada taxa de transmissão da LC dentro de um rebanho. A LC é normalmente introduzida num rebanho através de um portador assintomático proveniente de uma exploração infetada.

Uma investigação sobre os fatores de risco para a LC, realizada na Austrália (Paton, 2010), demonstrou que as principais fontes de transmissão da doença são os animais com abscessos pulmonares e animais com lesões na pele (após a tosquia por exemplo)

e expostos a banhos, e não os ambientes contaminados pela bactéria *C. pseudotuberculosis*. Inúmeros estudos realizados mundialmente sobre o controlo da LC são unânimes na importância da deteção de animais portadores assintomáticos, fonte de infecção para o rebanho.

O modo de transmissão de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cavalos permanece desconhecido, admitindo-se que possa ocorrer através do contacto direto cavalo-cavalo, contacto com o agente patogénico em solos infetados e através de insetos vetores. Um estudo recente (Barba et al., 2015) concluiu que a mosca doméstica (*Musca domestica*) pode servir de vetor de *C. pseudotuberculosis* e transmitir a bactéria a póneis.

As perdas económicas imputadas à LC derivam do aumento das horas de trabalho na inspeção de carcaças afetadas, refugo e rejeição de carcaças, limpeza e desinfeção de material e equipamento infetado (material de tosquia, identificação animal,...), diminuição da produção de leite, diminuição da produção de lã, morte dos animais afetados pela forma sistémica, infertilidade e diminuição do desempenho reprodutivo resultante do síndrome da “ovelha fraca” (Stanford et al., 1998; Baird, & Fontaine, 2007; Al-Gaabary et al., 2010).

Juntamente com a importância económica, a pseudotuberculose tem interesse do ponto de vista sanitário ao ser considerada uma zoonose menor e profissional, na medida em que afeta indivíduos em contacto estreito com estes animais, nos quais o contágio se dá através de pequenas feridas (Gómez-Gascón et al., 2013).

As infecções em humanos, particularmente aqueles que convivem com animais de produção (agricultores, trabalhadores de matadouro, médicos veterinários, tosquiadores, etc.) são reportadas com frequência na Austrália. A linfadenite axilar predomina nestes casos, presumivelmente porque as mãos e os braços são frequentemente o local de infecção primária (Peel et al., 1996), entrando o agente através de lesões na pele. *C. pseudotuberculosis* encontrou-se no leite, logo, a ingestão de leite não pasteurizado proveniente de animais infectados com LC pode ser uma fonte de infecção para os humanos (Çetinkaya et al., 2002).

A maioria dos programas de controlo de LC implementados em vários pontos do globo, muitos baseados na eliminação de animais doentes e/ou infetados, têm-se revelado infrutíferos, com a recorrência de casos, se um único animal escapa ao diagnóstico. Consequentemente, o diagnóstico da LC continua a ser largamente investigado pelo mundo.

Uma vez instalada, a doença é de difícil erradicação pois a terapêutica não é efetiva. O agente etiológico é sensível, *in vitro*, a alguns antibióticos mas, *in vivo*, esta eficácia diminui largamente, possivelmente devido à dificuldade de penetração dos fármacos na cápsula que envolve o processo piogranulomatoso típico da LC. Outro fator que impede a instituição de programas eficazes de erradicação é a dificuldade de detetar animais infetados num rebanho, os principais responsáveis pela disseminação da doença.

Não existe nenhum teste de diagnóstico capaz de identificar todos os casos, nem diferentes fases ou formas da doença (Oreiby, 2015). O diagnóstico serológico baseado nas provas de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) tem vindo a ser melhorado e validado para a identificação dos animais portadores assintomáticos, mas o diagnóstico definitivo da LC continua a ser realizado com base no isolamento e identificação do agente etiológico, através de provas bioquímicas, cultura bacteriológica ou, mais recentemente recorrendo a provas de diagnóstico molecular como a PCR.

A PCR é uma técnica robusta, comumente utilizada na deteção direta de microrganismos numa grande variedade de amostras clínicas e *post-mortem*. No entanto, a eficácia da PCR na deteção direta de *C. pseudotuberculosis* em amostras de pús foi muito pouco avaliada até à data.

Com o presente estudo pretendeu-se contribuir para o conhecimento da epidemiologia da LC na região do Alto-Alentejo, Portugal, uma região da Península Ibérica com importante produção pecuária de ovinos e caprinos. O trabalho teve como objetivos específicos estimar a prevalência da LC em rebanhos de pequenos ruminantes no Alto-Alentejo, e, em simultâneo otimizar uma técnica de diagnóstico molecular desta afeção, a técnica de PCR clássico.

Nesta região foram aleatoriamente selecionadas 55 explorações de pequenos ruminantes, incluindo efetivos de ovinos e caprinos. O acompanhamento e a recolha de amostras *in vivo* foi realizado no local da unidade de produção, em animais com lesões superficiais e as amostras *post-mortem* foram obtidas num matadouro regional – Matadouro Regional de Sousel, no período compreendido entre 2012 e 2013.

CAPÍTULO 1: Perspetiva Nacional

1.1. Linfadenite Caseosa em Portugal e no Alentejo

Não existem estudos de prevalência nem dados sobre a importância económica da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* nos pequenos ruminantes, a nível nacional ou regional. No entanto a forma clínica da doença, sob a forma de abscessos subcutâneos, é reconhecida na maioria dos efetivos, tanto pelos produtores como por médicos veterinários. O único trabalho publicado até à data diz respeito a um estudo preliminar desenvolvido no distrito de Lisboa, Portugal, em 4 explorações de ovelhas e cabras (Boinas, Mendes & Pateira, 2000). Neste estudo, a análise do pús colhido em 18 abscessos localizados nos linfonodos submaxilar, retrofaríngeo lateral, pré-escapular, supra-mamário e poplíteo de 11 ovelhas e 3 cabras, permitiu identificar *Corynebacterium pseudotuberculosis* em 5 amostras de ovelhas e 2 amostras de cabras (resultando numa prevalência de LC de 45,5% em ovinos e 66,7% em caprinos).

O referido trabalho foi desenvolvido num número reduzido de animais e incidiu apenas na pesquisa do agente em lesões externas. O principal problema deriva da infecção subclínica e das manifestações sistémicas da doença, menos frequentemente detetadas, mas que são as principais responsáveis pelas quebras de rentabilidade associadas à LC. A dispersão da doença, que acontece num efetivo e entre efetivos sempre que existam animais portadores assintomáticos em circulação, agrava os efeitos económicos da LC. Empiricamente, conclui-se que, nos efetivos ovinos ou caprinos, quando 1 animal apresenta abscessos superficiais, existem pelo menos 6 animais com abscessos internos. A presença de abscessos nos linfonodos superficiais é altamente sugestiva da presença de LC num rebanho, particularmente se muitos animais do grupo estiverem afetados de forma similar (Al-Gaabary et al., 2010). Apesar de a presença da doença nos efetivos nacionais de pequenos ruminantes ser unanimemente reconhecida por médicos veterinários e produtores, sendo muitas vezes descrita no Alentejo como a “doença dos quistos”,

desconhece-se totalmente a sua prevalência real, de casos clínicos e subclínicos, bem como a sua importância económica.

Num estudo desenvolvido em Portugal sobre a mortalidade perinatal em pequenos ruminantes na região de Trás-os-Montes (Mendonça, 2012), verificou-se que *Corynebacterium* spp. faz parte dos agentes isolados em lesões pulmonares de recém-nascidos (a par dos géneros e espécies *Pasteurella* spp., *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus bovis* e *Clostridium perfringens*). No entanto, neste estudo não foi identificada a espécie de *Corynebacterium* envolvida. De referir que nestes resultados a maioria das lesões pulmonares diagnosticadas *post-mortem* não permitiram o isolamento de agentes bacterianos. No mesmo trabalho, o género *Corynebacterium* spp. também foi isolado em abortos e nados mortos.

Na sequência do presente estudo e na permanente busca de casos de campo de LC, a autora identificou, já no início de 2016, o agente *C. pseudotuberculosis* em amostras recolhidas no decorrer de um exame *post-mortem* realizado num animal de uma exploração de ovinos de aptidão carne, na região em estudo. O motivo do exame foi a morte por causa desconhecida de um animal que aparentemente se encontrava saudável. Na necrópsia foram observadas lesões de LC visceral grave, com a presença de um abscesso num linfonodo mesentérico (Fig. 5a), pneumonia exsudativa (Fig. 5b, 5c e 5d) e abscesso pulmonar (Fig. 5e). *C. pseudotuberculosis* foi identificado nas lesões pulmonares e no nódulo mesentérico abcedado pela técnica de PCR clássica. No decurso do diagnóstico bacteriológico, foi possível isolar e identificar os agentes *Staphylococcus aureus* nas lesões pulmonares e hepáticas e *Leclercia adecarboxylata* no nódulo mesentérico. Este último agente, anteriormente designado por *Escherichia adecarboxylata*, está associado a situações patogénicas em humanos e animais, mas, até ao presente, desconheciam-se casos clínicos em ovinos.

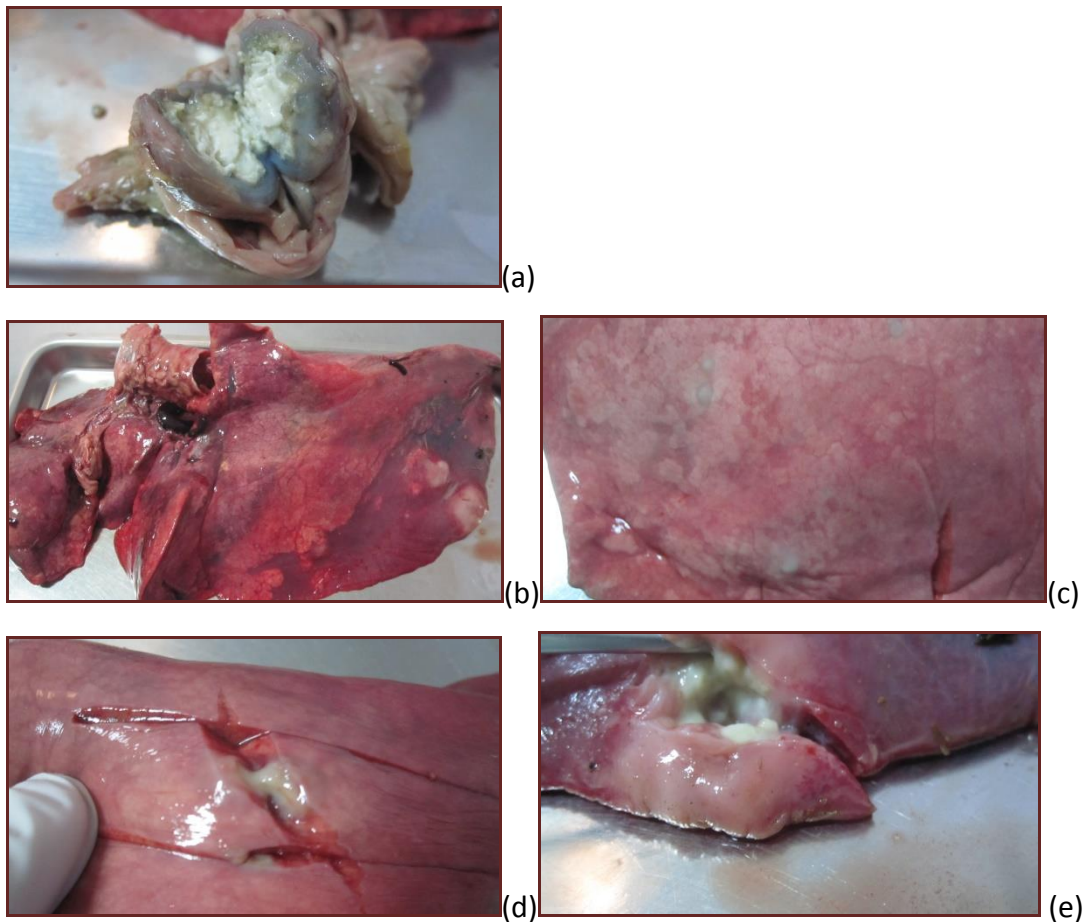


Figura 5: Lesões *post-mortem* num ovino com identificação de *C. pseudotuberculosis*: (a) Abscesso bem encapsulado num linfonodo mesentérico; (b) Pneumonia exsudativa; (c) Microabscessos pulmonares; (d) Corte do parênquima pulmonar com saída de material purulento espesso; (e) Abscesso pulmonar encapsulado. (Caso clínico numa exploração da região em estudo – fevereiro 2016). (Fonte: original).

Não obstante o aparente interesse e consciência atual sobre a importância da LC na produção nacional de pequenos ruminantes, os trabalhos ou estudos desenvolvidos com o intuito de aprofundar o conhecimento científico e epidemiológico sobre esta doença são diminutos.

Relativamente à certificação dos efetivos para fins de exportação para países terceiros, a LC está incluída na lista de doenças a controlar. Vários países de destino, entre eles, Israel, Irão, Tunísia e Arábia Saudita, exigem que os pequenos ruminantes enviados de Portugal estejam livres de uma série de doenças infecciosas, entre as quais a LC. Uma fonte da DGAV (Dr^a Rita Amador – DGAV – IV

Jornadas Técnico-Veterinárias do Campo Branco, 20 e 21 novembro 2015) consultada sobre as perspetivas de negociação com países terceiros, informou que, entre as condições sanitárias para exportação de borregos, figura a exigência de certificação das explorações de origem como livres de LC, no caso de venda para reprodução e a não evidência clínica de LC nos últimos 3 anos, para venda de borregos para abate, para Israel. Apesar do enorme interesse de alguns países terceiros na carne de borrego portuguesa (valorizada acima de 5 euros por quilograma nos animais com 60kg de peso vivo), o presente incumprimento destas condições sanitárias inviabiliza os produtores nacionais de pequenos ruminantes de exportar a sua produção.

O desconhecimento do nível sanitário dos efetivos de ruminantes é um problema antigo em Portugal, derivado do facto dos planos de controlo e erradicação implantados apenas cobrirem as doenças de controlo oficial ¹, não sendo possível a obtenção de dados ou registos de outras doenças infeto-contagiosas com importância sanitária e económica relevantes, como a Pseudotuberculose, a Paratuberculose, a Clamidiose e a Leptospirose.

A par com este estudo, a autora está a desenvolver uma avaliação a maior escala da prevalência da LC no Alto-Alentejo através de técnicas serológicas (ELISA) realizadas num total de 800 amostras, com o qual se pretende analisar a prevalência e a distribuição da LC nesta região.

¹ - Pequenos ruminantes: Programa de Erradicação de Brucelose Ovina e Caprina e Plano de Vigilância, Controlo e Erradicação das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET's).

- Bovinos: Programa de Erradicação de Brucelose Bovina, Tuberculose Bovina e Leucose Enzoótica dos Bovinos e o Plano de Vigilância, Controlo e Erradicação das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET's).

1.2. Produção de pequenos ruminantes em Portugal e no Alentejo

Portugal continental tem um total de 2 milhões de ovinos e 380 mil caprinos, enquanto nas ilhas o número de ovinos é de 3 mil na Madeira e 4 mil nos Açores (PORTUGAL - INE, 2014).

Dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) de 2013 colocam Portugal nos 10 países com maior produção de carne de ovino, entre os 28 da União Europeia, sendo o Reino Unido o maior produtor, seguido da Espanha e da França (Fig. 6). De referir que, em 2013 a produção total (toneladas de carne) foi muito inferior à de anos anteriores, em que Portugal produzia o dobro. Nestes registos constata-se também uma redução global na produção de carne de ovino nos últimos 10 anos, nomeadamente em Portugal e em Espanha (Fig.7).

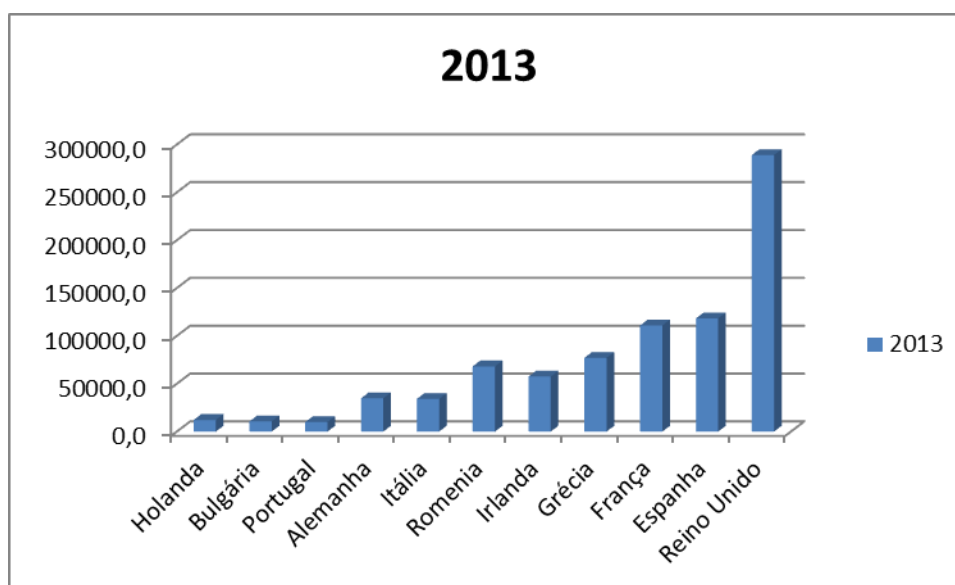


Figura 6: Gráfico representativo da produção de carne de ovino (em Toneladas) nos principais países produtores de pequenos ruminantes da União Europeia (FAOStat, 2013).

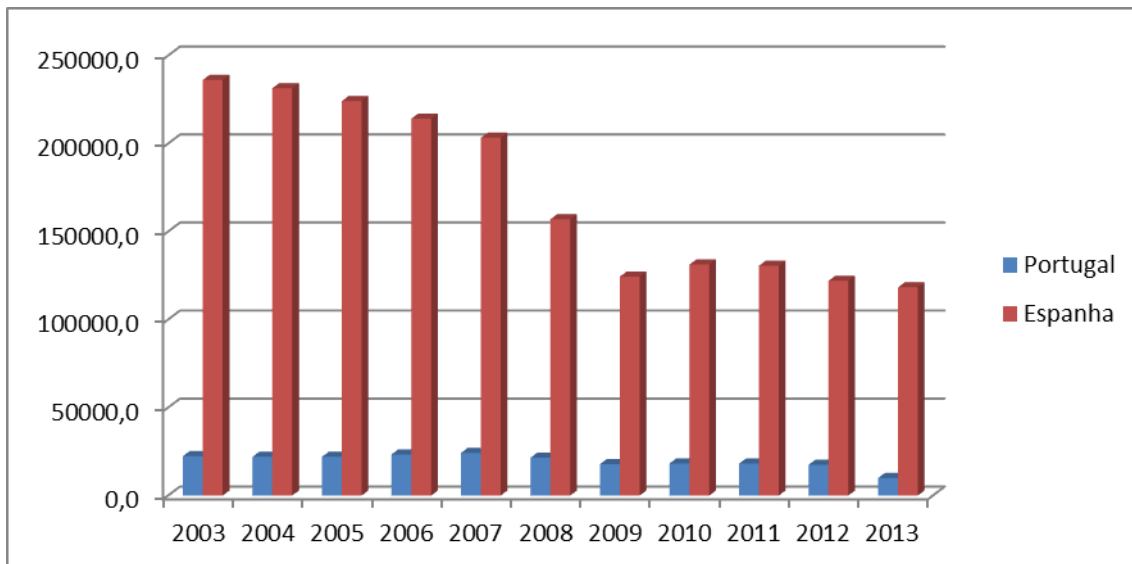


Figura 7: Gráfico representativo da redução na produção de carne de ovino (em Toneladas) nos últimos 10 anos de registo existente, em Portugal e Espanha (FAOStat, 2013).

O Alentejo é a região do país com maior número de caprinos e de ovinos, contando com um total aproximado de 97 000 cabras e mais de 1 milhão de ovelhas (metade do efetivo nacional ovino e um quarto do efetivo nacional caprino está no Alentejo) (Fig. 8 e 9, respetivamente). Nesta região de Portugal, 80% dos ovinos são de aptidão carne e 20% são de aptidão leiteira (PORTUGAL - INE, 2014).

A produção de pequenos ruminantes de aptidão leiteira e de carne no Alto-Alentejo, representa uma fatia importante da produção pecuária da região e do país, com um total de 250 000 ovinos e 25 000 caprinos (PORTUGAL - INE, 2009) (Fig. 10 e 11, respetivamente). A região em estudo detém assim 1/8 dos ovinos do país e ¼ dos ovinos de todo o Alentejo.

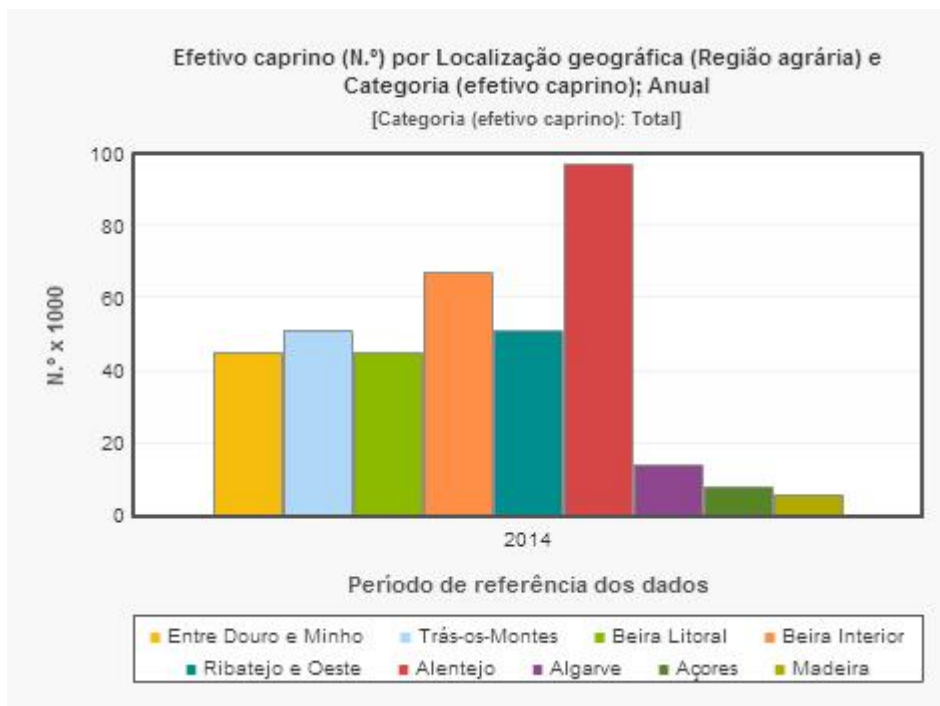


Figura 8: Gráfico representativo do número total de caprinos em 2014 nas principais regiões agrícolas do país (Fonte: INE).

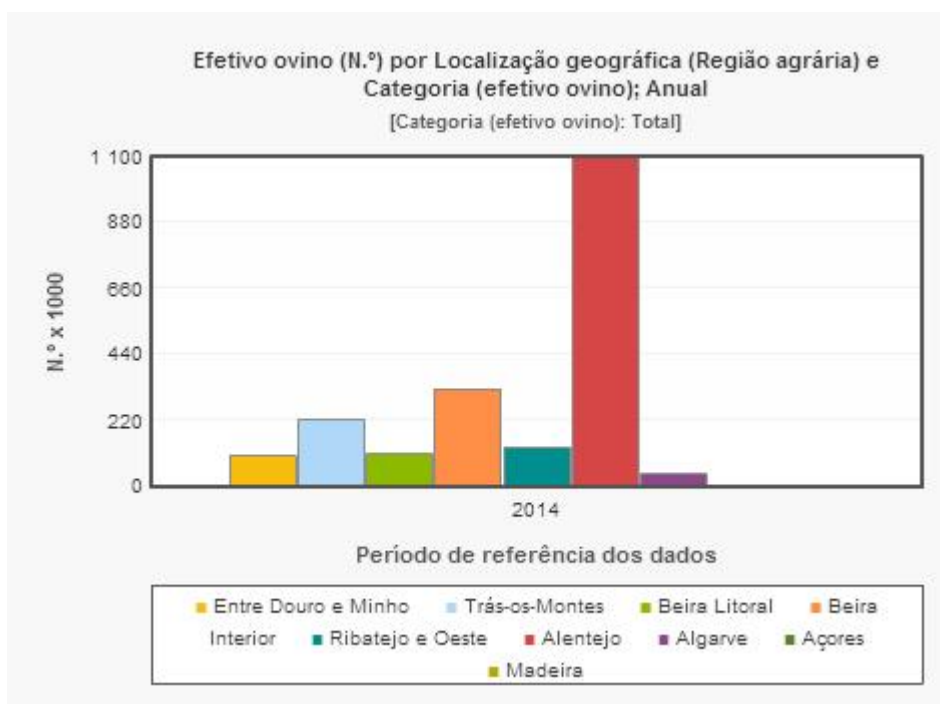


Figura 9: Gráfico representativo do número total de ovinos em 2014 nas principais regiões agrícolas do país (Fonte: INE).

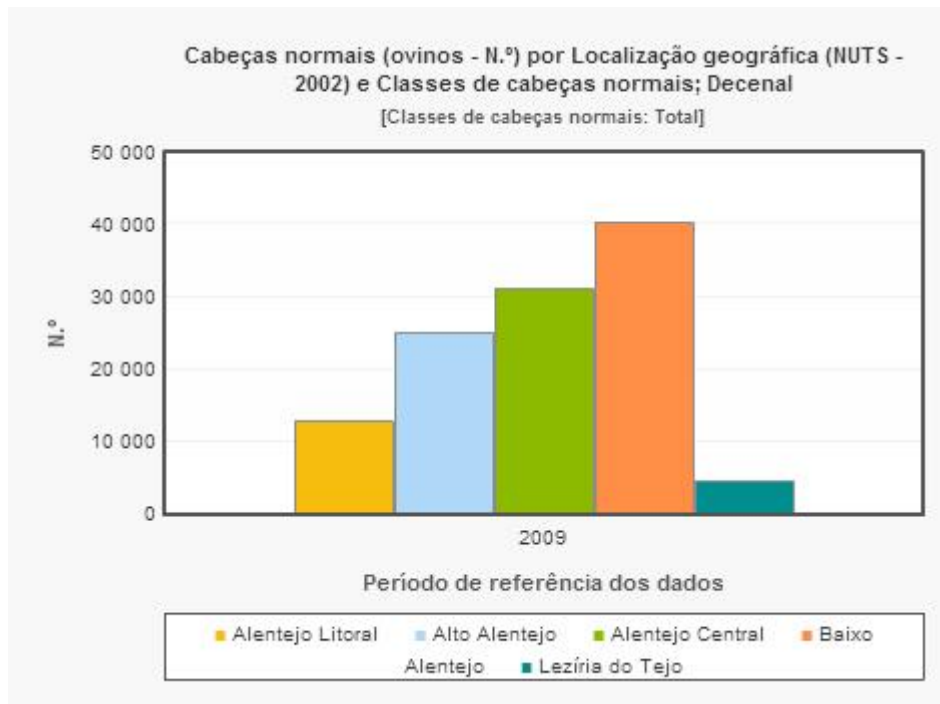


Figura 10: Gráfico representativo do número de ovinos no ano de 2009, nas cinco sub-regiões do Alentejo (Fonte: INE).

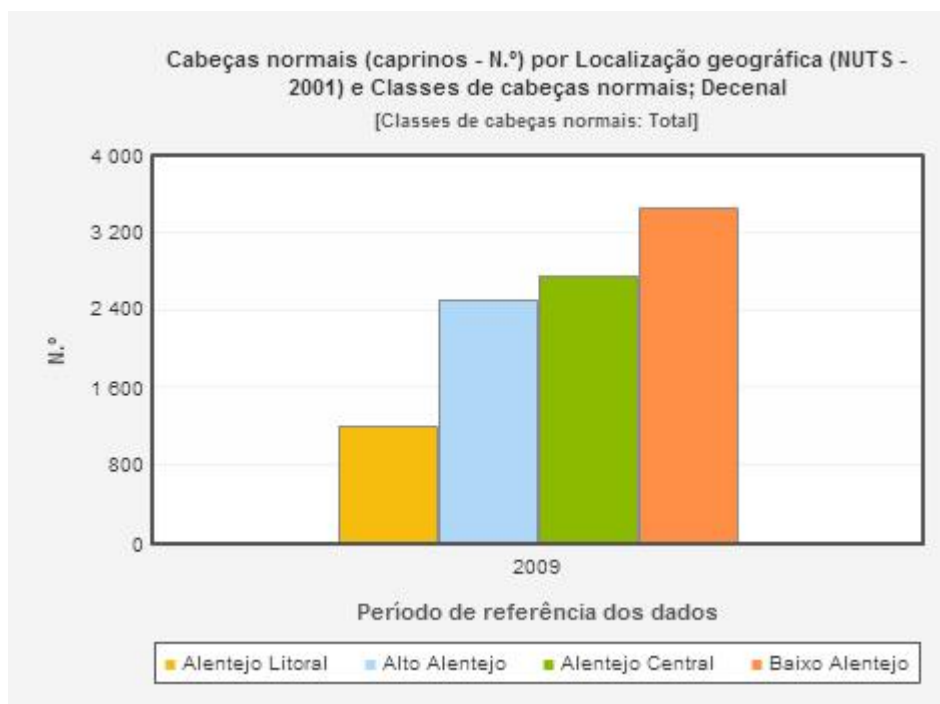


Figura 11: Gráfico representativo do número de caprinos no ano 2009, nas 5 sub-regiões do Alentejo (Fonte: INE).

A região do Alentejo é a principal produtora de leite de cabra e a segunda maior produtora de leite de ovelha do país (Fig. 12 e 13, respetivamente) (PORTUGAL - INE, 2014).

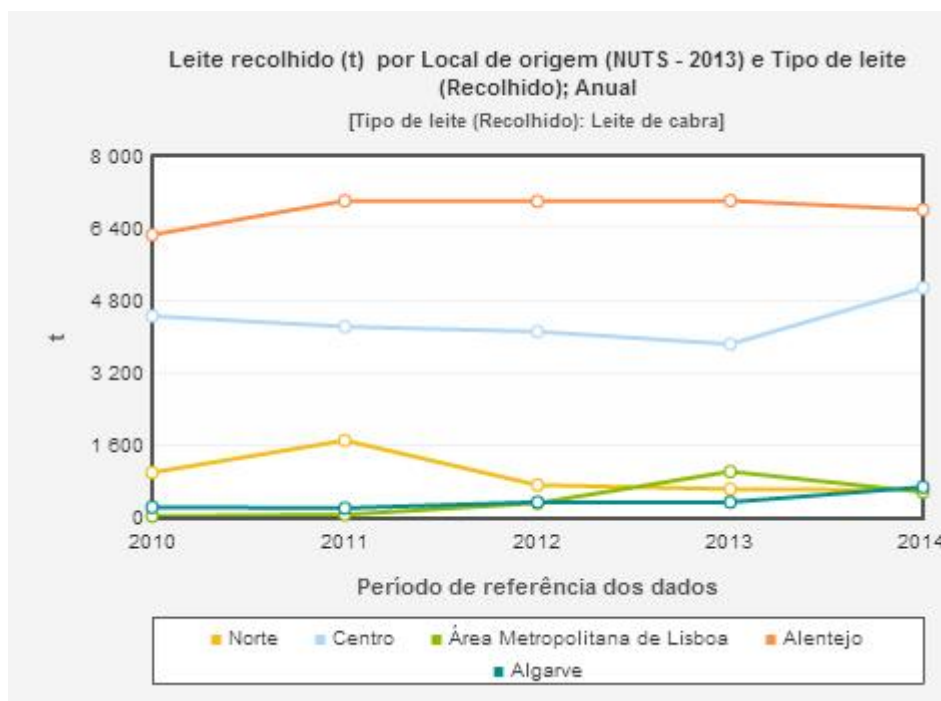


Figura 12: Gráfico representativo da produção de leite de cabra em 5 regiões agrícolas do país entre 2010 e 2014 (Fonte: INE).

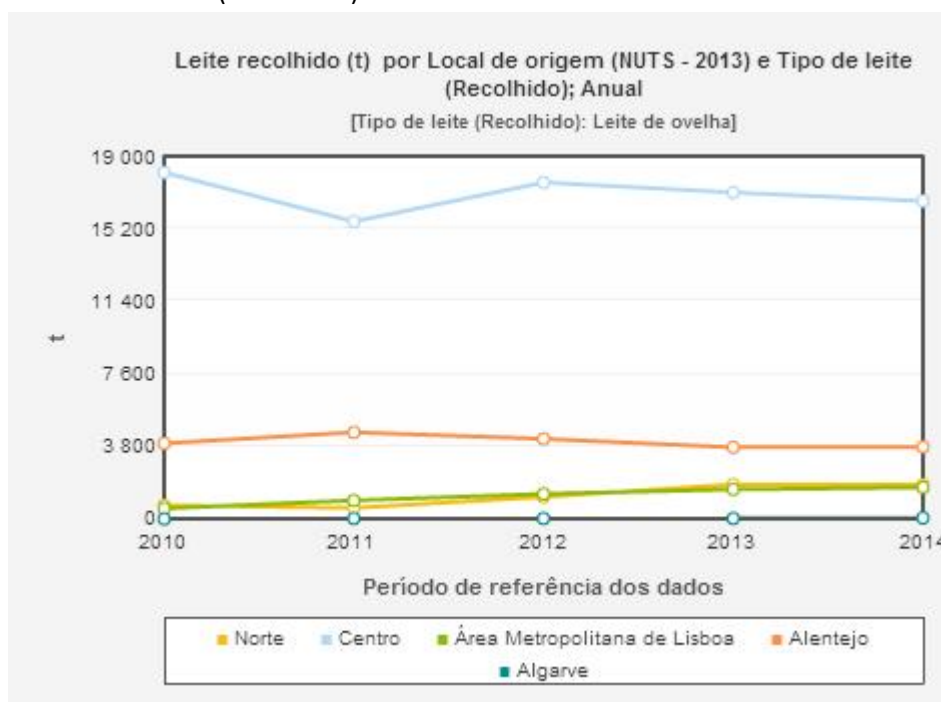


Figura 13: Gráfico representativo da produção de leite de ovelha em 5 regiões agrícolas do país, entre 2010 e 2014 (Fonte: INE).

A produção de carne, nomeadamente de carne de borrego certificada (Borrego do Nordeste Alentejano IG-Indicação Geográfica), na região em estudo, contribui com um total de 128 ton. para a produção nacional anual, sendo a 2ª maior região certificada na produção desta carne (Fig. 14).

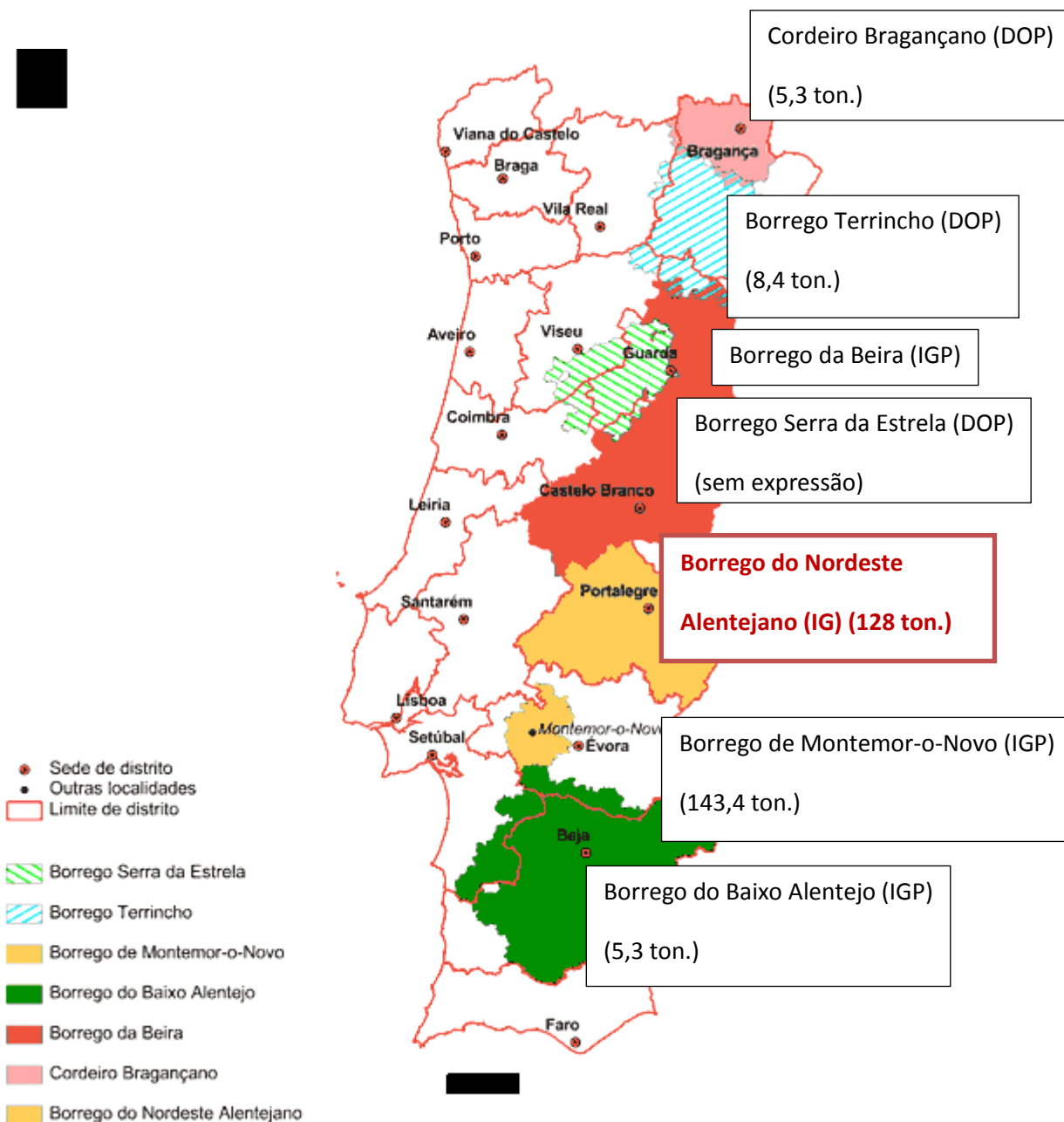


Figura 14: Mapa de Portugal representativo da produção anual de carne de borrego certificada (Fonte: DGADR, 2000 - produtos com denominação de origem protegida – carne de borrego).

No que refere à produção de queijo de leite de ovelha, o Alto-Alentejo é a região com maior produção de queijo certificado do país, com o queijo de Nisa DOP (Denominação de Origem Protegida) a contabilizar uma produção anual de 120,3 ton. (Fig. 15).

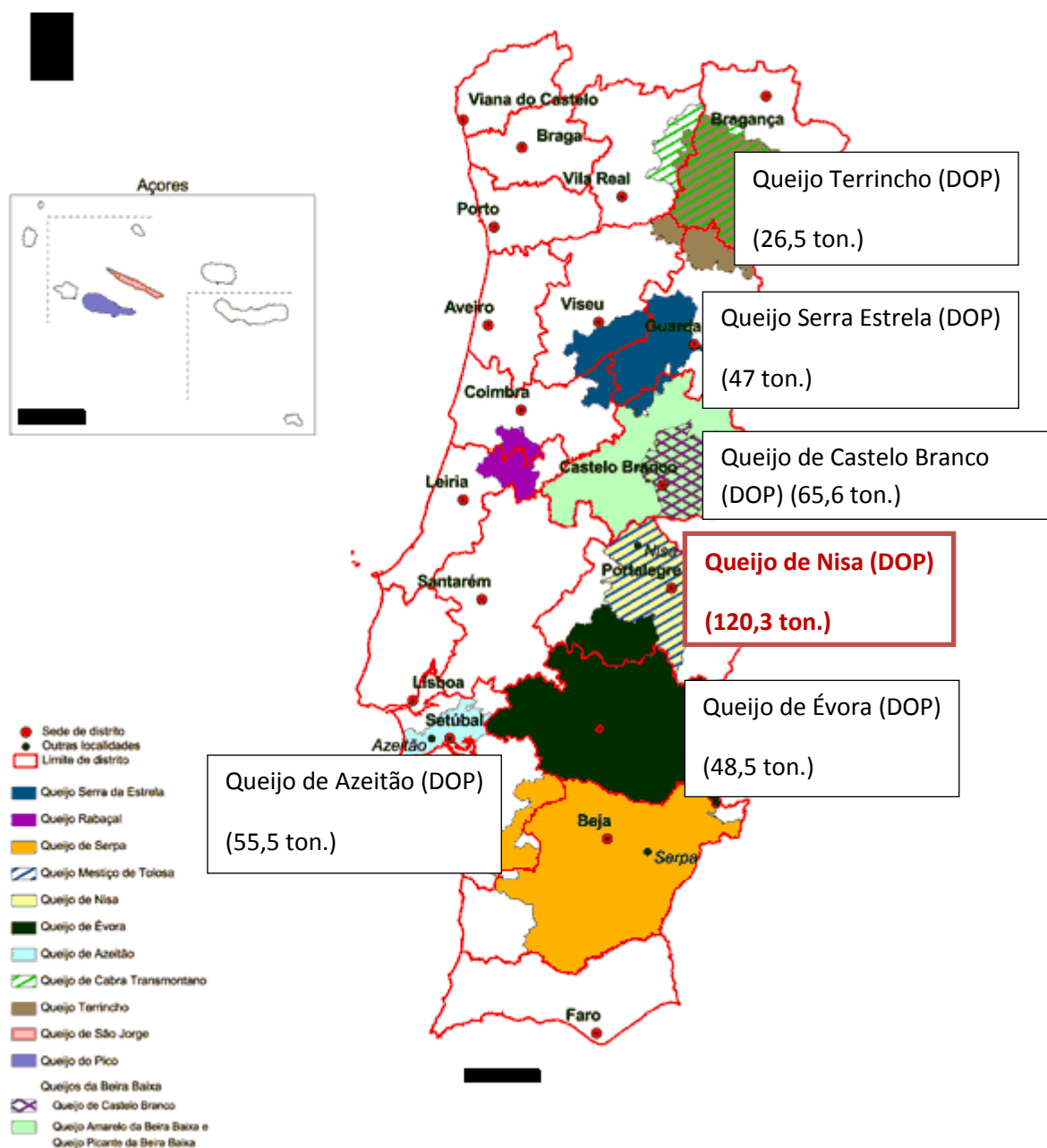


Figura 15: Mapa de Portugal representativo da produção anual de queijo certificado (Fonte: DGADR, 2000 - produtos com denominação de origem protegida – queijo de leite de ovelha).

Considerando a dimensão da agropecuária nacional, a região onde este estudo incidiu (Alto-Alentejo) apresenta-se como uma das principais regiões de produção de pequenos ruminantes, sendo a principal produtora de queijo de leite de ovelha e a segunda maior produtora de carne de borrego. Dada a relevância internacionalmente reconhecida da LC nas quebras de produção de leite, carne e lã nos efetivos de pequenos ruminantes infetados, é premente analisar o impacto desta afeção nos efetivos de pequenos ruminantes nesta região.

1.3. Objetivos do Estudo

Os principais objetivos do estudo foram (1) analisar a expansão e o aumento da incidência desta doença devastadora ao longo do tempo, sendo importante reconhecer este facto e explorar a sua prevalência atual, fatores de risco e importância económica em países como Portugal e Espanha, onde a produção de ovinos e caprinos entra como uma fatia importante da sua economia, (2) identificar pela técnica de PCR clássico, o principal agente etiológico desta doença piogénica dos pequenos ruminantes e apresentar dados de prevalência da LC, na região em estudo, (3) otimizar a técnica de PCR Clássico para a identificação de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em lesões com forte componente piogénica e de carácter crónico e (4) contribuir para o conhecimento científico sobre o diagnóstico e controlo da LC, promovendo a sensibilização de produtores, médicos-veterinários e restantes responsáveis sanitários para a importância desta grave afeção.

1.4. Metodologia

1.4.1. *Animais e amostras*

Os animais em estudo, ovinos e caprinos, são provenientes de explorações localizadas na região do Alto-Alentejo – Portugal, distrito de Portalegre com diferentes tipos de produção: intensivo, semi-extensivo e, maioritariamente extensivo. O matadouro regional de Sousel, local onde se recolheram as amostras *post-mortem*, é responsável pelo abate da maior parte dos pequenos ruminantes desta região.

As amostras patológicas de pús e lesões piogranulomatosas foram obtidas de lesões viscerais ou de órgãos internos com alterações macroscópicas sugestivas de processo piogénico, bem como de lesões superficiais características de LC.

As amostras foram identificadas com a exploração de proveniência, espécie animal e o órgão/zona afetada, e foram conservadas por congelação a -8°C.

No total foram recolhidas e conservadas 55 amostras patológicas, uma amostra por exploração. Das 55 explorações com identificação de lesões características de LC no animal vivo e *post-mortem*, apenas 4 eram explorações de caprinos e as restantes 51 correspondiam a explorações de ovinos.

Para preparar as amostras para processamento pela técnica de PCR Clássico, seccionou-se um fragmento de 25 a 30 mg na parte da lesão mais característica da doença, com auxílio de uma lâmina de bisturi. Os fragmentos das lesões foram transferidos para tubos tipo eppendorf.

1.4.2. *Técnica de PCR Clássico*

1.4.2.1. Desenho de *Primers*

O DNA de cada amostra de pús foi testado pela técnica de PCR de acordo com o método descrito por Pacheco et al. (2007). A técnica de PCR para deteção de DNA genómico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi desenhada para dois genes alvo, o segmento ribossomal 16S (16s rRNA) com 815 Bp (Pares de bases) e o gene que codifica para a exotoxina Fosfolipase D (PLD) com 132 Bp (Tabela 1).

Tabela 1: Provas de PCR realizadas para cada uma das amostras patológicas

PCR I	Deteção do gene RNA ribossomal 16S (concentração DNA normal)
PCR II	Deteção do gene do factor toxígeno Fosfolipase D (PLD) (concentração DNA normal)
PCR III	Deteção do gene RNA ribossomal 16S com DNA diluído 1:10
PCR IV	Deteção do gene do factor toxígeno Fosfolipase D (PLD) com DNA diluído 1:10

Para o desenho dos *primers* foi utilizado o software “*Primer express*” de desenho de *primers* onde se encontrou a melhor sequência de nucleótidos para ambos os segmentos 16s e PLD.

A escolha da sequência de nucleótidos fez-se em www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/:

Primers Corynebacterium pseudotuberculosis gene RNA ribossomal 16S:

Fw GTCTAATACTGGATAGGACCGCACT (58°C)

Rv ATATGTCAAGCCCAGGTAAGGTTTC (59°C)

Amplicon: 815pb

Seq ref: NR_119175.1

Primers Corynebacterium pseudotuberculosis gene PLD:

Fw GCTCGTAGTGTGTGCTCCATAAAT (58°C)

Rv ATCAGCGGTGATTGTCTTCCA (59°C)

Amplicon: 132 pb

Seq ref:L16587.1

1.4.2.2. Digestão e Extração do DNA

Para o procedimento de digestão e extração do DNA foi utilizado o “NZY Tissue gDNA Isolation kit” da empresa portuguesa “nzytech - gens & enzymes”. Os kits NZY são desenhados para a obtenção rápida e simples de DNA genómico puro a partir de uma grande variedade de fontes de amostras, incluindo células animais e tecidos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, caudas de ratos, leveduras, amostras forenses e amostras clínicas. Este método baseia-se na utilização de pequenas colunas (*spin column silica-based*) e não requer a extração através de fenol ou clorofórmio. Este kit utiliza tampões de lise otimizados contendo Proteinase K e SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) para libertação do DNA das células. Depois de preparar o lisado, o DNA é seletivamente absorvido pela coluna de tecido NZYSpin e outras impurezas, tais como, proteínas e sais, são removidas no decorrer dos passos de lavagens. O DNA genómico eluído apresenta uma razão $A_{260/280}$ entre 1.7 e 1.9 (densidade ótica) o que o torna pronto para ser utilizado em sequenciação, PCR, multiplex-PCR, genotipagem e uma grande variedade de manipulações enzimáticas. O NZY Tissue gDNA Isolation kit está otimizado para isolar até 35µg de DNA a partir de até 25mg de amostras de tecidos ou 10^7 células.

Esta fase da técnica de PCR é crucial para a sua sensibilidade, sendo que quanto maior for o grau de pureza do DNA genómico das amostras processadas, maior será o grau de sensibilidade da técnica. O ponto crítico no caso em estudo é exatamente a extração do DNA deste tipo de amostras, com elevado grau de cronicidade, presença de material purulento e reduzida presença de microrganismos e do seu DNA.

1.4.2.2.1. Condições de armazenamento e preparação dos reagentes

Todos os componentes do kit podem ser armazenados à temperatura ambiente (20-25°C) e são estáveis até um ano. Para maior período de armazenamento todos os componentes deverão ser mantidos a 4°C.

Antes da utilização do kit adicionou-se 1,35ml (MB13502/3) de tampão Proteinase a cada tubo de Proteinase K e agitou-se no vórtex (*Vortex stirrer-Fisher brand 3000rpm*). A solução de Proteinase K é estável a -20°C até 6

meses. Adicionou-se posteriormente 28ml (MB13502) ou 112ml (MB13503) de etanol de biologia molecular a 100%, a cada boião de tampão NW2. Os tampões NL e NW1 contêm hidrocloreto de guanidina. Foram utilizadas luvas na utilização deste kit.

1.4.2.2.2. Pré-lise das amostras

A cada uma das amostra adicionou-se 180µl da solução tampão NT1 e 25µl da solução preparada de Proteinase K, seguido de agitação vigorosa no vórtex. De seguida, procedeu-se à incubação das amostras a 56°C em banho seco (*Drybath modelo FB15101*), durante 1 a 3 horas, agitando ocasionalmente no vórtex ao longo da incubação.

O processo de digestão das amostras foi observado a olho nú, avaliando a cor e homogeneidade do preparado de digestão, a inexistência de grumos ou porções de tecido.

Algumas amostras de difícil digestão foram mantidas em incubação durante a noite.

1.4.2.2.3. Lise das amostras

Para a lise das amostras, adicionaram-se 200µl de tampão NL (agitado antes de usar), seguido de agitação no vórtex, durante 10 segundos. Nos casos em que permaneceram partículas visíveis em suspensão, as amostras foram centrifugadas a 4500rpm durante 1 minuto (*Mini-centrifuga Fisherbrand modelo Guoto*) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga.

1.4.2.2.4. Adição do etanol

A cada tubo de amostra lisada, foram adicionados 210µl de etanol a 100%. Os tubos foram agitados imediatamente no vórtex para obter uma solução homogénea.

1.4.2.2.5. Ligação do DNA à membrana de sílica (*DNA binding*)

A mistura obtida de cada uma das amostras, no passo anterior, foi transferida para colunas de tecidos NZYSpin, inseridas num tubo colector de 2ml. As colunas foram centrifugadas durante 1 minuto a 1200 rpm

(11.000g), de seguida, descartou-se o volume do tubo colector e voltou a colocar-se a coluna.

1.4.2.2.6. Lavagem da membrana de sílica

Adicionou-se a cada coluna de tecidos 500µL o tampão NW1 e levou-se a centrifugar durante 1 minuto a 12000rpm. Descartou-se o volume do tubo colector e voltou a colocar-se a coluna.

Adicionou-se 600µL do tampão NW2 a cada coluna e centrifugou-se durante 1 minuto a 12000rpm, descartando o volume do tubo colector e voltando a colocar a coluna. Numa 2ª lavagem utilizaram-se 200µL NW2 centrifugando 2min a 12000rpm.

1.4.2.2.7. Secagem da membrana de sílica

Cada coluna de tecidos NZYSpin foi colocada no respetivo tubo colector e centrifugada durante 2 minutos a 1200rpm. Nesta fase, o DNA da amostra encontra-se já na membrana de sílica.

1.4.2.2.8. Eluição do DNA

Colocou-se cada coluna de tecidos num tubo de microcentrifuga (tipo eppendorf) e adicionou-se 100µL do tampão NE, diretamente à membrana da coluna de tecidos (com cuidado para não tocar com a ponta na membrana). O pré-aquecimento do tampão de eluição a 70°C melhora a recuperação do DNA. Incubou-se 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se durante 2 minutos a 12000rpm

O DNA genómico pode ser armazenado entre 4°C e -20°C, dependendo do tempo de armazenamento.

1.4.2.3. PCR

Aparelho de PCR – Termociclador

Para cada amostra pipetou-se o seguinte volume num tubo de 0,1mL, de acordo com a tabela 2. Procedeu-se da mesma forma para um controlo positivo e o controlo negativo. Cada tubo ficou com um volume final de 10µL.

Tabela 2: Cálculo da concentração de *Primers*

Reagente	Volume
2x NZYtech Green Mastermix	5µl
Mistura de <i>Primers</i> 16S e PLD de <i>Coryneb. Pseud.</i> (Fw500nM:Rv 500nM)	1µl
RNAse free water	2µl
DNA de cada amostra	2 µl

Os tubos foram colocados no termociclador para amplificação dos fragmentos de DNA, utilizando as condições de PCR constantes da tabela 3.

Tabela 3: Condições de PCR

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	95°C	10 minutos	1
Desnaturação	95°C	1 minuto	
Annealing	58°C	45 segundos	40
Extensão	72°C	45 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1

Este procedimento realizou-se para obter cada um dos produtos de PCR definidos neste estudo (Tabela 1).

1.4.2.4. Electroforese em Gel de Agarose

1.4.2.4.1. Preparação do Tampão de corrida

O tampão de corrida utilizado foi o tampão TAE 1x.

1.4.2.4.2. Preparação do gel de agarose a 1%

O gel foi preparado com 1 gr de agarose e 100mL de tampão TAE 1x. A mistura foi aquecida no micro-ondas, com agitação frequente, até à completa dissolução da agarose (com atenção para a mistura não ferver dentro do micro-ondas e verter).

Depois de arrefecer ligeiramente, o gel foi adicionado com 10µL de brometo de etídio. Trata-se de um reagente com propriedades cancerígenas, exigindo muito cuidado na manipulação. O brometo de etídio vai ligar-se à cadeia de DNA, emitindo fluorescência à incidência de Raios Ultra-Violetas.

Colocou-se o tabuleiro na tina de electroforese no respetivo suporte de preparação do gel. Colocaram-se os pentes necessários, em posição conveniente no tabuleiro para um correto posicionamento dos poços, verificando-se a distância à extremidade e à base do gel.

Verteu-se a mistura de agarose no tabuleiro, eliminando as bolhas de ar que se tinham formado e deixou-se solidificar à temperatura ambiente.

Depois de finalizada a polimerização do gel, retirou-se lentamente o pente para não danificar os poços.

Colocou-se o tabuleiro na tina de electroforese, deixando o gel completamente submerso e com os poços do lado do eléctrodo negativo.

1.4.2.4.3. Preparação das amostras

Aplicaram-se as amostras nos respetivos poços enchendo lentamente cada poço (com o cuidado de não deixar a amostra sair do poço para evitar a contaminação dos poços vizinhos).

Aplicou-se o marcador de DNA – NZYDNA Ladder V (o qual apresenta bandas entre 100 e 1000, de 100 em 100 Bp) no primeiro poço de cada pente.

Colocou-se a tampa da tina e verificou-se se as amostras estavam posicionadas do lado do pólo negativo (cátodo – eléctrodo de cor preta) e se a migração se fazia no sentido do pólo positivo (ânodo – eléctrodo de cor vermelha).

Ligaram-se os cabos à fonte de eletricidade, ligou-se a fonte e regulou-se para uma voltagem de 100V.

Verificou-se a libertação de bolhas dos eléctrodos devido à electrólise, e se, passados alguns minutos, a cor verde da NZYTaQ Green Master Mix começava a migrar no sentido correto.

1.4.2.4.4. Leitura da migração no gel de agarose

Após a migração conveniente (aproximadamente 25 min a 100V), desligou-se a corrente eléctrica da fonte, desligaram-se os cabos e retirou-se a tampa da tina.

Retirou-se o gel cuidadosamente para não partir, e examinou-se à radiação ultravioleta.

As radiações U.V. são extremamente perigosas, particularmente para os olhos, provocando lesões na retina. A exposição dos olhos a estas radiações deve ser evitada, usando sempre óculos protetores ou máscaras de material opaco aos U.V.

As bandas obtidas foram confirmadas, analisadas e comparadas com os padrões, para cada isolado. Os resultados foram fotografados para registo.

1.5. Avaliação das Especificidade e Sensibilidade da técnica de PCR Clássico na identificação de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A Especificidade da PCR para identificação de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi conferida pelos *primers* que apresentam 100% de homologia com o DNA 16s RNA da bactéria. Quanto à especificidade analítica, a mesma foi avaliada utilizando DNA de 2 estirpes distintas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium pseudotuberculosis* adquirido – DSMZ 20689 e *Corynebacterium pseudotuberculosis* – estirpe de campo) e DNA de outras bactérias comuns em patologia animal, como *Chlamydia* sp., *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Escherichia coli*, *Neospora caninum*, *Coxiella burnetti*, *Mycoplasma* sp., *Staphylococcus* sp., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, entre outros, selecionadas pela analogia patogénica (lesões piogénicas e produção de factores toxígenos) e espécie animal hospedeira (pequenos ruminantes) (Fig. 16).

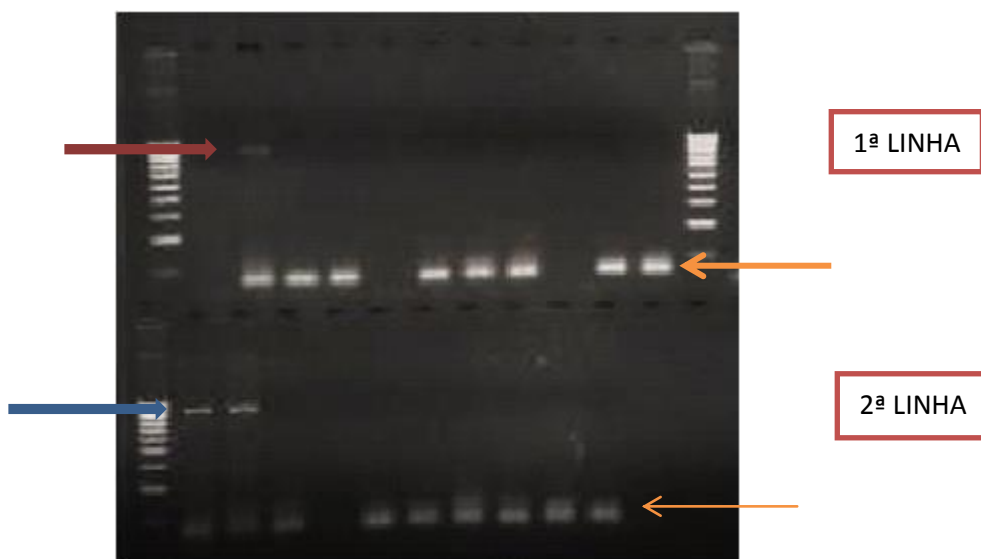


Figura 16: Imagem da electroforese para avaliação da Especificidade da prova de PCR para *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Legenda – pode visualizar-se, na 1ª linha, da esquerda para a direita, o Marcador de pesos moleculares, produtos de PCR comum para controlo negativo, e DNA de uma estirpe de campo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (seta a vermelho), bactérias e vários DNAs de outras bactérias (seta laranja, grossa). Na 2ª linha, da esquerda para a direita encontra-se: o Marcador de pesos moleculares, produtos de PCR com DNA de *Corynebacterium pseudotuberculosis* adquirido - DSMZ 20689 e *Corynebacterium pseudotuberculosis* – estirpe de campo (seta a azul), seguidos de produtos de PCR com DNA de outras bactérias (seta laranja, fina).

Os resultados observados na análise de PCR realizada para avaliação da especificidade da prova de PCR para *Corynebacterium pseudotuberculosis* permitem concluir tratar-se de uma prova com elevada especificidade, na medida em que não se detetou DNA de outras bactérias com analogia patogénica e de espécie hospedeira com o agente em estudo.

A Sensibilidade da PCR na detecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi avaliada utilizando diluições sucessivas de 25 ng de DNA padrão – estirpe adquirida DSMZ 20689 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, equivalente a aproximadamente $2,5 \times 10^7$ UFC (Unidades Formadoras de Colónias) de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Fig. 17).

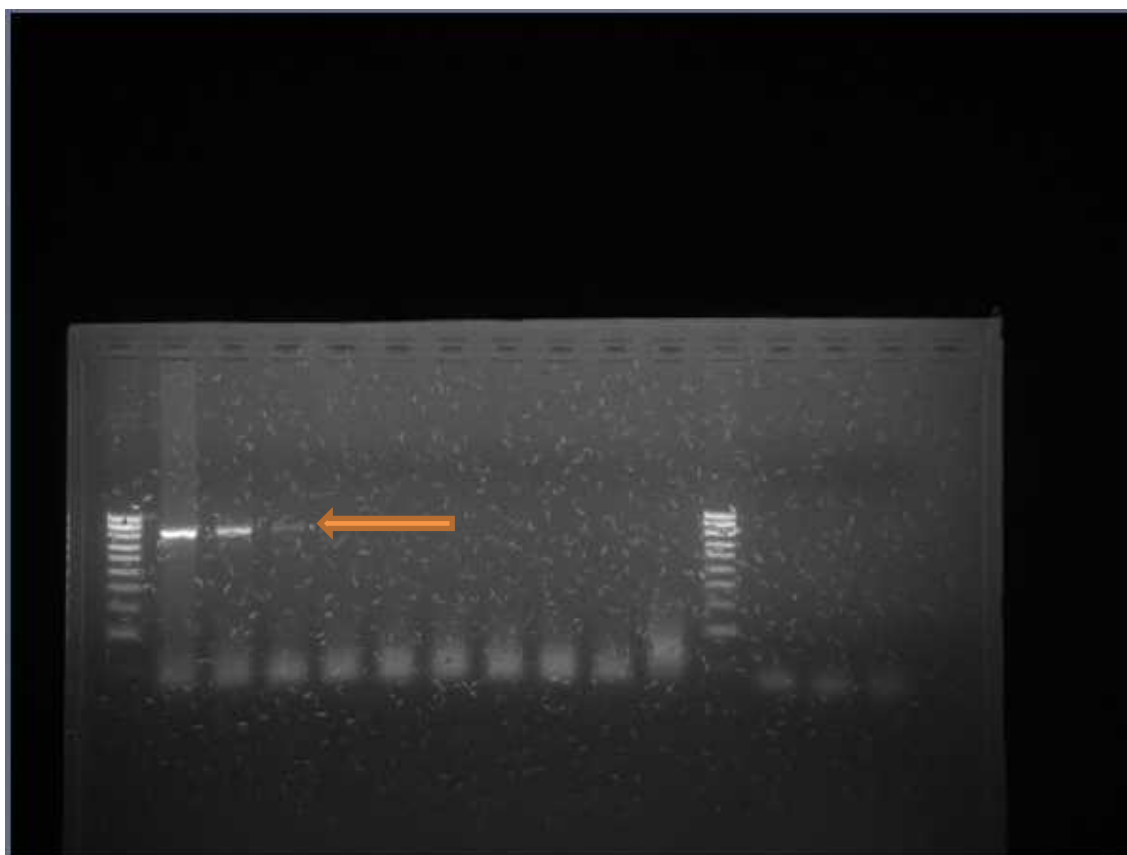


Figura 17: Imagem da electroforese para avaliação da Sensibilidade da prova de PCR para *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Legenda – apresentam-se, da esquerda para a direita, o Marcador de pesos moleculares, produto de PCR com 0,1 ng de DNA padrão, e diluições sucessivas 1:10, nos poços seguintes, observando-se reação até 0,001 ng de DNA/reação, diluição equivalente a 10^3 UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (seta a laranja)).

A prova de PCR realizada com diluições sucessivas (1:10) de 25 ng de DNA padrão – estirpe DSMZ 20689 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, demonstrou que a PCR para identificação de *C. pseudotuberculosis* é uma prova com elevada sensibilidade, na medida em que permite identificar o agente etiológico numa diluição de 0,001ng de DNA, equivalente a 10^3 UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

1.6. Resultados do Estudo

No decorrer deste estudo testaram-se 55 amostras patológicas para a deteção de dois tipos de segmentos de DNA genómico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (16S e PLD), em concentração normal e diluído (Tabela 1). Os resultados positivos a pelo menos um dos 4 produtos de PCR analisados, são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Resultados positivos obtidos na PCR I, PCR II, PCR III e PCR IV com concentração normal de DNA (1µL;2µL) e DNA diluído (1:10).

Nº de amostra	Resultado PCR I	Resultado PCR II	Resultado PCR III	Resultado PCR IV
	16S (Concentração DNA normal)	PLD (Concentração DNA normal)	16S (DNA diluído 1:10)	PLD (DNA diluído 1:10)
4	NEGATIVO		POSITIVO	NEGATIVO
32	NEGATIVO		POSITIVO	NEGATIVO
52	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
61	NEGATIVO		POSITIVO	NEGATIVO
62	NEGATIVO		POSITIVO	NEGATIVO
63	POSITIVO	NEGATIVO		NEGATIVO
66	POSITIVO	NEGATIVO		NEGATIVO
77	POSITIVO	POSITIVO		NEGATIVO
84	POSITIVO	POSITIVO		NEGATIVO
85	POSITIVO	POSITIVO		NEGATIVO

Como se pode verificar, das 55 amostras piogénicas analisadas, 10 foram positivas com pelo menos um dos “produtos” de PCR analisados neste estudo.

Das 10 amostras com resultados positivos, uma é proveniente da espécie caprina (amostra 84) e as restantes foram obtidas em ovinos (Tabela 5).

Dos 10 resultados positivos, 3 resultaram positivos no primeiro “produto” de PCR I (Fig. 18) e 4 apenas resultaram positivos no “produto” PCR III, onde se pesquisou o gene 16S para *C. pseudotuberculosis* com o DNA genómico diluído 1:10 (Fig. 19). Das 55 amostras patológicas analisadas 3 resultaram positivas para ambos os produtos de PCR I e II com detecção do gene 16s e PLD de *C. pseudotuberculosis* na concentração normal (Fig. 19).

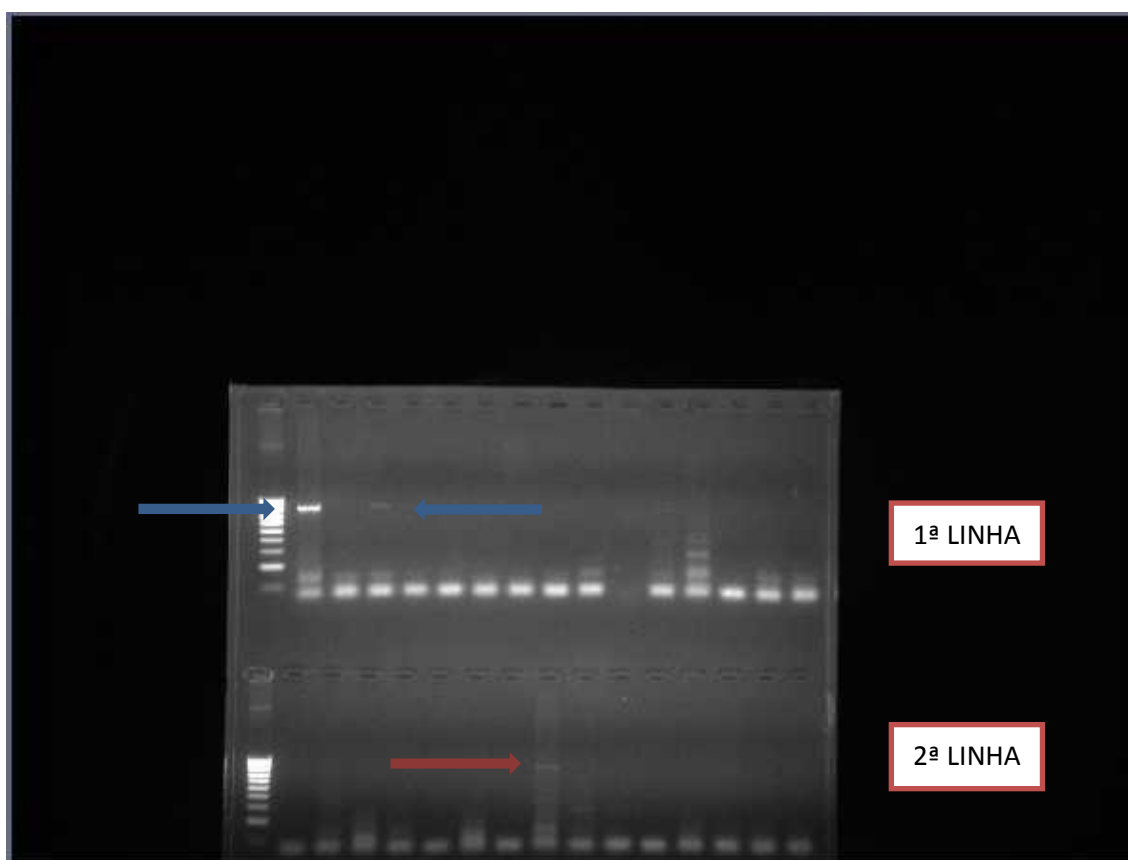


Figura 18: Imagem da Electroforese com os resultados para os produtos de PCR I e PCR III (Legenda – Na 1ª linha, da esquerda para a direita, o 1º poço tem o Marcador de pesos moleculares (bandas distribuídas de 100 em 100pb) e de seguida encontra-se os produtos de PCR para as amostras de 4 a 44, com as amostras 4 e 32 positivas (815pb) (setas a azul). Na 2ª linha encontra-se, da esquerda para a direita, o Marcador de pesos moleculares e os produtos de PCR das amostras 45 a 59 sequencialmente, com a amostra 52 positiva (815pb) (seta a vermelho)).

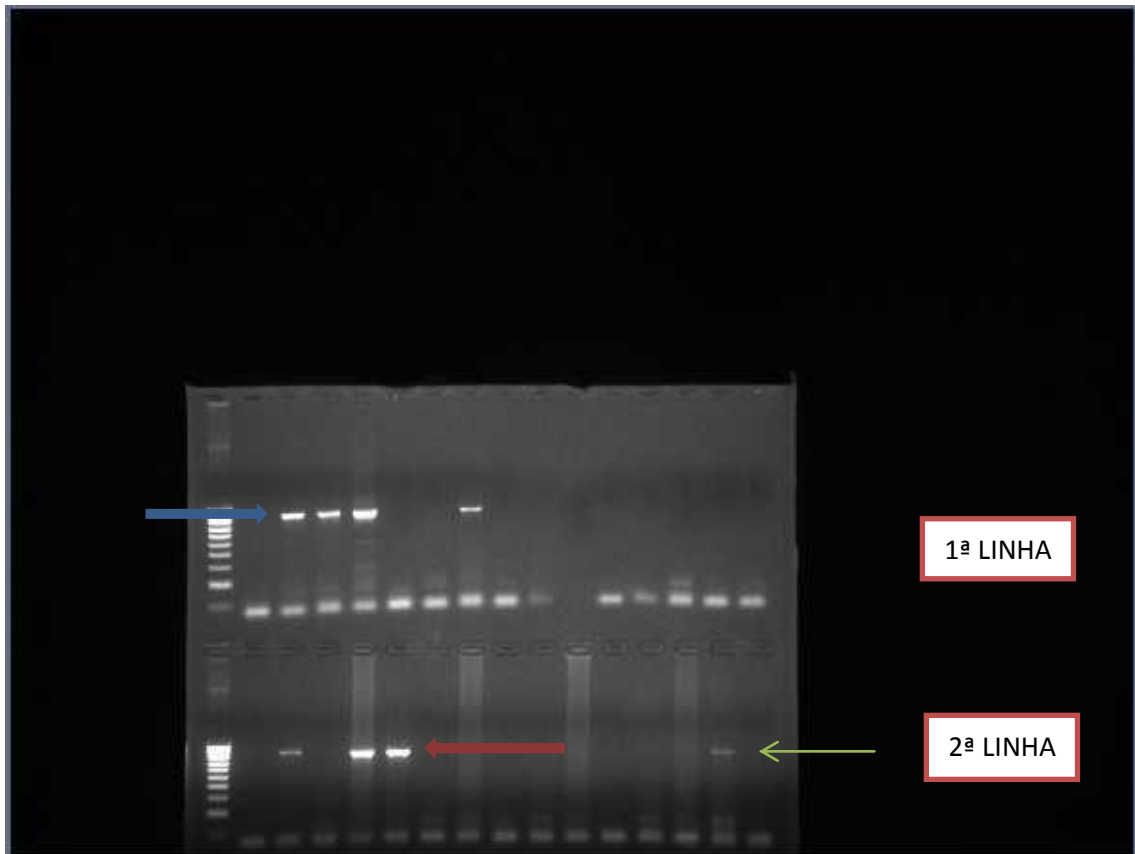


Figura 19: Imagem da electroforese com resultados do produto de PCR III, PCR II e PCR I (Legenda – Na 1ª linha, da esquerda para a direita, o 1º poço tem o Marcador de pesos moleculares e de seguida encontram-se os produtos de PCR das amostras 60 a 68, seguida de um poço vazio e os produtos de PCR das amostras 69 a 73, com as amostras 61,62,63 e 66 positivas (815pb) (seta a azul). Na 2ª linha encontram-se, da esquerda para a direita, o Marcador de pesos moleculares e os produtos de PCR das amostras 76 a 85, seguidos de 51II a 58II, Controlo Positivo (seta a verde) e Controlo Negativo, sendo positivas as amostras 77, 84 e 85 (815pb) (seta a vermelho)).

Sendo cada uma das amostras proveniente de uma exploração diferente estimamos, neste estudo, uma prevalência de Linfadenite Caseosa em rebanhos de **18%**, na região do Alto-Alentejo, Portugal.

Relativamente à zona/órgão afetado, apresenta-se na Tabela 5 a distribuição das lesões por órgão/zona, nas amostras recolhidas no presente estudo e com identificação do *C. pseudotuberculosis* pela técnica de PCR.

Tabela 5: Distribuição das amostras positivas a *C. pseudotuberculosis* por órgão/zona afetada e espécie animal de origem.

Nº de amostra	Órgão/Zona	Espécie
4	Abcesso Subcutâneo	ovino
32	Fígado	ovino
52	Pulmão	ovino
61	Pulmão	ovino
62	Fígado	ovino
63	Pulmão	ovino
66	Pulmão	ovino
77	Forma disseminada	ovino
84	Abcesso Subcutâneo	caprino
85	Abcesso Subcutâneo	ovino

Na forma visceral, o pulmão foi o órgão mais afetado pela presença de lesões piogranulomatosas causadas por *C. pseudotuberculosis* (40%), o fígado foi o segundo órgão mais afetado (20%) e a forma disseminada foi identificada apenas num animal. Os abscessos subcutâneos (forma cutânea ou externa da doença) foram observados em 30% dos casos com identificação do agente etiológico da LC (Fig. 20). No geral, a forma visceral foi a mais prevalente, com 70% dos resultados positivos a *C. pseudotuberculosis* na PCR em amostras obtidas de lesões internas.

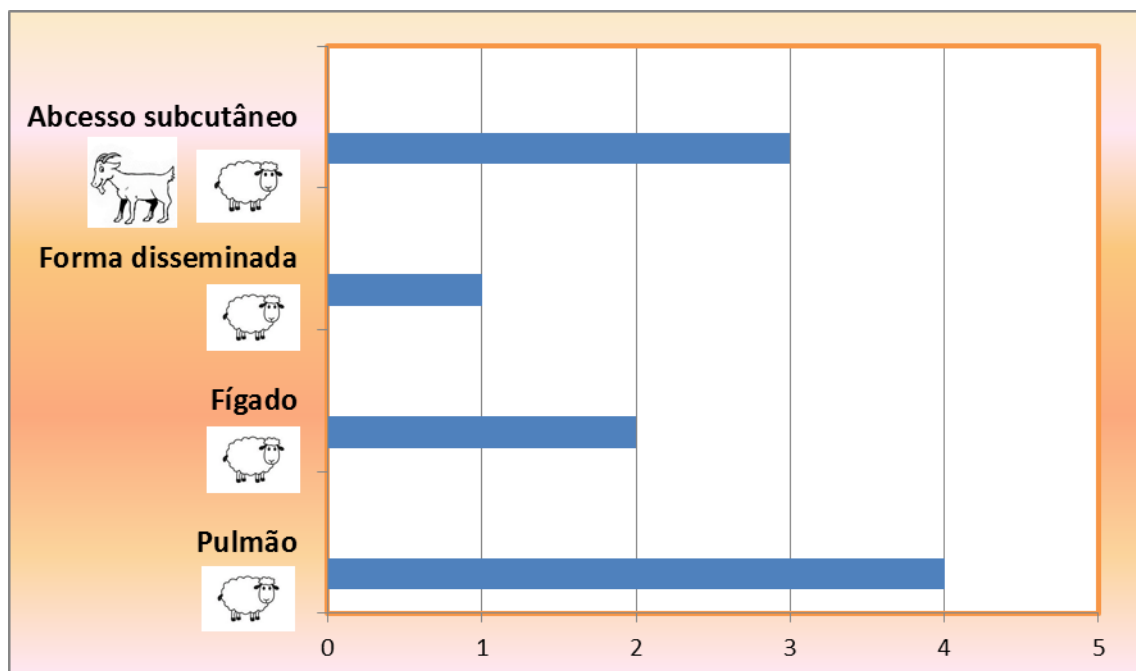


Figura 20: Gráfico representativo da localização das lesões causadas por *C. pseudotuberculosis* identificado por PCR.

A análise estatística dos resultados observados foi realizada recorrendo ao programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) e no teste de χ^2 a diferença encontrada entre espécies (ovino e caprino) para as lesões positivas ao PCR de *C. pseudotuberculosis* não é estatisticamente significativa ($p>0,05$) (Fig. 21).

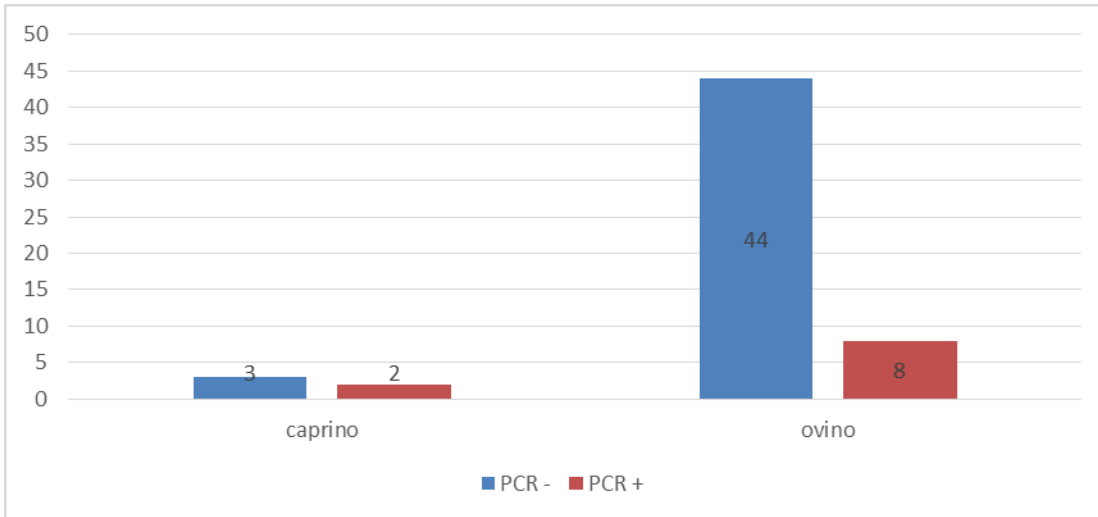


Figura 21: Gráfico representativo da distribuição das lesões positivas a PCR para *C. pseudotuberculosis*, por espécies (ovino e caprino).

Relativamente à localização das lesões, incluindo as lesões positivas e negativas no PCR para *C. pseudotuberculosis*, a distribuição avaliada também não se revelou estatisticamente significativa ($p>0,05$), mas pode observar-se na Fig. 22 que o pulmão é o órgão mais afetado por lesões com características piogénicas.

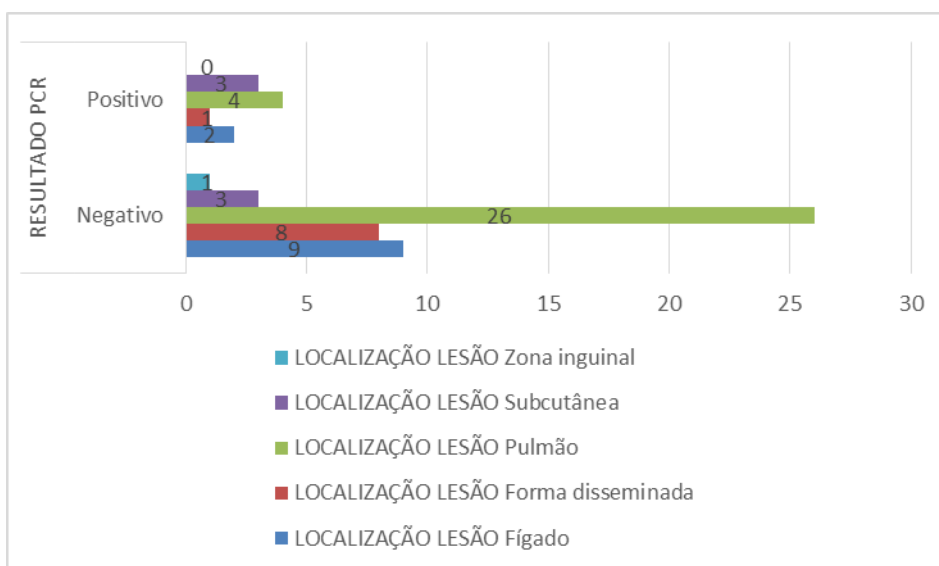


Figura 22: Gráfico representativo da localização das lesões.

Em contrapartida, quando avaliamos a distribuição das lesões piogranulomatosas rastreadas por espécie de pequenos ruminantes, ovino e caprino, encontramos uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) com a espécie ovino com maior frequência de lesões características de LC (Fig. 23).

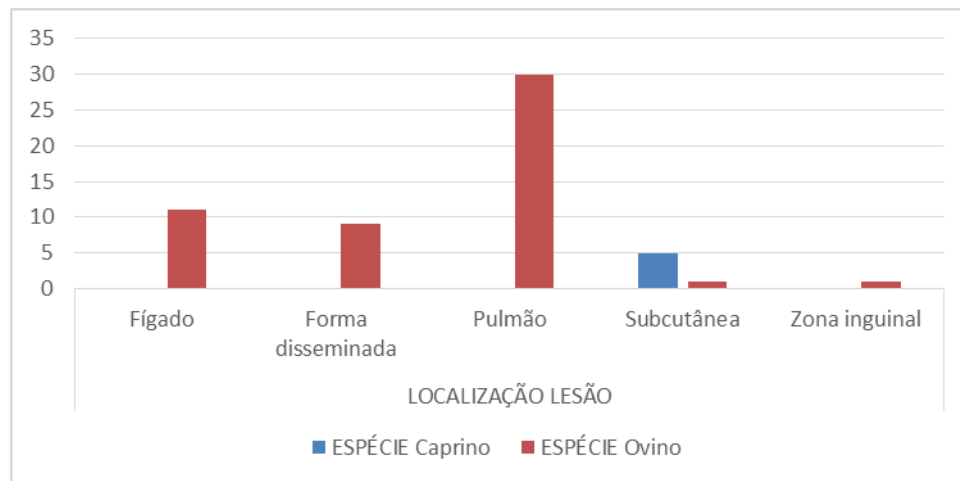


Figura 23: Gráfico representativo da distribuição das lesões piogranulomatosas rastreadas para PCR de *C. pseudotuberculosis* nas espécies ovino e caprino.

1.8. Discussão

O diagnóstico molecular não é uma técnica de análise de rotina no despiste de Linfadenite Caseosa, nem em Portugal nem em Espanha, principalmente pelo elevado custo das técnicas de PCR. No entanto, comparativamente aos outros métodos de diagnóstico disponíveis para esta afeção, a PCR revelou ser uma prova sensível e específica, permitindo identificar o agente etiológico a partir de uma grande variedade de amostras patológicas.

O diagnóstico definitivo desta afeção baseia-se principalmente na cultura e na identificação do agente, sendo possível isolar *C. pseudotuberculosis* a partir de todo o tipo de lesões, no entanto, o número de bactérias viáveis presentes num abscesso crónico pode ser baixo e ocasionalmente podem ser detetadas lesões estéreis (Baird & Fontaine, 2007).

A grande componente piogénica das amostras patológicas dificulta o processo de extração e purificação do DNA genómico para a deteção e isolamento de *C. pseudotuberculosis*. Como tal, no diagnóstico da LC, justifica-se a realização da prova de PCR pesquisando mais do que um fragmento de DNA genómico (16s RNA e PLD) de modo a detetar o maior número possível de animais positivos.

O procedimento de diluição das amostras de DNA, realizado nesta investigação, teve também o objetivo de identificar o maior número possível de amostras positivas, na medida em que a elevada concentração de detritos celulares dificulta a sequenciação do DNA genómico. De facto verificou-se nos resultados apresentados, que 4 das amostras resultaram positivas apenas no “produto” PCR III, onde se pesquisou o gene 16S para *C. pseudotuberculosis* com o DNA genómico diluído 1:10 (Fig. 19).

O facto de no presente estudo se terem incluído amostras de lesões superficiais e viscerais, agudas e crónicas, a maior parte delas com forte componente purulento, poderá explicar a dificuldade na digestão e extração do DNA genómico do agente. Admite-se ainda a possibilidade de resultados falsos negativos, no caso de lesões de LC estéreis, sem a presença do agente bacteriano e do seu DNA. Pelo

apresentado podemos estar na presença de um resultado subestimado de prevalência de LC.

No decorrer do diagnóstico de um surto de LC na forma visceral-mamária (Fig. 4, pág. 11), a autora constatou a presença de lesões piogénicas recolhidas de afeções agudas da glândula mamária, que resultaram negativas na cultura microbiológica mas que na PCR clássica, para pesquisa de uma série de agentes etiológicos de mamite, permitiram identificar *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Neste caso, a técnica de PCR clássica para a pesquisa de *C. pseudotuberculosis*, sendo uma prova altamente sensível permitiu detetar a presença do agente etiológico da LC em amostras com pouca carga bacteriana.

Num trabalho desenvolvido no Canadá com enfoque na LC (Debien, E., 2013), foi possível identificar *Corynebacterium pseudotuberculosis* (por isolamento bacteriológico) em 37 de 54 animais com abscessos. Nos 17 animais negativos para *C. pseudotuberculosis*, isolou-se *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes* em 6 casos, *Pasteurella multocida* num caso e em 10 casos não foi possível nenhum isolamento bacteriológico. Este facto é consistente com a possibilidade de existirem abscessos “estéreis” ou cargas microbiológicas muito baixas.

O presente estudo permitiu avaliar a especificidade e sensibilidade da prova de PCR clássico para *C. pseudotuberculosis*. Não foi possível obter um valor relativo de especificidade nem sensibilidade, na medida em que não se realizaram, para as amostras analisadas, provas comparativas que permitissem detetar falsos positivos ou falsos negativos respetivamente, mas verificou-se uma especificidade e sensibilidade analíticas elevadas para a PCR de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

A PCR mostrou ser uma excelente prova para o diagnóstico definitivo e diferencial da LC, mas pouco prática em estudos de prevalência, na medida em que a sua aplicação num número grande de amostras é pouco viável. Além disso, não é a técnica de eleição em programas de controlo e erradicação da LC, uma vez que não permite a deteção *in vivo* de portadores assintomáticos, a principal causa de dispersão desta doença num efetivo.

No presente trabalho, a prevalência de explorações afetadas com LC (18%) foi inferior à obtida noutros estudos de prevalência. Este facto está possivelmente

associado à natureza crónica e purulenta de algumas das amostras, podendo ainda muitas corresponder a lesões de LC sem a presença do agente etiológico, nem do seu DNA e estarmos assim a subestimar a prevalência real da LC.

Num estudo realizado recentemente na Coreia (Jung et al., 2015), no qual foram testadas 466 cabras autóctones coreanas, 34 (7,3%) foram presuntivamente diagnosticadas com LC. *C. pseudotuberculosis* foi isolado em 24 destas cabras (70,6% das cabras com lesões superficiais de LC), tendo a infecção sido confirmada por PCR.

Na província de Tanta no Egito (Al-Gaabary et al., 2010), num estudo levado a cabo em matadouro, entre os 962 pequenos ruminantes abatidos, 259 estavam severamente afetados com LC, representando uma prevalência de 26,92%: *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi isolado (análise bacteriológica) em 241 dos casos (25,05%).

O presente trabalho realizado em 55 explorações de pequenos ruminantes permitiu determinar uma prevalência de LC de 18% (10/55) através da técnica de PCR Clássico.

Um estudo de prevalência de LC, realizado na província do Quebeque, Canadá (Debien et al., 2013), em 13 efetivos de caprinos, obteve um resultado de 24,3%, apenas por uma observação grosseira de abscessos em animais necropsiados e sem identificação do agente causal. No mesmo estudo (Debien et al., 2013) destinado a determinar as principais causas de morte e refugo em caprinos, observou-se que, apesar de a LC se ter diagnosticado em 24,3% dos casos, não é uma causa importante de refugo ou mortalidade (representando apenas 3,9%), quando comparado a outras doenças como a Enterotoxémia por *Clostridium perfringens* tipo D (17,1%), Pneumonia (13,8%), Paratuberculose (10,5%), Listeriose (6,6%), Toxémia de gestação (5,3%) e Artrite Encefalite Caprina (AEC) (4,6%), mas foi a doença mais frequentemente diagnosticada neste trabalho, pois onze das 13 explorações participantes (84,6%) tinham pelo menos um animal afetado por esta doença.

No capítulo 2 apresenta-se uma tabela que resume as prevalências estudadas e obtidas nos últimos 30 anos, para a LC em diferentes regiões do mundo.

O facto de o maior número de amostras patológicas ter sido obtido na espécie ovina é consistente com os dados que indicam que a LC é mais prevalente em ovinos do que em caprinos e também porque, na região em estudo, há um predomínio de explorações de ovinos, existindo um maior número total de ovelhas (250 000). Ainda assim, uma das identificações positiva a PCR surgiu numa amostra proveniente da espécie caprina. Alguns autores referem que os caprinos são mais comumente afetados por abscessos externos, enquanto a forma visceral de LC parece ser mais frequente em ovelhas (Williamson, L. H., 2001 citado por Smith, 2015).

No que diz respeito à localização das lesões, o pulmão foi o órgão mais afetado na forma visceral da doença (40%), à semelhança do que se encontra descrito na literatura (Roberson, J.R. & Baird, A.N., Pugh, D.G., 2012 citados por Smith, 2015; Malone, 2006). Esta forma de apresentação (visceral) da doença foi a mais frequente, com a identificação de *C. pseudotuberculosis* numa maior percentagem em lesões viscerais (70%), em comparação com a forma cutânea ou superficial (30% de abscessos subcutâneos). Realidade que vai de encontro ao descrito noutros estudos desenvolvidos pelo mundo fora e que comprovam que a presença de abscessos externos é apenas a ponta do iceberg e o problema da LC na forma visceral é superior ao que se imagina. Pequenos ruminantes afetados pela forma visceral da doença raramente apresentam abscessos em linfonodos externos (Smith M. C. & Sherman, D. M., 2009 citados por Smith, 2015), facto que reforça a importância da deteção de animais afetados pela forma visceral.

CAPÍTULO 2: Perspetiva mundial

2.1. Evolução da Linfadenite Caseosa na Europa e no Mundo

Vários estudos sobre o diagnóstico e controlo da Pseudotuberculose foram desenvolvidos em diferentes partes do globo; nos últimos 10 anos tem-se assistido a um incremento do investimento por parte das autoridades oficiais de países desenvolvidos em programas de controlo e erradicação da doença, principalmente em países onde a produção de ovinos e caprinos é importante para a economia do país.

A pesquisa realizada mostra um aumento dos dados de prevalência registados nos diferentes estudos (Tabela 6). Mesmo considerando que os resultados foram obtidos com base em diferentes técnicas de diagnóstico, e que não é possível uma avaliação real da evolução da prevalência da LC ao longo dos anos, pode verificar-se que a prevalência da LC tem vindo a aumentar tendencialmente até aos dias de hoje.

Os resultados observados sugerem que a LC se está a espalhar e a aumentar mundialmente nos efetivos de pequenos ruminantes, sendo urgente a implementação de medidas de controlo.

Num estudo realizado no Quebeque – Canadá (Arsenault et al., 2003), a prevalência de animais com abscessos causados por outros agentes e com abscessos originados pelo *C. pseudotuberculosis* foi de 36 e 21%, respetivamente. A prevalência identificada neste estudo é inferior às estimadas noutros países.

Nos Estados Unidos, a prevalência da LC (com base no exame direto) foi de 42,4% (Stoops et al., 1984 citado por Arsenault et al., 2003).

Na Austrália, a prevalência da LC foi de 41,8% em carneiros e 53,7% em ovelhas (também com base no exame direto) (Batey, 1986 citado por Arsenault et al., 2003).

Uma vez que nestes estudos não foram feitas culturas dos abscessos, a prevalência pode ter sido sobrestimada.

Na Escócia, evidências recentes sugerem que a prevalência da LC está a aumentar nos rebanhos de ovelhas e cabras (Connor et al., 2000).

Devido à grande dispersão da LC na Irlanda, realizou-se uma investigação em quatro explorações de ovinos com casos clínicos de doença (Malone et al., 2006). Este estudo revelou uma prevalência de 40,4% (133/329) para a LC, com confirmação dos positivos por cultura bacteriológica.

Na tabela 6 resumem-se os dados de prevalência da LC nos últimos 30 anos, especificando a técnica de diagnóstico utilizada, podendo observar-se um aumento da prevalência estudada ao longo dos anos.

Tabela 6: Tabela resumo dos dados de prevalência da Linfadenite Caseosa (LC) na Europa e no Mundo

País/Região	Estudo/Ano/Técnica analítica	Espécie	Valor estimado de Prevalência de LC
Portugal/Alto-Alentejo	Costa, Lina/2016/PCR	Ovino e caprino	18%
Etiópia	Abebe, D. et al./2015/Isolamento microbiológico	Ovino e Caprino	72%
Coreia	Jung, B. Y. et al./2015/Serologia	Caprino	57,3%
Algeria	Chikhaoui, Mira et al./2013/Isolamento microbiológico	Ovino	53,6%
Espanha/Andaluzía	Gómez-Gáscon, Lidia et al./2013/Isolamento microbiológico	Ovino e Caprino	38%
Canadá/Quebeque	Debien, E. et al./2013/Avaliação grosseira de abscessos	Caprino	24,3%
Austrália	Windsor P. A./2011/Avaliação em matadouro e inquéritos aos produtores	Ovino	26%
Egito	Al-Gaabary, Magdy H. et al./2010/Avaliação grosseira de abscessos e Análise bacteriológica	Ovino e Caprino	26,92% e 25,05%
Irlanda	Malone, Frank E. et al./2006/Isolamento microbiológico	Ovino	40,4%
Canadá/Quebeque	Arsenault et al./2003/Isolamento microbiológico	Ovino	21%
Turquia	Çetinkaya et al./2002/Isolamento e PCR	Caprino e Ovino	16 – 63%
Canadá/Alberta	Stanford et al./1998/Serologia	Ovino	23%
Japão	Zasshi, Nihon J. et al./1989/Serologia	Ovino	39,3%
Brasil/Nordeste	Brown et al. /1987/Avaliação grosseira de abscessos	Caprino	14%

O valor estimado para a prevalência desta afeção varia de região para região e também segundo o método de diagnóstico utilizado para deteção dos animais afetados (deteção grosseira dos abscessos, isolamento bacteriológico do agente *Corynebacterium pseudotuberculosis*, serologia ou PCR).

O impacto negativo da LC na rejeição de carcaças em matadouro parece estar associado apenas com a presença de abscessos (e não com a etiologia do abscesso). Na província de Quebeque, Canadá (Arsenault et al., 2003), as normas governamentais de inspeção da carne definem que a presença de abscessos obriga ao refugo da carcaça, se são múltiplos ou se estão associados a um efeito sistémico, de outro modo, só a área afetada é rejeitada e a carcaça aproveitada.

No mesmo estudo conclui-se: o facto de que muitos dos animais afetados apresentarem abscessos no fígado, cabeça e/ou pescoço, aumentava significativamente a proporção de carcaças com refugo de órgãos e peças. O impacto no refugo deriva da presença de abscessos, qualquer que seja a sua etiologia. No entanto, é importante referir que a maioria dos abscessos identificados neste estudo foram positivos a *C. pseudotuberculosis*.

Em Portugal, o regulamento de inspeção sanitária em vigor (Regulamento (CE) Nº 854/2004) prevê que qualquer parte da carcaça com a presença de abscesso ou processo purulento seja rejeitada, e tratando-se de um processo piogénico disseminado ou que atinja mais do que um órgão ou tecido, se proceda à reprovação total da carcaça. Um trabalho de dissertação de mestrado desenvolvido num importante matadouro português (Oviger – Alcains: abate de aproximadamente 100 000 ovinos por ano) revela que os abscessos e as pleuropneumonias purulentas são a 2ª principal causa de rejeição total em ovinos adultos e a principal causa de reprovação total nas carcaças de ovinos jovens (D’Avelar, 2011).

A LC é uma doença frequente na América do Norte (Debien et al., 2013) a qual afeta ovinos e caprinos e conduz à formação de abscessos em gânglios linfáticos, na pele e em órgãos internos. No Canadá, a vacinação contra a LC em caprinos finalizou em 2006, após a retirada da única vacina aprovada para esta espécie. A vacinação *off-label* de cabras de leite com a vacina para ovelhas não provou ser eficaz e é desaconselhada pelo fabricante por questões de segurança. Como consequência da retirada da vacina, vários produtores de cabras já reportaram um aumento no desenvolvimento de abscessos e subsequente refugo precoce de animais na província do Quebeque, Canadá (Debien et al., 2013).

O aparecimento de casos de LC noutras espécies que não os pequenos ruminantes, como bovinos e cavalos é cada vez mais frequente, não só porque o diagnóstico é realizado de forma mais assertiva nos casos de doença e suspeita clínica, mas porque o agente etiológico se está a dispersar efetivamente no meio ambiente e a ser transmitido a outras espécies, com potencial patogénico. Num estudo realizado no estado do Kansas, Estados Unidos da América (Boysen et al., 2015), observou-se um

surto sem precedentes, de infecção com *C. pseudotuberculosis* em cavalos de todas as idades, sexo e raça, no outono de 2012. Neste estudo foram analisados os principais factores de risco ambientais e climáticos e verificou-se que a doença se despoletou em condições climáticas de calor e seca e sob condições ambientais de fraca humidade do solo e fragmentação de pastagens (finais de verão até finais de outono, com um pico no mês de novembro), propícias ao desenvolvimento do agente etiológico na região em estudo.

Em Portugal, o primeiro caso de LC em suínos de raça Porco Preto Alentejano foi reportado em 2014 (Oliveira et al., 2014), com a caracterização fenotípica e genotípica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a partir dos isolados clínicos de LC. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a LC afectou 10% dos animais das 2 explorações em estudo (com cerca de 600 porcos cada) e que *C. pseudotuberculosis* é a principal espécie bacteriana responsável pelo desenvolvimento da LC em suínos de raça Porco Preto Alentejano, na medida em que foi possível isolar o agente em todas as amostras recolhidas, em cultura pura.

Este e outros trabalhos vêm demonstrar que a LC é uma doença que, apesar de reconhecida há mais de cem anos, está longe de estar controlada. A possibilidade de disseminação cruzada entre hospedeiros animais alerta para a importância de implementação de medidas de controlo e manejo sanitário que controlem a infecção e evitem a sua dispersão.

2.2. Novos Estudos e Estratégias de Erradicação

A dispersão da LC em efetivos de ovinos e caprinos numa região portuguesa de elevada produção pecuária pode revelar-se um problema sanitário grave, não só pelos prejuízos económicos diretamente imputados à infeção como também pela ausência de certificação de explorações nacionais como livres da doença, impossibilitando a abertura de mercados internacionais para a produção de pequenos ruminantes.

Novos estudos de prevalência da LC em animais e efetivos devem ser conduzidos na região e no país, recorrendo a técnicas de diagnóstico serológico, que permitam a deteção de animais assintomáticos, uma avaliação do real prejuízo causado pela presença de infeção nas explorações, nomeadamente do impacto económico da afeção e das suas formas subclínicas. Só com estes dados se possibilitará a avaliação da necessidade de implementação de medidas de controlo e erradicação da doença, tal como já se realiza noutros pontos do globo.

Técnicas de diagnóstico molecular podem e devem realizar-se para um diagnóstico etiológico definitivo e identificação do agente, mas em programas de controlo da doença este não é o método de diagnóstico indicado. No entanto, estudos genéticos da resistência racial a doenças infecciosas como a LC, que permitam a identificação de marcadores moleculares nas raças autóctones associados a esta resistência, podem ser implantados em programas de controlo e permitirão a seleção assistida por marcadores, com a criação de animais geneticamente selecionados para reposição.

As técnicas genéticas são a ferramenta do futuro e torna-se necessária a otimização destas técnicas não só na área do diagnóstico e genotipagem de agentes etiológicos presentes nas nossas explorações, como também para identificação de marcadores genéticos que nos permitam trabalhar as nossas raças.

Sendo a LC uma doença que afeta outros animais como os ruminantes e suínos silvestres (cervo, veado, javali,...) são necessários estudos sobre a interface e coabitação dos pequenos ruminantes com espécies silvestres, realidade que se verifica em Portugal e Espanha e que altera o panorama de distribuição de doenças como a LC.

São necessários estudos sobre a implicação das alterações climáticas na ecologia e evolução de *C. pseudotuberculosis* e outras bactérias veiculadas pelo solo (*soil-borne diseases*) similares e com importância em saúde animal e na saúde pública.

A erradicação de uma doença com as características da LC é um desafio que envolve a tomada de medidas rigorosas e a vários níveis. Os fatores que tornam a sua erradicação um desafio incluem, a fraca resposta do agente à terapia antibiótica, a sua grande capacidade de sobrevivência no meio ambiente e a dificuldade de deteção de animais infetados, principais responsáveis pela manutenção da doença num rebanho, como fonte de infecção.

O controlo da LC depende em muitos países da vacinação, com a notável exceção do Reino Unido (Windsor, 2011). A vacinação contra *C. pseudotuberculosis* pode reduzir a doença entre 60 a 95% (Eggleton et al, 1991; Paton et al., 1995 citados por Mendonça, 2012) e vários ensaios experimentais demonstraram que, após a inoculação em animais vacinados, há uma diminuição na ocorrência de ambas as formas internas e externas de abscessos por LC (Piontkowsky, M. D. & Shivers, D. W., 1998 citados por Smith, 2015).

A vacinação para *Corynebacterium pseudotuberculosis* tem sido praticada recorrendo a uma grande variedade de tipos vacinais; todas as vacinas comerciais disponíveis nos Estados Unidos são toxóides bacterianos e a recomendação é que se faça a vacinação opcional, dependendo da história da exploração (Smith, 2015).

Em Portugal não existe nenhuma vacina comercializada para a LC. A utilização de vacinas de rebanho, produzidas a partir de isolados do agente, parece ser eficaz no controlo de surtos da forma visceral de LC e na redução da incidência de doença nos efetivos vacinados (Costa, 2014).

Baseado nestes e noutros dados, a vacinação pode ser importante em alguns efetivos para diminuir a prevalência da LC.

A LC é o exemplo de uma doença de rebanho cujo controlo é possível através da implementação de um conjunto de medidas de biossegurança e boas práticas pecuárias, sendo evidente que a sua prevalência e propagação aumentam na presença

de factores de risco como a conspurcação do solo, a conspurcação de tanques banheiros e de materiais de tosquia e tatuagem, introdução de novos animais na exploração e a não observação de regras básicas de manejo.

CONCLUSÃO

Por quanto foi possível pesquisar pela autora, este foi o primeiro estudo de prevalência de Linfadenite Caseosa em efetivos de pequenos ruminantes, realizado em Portugal. O único trabalho publicado até à data (Boinas, Mendes & Pateira, 2000) foi realizado num número muito reduzido de animais e efetivos.

A elevada prevalência da infeção (18%) encontrada no presente estudo nas explorações de pequenos ruminantes, numa região de Portugal onde a produção de ovinos e caprinos é de grande expressão na economia loco-regional, justifica a implementação de medidas higio-sanitárias e programas apropriados de controlo, de forma a prevenir a transmissão de *C. pseudotuberculosis*.

Quando metade do efetivo nacional de pequenos ruminantes (46%) se encontra no Alentejo e a produção anual de carne de borrego e de queijo de ovelha certificados detém a maior representatividade no Alto-Alentejo, região onde se desenvolveu este estudo, podemos concluir que a existência de uma doença com as características insidiosas e de carácter crónico como a LC, numa prevalência elevada nestes efetivos, exige uma preocupação acrescida por parte das entidades sanitárias e de centros de investigação na área da sanidade animal, na tentativa de estimar a sua taxa de morbilidade, taxa de mortalidade e real impacto económico no país e nesta região.

A realização deste estudo em amostras recolhidas em matadouro permitiu uma avaliação real da presença de LC nas explorações, na medida em que possibilitou a deteção de animais assintomáticos. Os registos obtidos nos matadouros regionais são de enorme importância no estudo da epidemiologia das doenças animais e devem ser utilizados com o intuito de promover a saúde animal e proteger a saúde pública. Devem ser realizados estudos em matadouro para esta e outras doenças de ruminantes, uma vez que permitem uma avaliação real da presença de doenças infeto-contagiosas e parasitárias em animais de produção para consumo humano, a sua caracterização e etiologia, impacto económico na produção de carne e na rentabilidade das explorações.

O presente estudo mostrou algumas limitações, nomeadamente o facto de não ter sido possível identificar outros agentes etiológicos nas lesões piogénicas nas amostras reunidas, o que aumentaria o conhecimento sobre o diagnóstico diferencial da LC.

Outros estudos de prevalência e do impacto económico deverão ser conduzidos, de forma a aferir a importância desta afeção em Portugal e no Alentejo.

A Pseudotuberculose é uma doença insidiosa, o que em sentido estrito significa que inicialmente não aparenta gravidade, mas com a evolução da enfermidade e o desenvolvimento de sinais clínicos se torna altamente perigosa. Esta frase reflete exatamente o que se passa num efetivo de pequenos ruminantes infetado com LC: os sinais clínicos e suas consequências não são inicialmente evidentes para o produtor, mas a quebra de rentabilidade aumenta com o nível de infeção e a presença de animais infetados aumenta a probabilidade de a doença evoluir para a forma visceral, com surtos ou com quadros clínicos graves de mastite, pneumonia, infertilidade, abortos,... aumentando também a possibilidade de transmissão a animais sãos.

Apesar da LC não ser das principais causas de morte e refugo de animais nas explorações de pequenos ruminantes, o facto de ser uma doença crónica, transmissível a outros animais e ao homem e responsável por quebras económicas graves e nem sempre perceptíveis ao produtor, justifica um investimento no seu diagnóstico e controlo e uma maior sensibilização de médicos veterinários e produtores para as vias de contágio e medidas de prevenção. Quando estabelecida, a doença é de difícil erradicação, não só porque a resposta à terapêutica antibiótica não é efetiva mas também porque a deteção de animais infetados é difícil. Cabe-nos a todos, como intervenientes sanitários, alertar para a sua perigosidade e características epidemiológicas e atuar instituindo planos profiláticos que contemplem a prevenção e o controlo desta afeção.

Esta doença está a disseminar-se na Europa e no mundo sendo cada vez mais os casos de LC reportados noutros animais (domésticos e selvagens) e no Homem. Paralelamente, tem-se assistido a um aumento da sua prevalência em efetivos de pequenos ruminantes. O que leva a concluir que não tem sido dada a importância desejável a esta afeção pelas autoridades competentes, médicos veterinários e

produtores pecuários, no sentido de implementar medidas higio-sanitárias e programas de diagnóstico e controlo que permitam trabalhar com efetivos livres de infeção.

Conclui-se este trabalho com a compilação de um conjunto de medidas de biossegurança e de manejo dos animais, unido a um correto guia de boas práticas pecuárias que inclui, entre outras, as seguintes recomendações (Gómez-Gascón et al., 2013, Ermini & Antenucci, 2014):

- Controlo nas trocas comerciais, evitando a introdução de animais portadores na exploração. Recomenda-se o refugo e a não aquisição de animais com abcessos externos ou cicatrizes que denotem a presença de LC.
- Realização de um período de quarentena (mínimo 15 dias) antes da introdução de novos animais num rebanho. O período de incubação da LC é longo podendo variar entre 2 a 6 semanas (Zarraga et al., 2006 citado por Mendonça, 2012).
- Redução da contaminação ambiental sempre que possível, mantendo uma adequada higiene nos equipamentos e nas instalações.
- Especial atenção e cuidados nas práticas de manejo, como a identificação animal (colocação de marcas auriculares e tatuagens), tosquiagens, castrações, corte de caudas, tratamentos com recurso a injetáveis, garantindo que o material utilizado é sujeito a uma limpeza e desinfeção adequadas.
- Desinfeção do cordão umbilical dos recém-nascidos, o mais cedo possível após o nascimento, com uma solução iodada.
- Evitar as atividades que provoquem ferimentos no animal ou desinfetar adequadamente as lesões originadas.
- Os animais infetados devem ser separados do rebanho o mais rápido possível após a sua deteção.
- O tratamento dos abcessos é uma opção, mas qualquer animal que apresente recidivas é considerado um portador crónico e deve ser retirado do rebanho. Esta medida recomenda-se apenas para animais com elevado valor genético. Nunca deixar que um abcesso drene por si só, já que contaminará o ambiente, sendo preferível intervir antes.

- Realizar um adequado programa de reposição, praticando refugos prematuros no caso de elevada prevalência da infecção na exploração.
- Realização da ordenha em local limpo e desinfetado com produtos à base de cloro ou similares.
- Lavar as mãos convenientemente antes e depois da ordenha.
- No caso da ordenha mecânica lavar as tetinas entre ordenhas.
- No final da ordenha, aplicar um desinfetante iodado ou similar no teto.
- Todos os animais com lesões na mama (crostas, pápulas, abscessos...) devem ser identificados, separados, ordenhados em último, eventualmente à mão e, se necessário e recomendável, colocados em tratamento.
- Na ordenha mecânica, controlar periodicamente o bom funcionamento da máquina e do sistema de vácuo, e substituir todas as partes de borracha pelo menos uma vez por ano.
- Praticar a terapia preventiva de mastites no período seco.
- Por último, realizar análises bacteriológicas regulares ao leite (individual e coletivo) para identificação dos principais agentes causadores de mastites.

As medidas aqui apresentadas podem ser aplicadas nesta e noutras doenças de rebanho, sendo o manejo um ponto chave em qualquer plano profilático instituído.

Revela-se de enorme importância o conhecimento do estado sanitário dos nossos efetivos bem como das características epidemiológicas das doenças que os afetam. Seria de grande interesse para a pecuária regional e nacional, a existência de uma rede de vigilância epidemiológica que permitisse aos médicos veterinários e entidades sanitárias intervenientes aceder a informações atualizadas sobre: prevalência, surtos, distribuição e evolução desta e de outras doenças infeto-contagiosas e parasitárias endémicas e emergentes nas espécies de interesse pecuário.

BIBLIOGRAFIA

Abebe, D. & Tessema, T., (2015). Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. *Letters in Applied Microbiology*, vol (61), pp. 469-476.

Al-Gaabary, M., Osman, S., Ahmed, M. y Oreiby, A. (2010). Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. *Small Ruminant Research*, vol (94), pp. 117-124.

Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J. y Boisclair, J. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, vol (59), pp. 67-81.

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

Barba, M., Stewart, A., Passler, T., Wooldridge, A., Santen, E. y Chamorro, M. (2015). Experimental Transmission of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar *equi* in Horses by House Flies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* , vol (29), pp. 636-643.

Boinas, F., Mendes, S. y Pateira, L. (2000). Linfadenite caseosa em pequenos ruminantes em Portugal. *Veterinária Técnica*. Vol. 10 No. 5 pp. 18-23.

Boysen, C., Davis, E., Beard, L., Lubbers, B. y Raghavan, R. (2015). Bayesian Geostatistical Analysis and Ecoclimatic Determinants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection among Horses. PLOS One; DOI:10.1371.

Brown, C., Olander, H. y Alves, S. (1987). Synergistic Hemolysis-Inhibition Titers Associated with Caseous Lymphadenitis in a Slaughterhouse Survey of Goats and Sheep in Northeastern Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research*, vol (51), pp. 46-49.

Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T. y Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*, vol (88), pp. 75-83.

Chikhaoui, M. & Khoudja, F. (2013). Clinicopathological investigation on caseous lymphadenitis in local breed sheep in Algeria. *Tropical Animal Health and Production*, vol (45), pp. 1641-1643.

Clark, K., Robinson, R. y Weishuhn; L. (1972). Caseous Lymphadenitis in Pronghorns (*Antilocapra Americana*). *Journal of Wild Life Diseases*. 8, 67.

Connor, K., Quirie, M., Baird, G. y Donachie, W. (2000). Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38. No.7. pp. 2633-2637.

Costa, Lina (2014). *Pseudotuberculose – Dois surtos de Linfadenite Visceral em caprinos na região de Portalegre*. Comunicação Livre. Livro de resumos Associação Portuguesa de Buiatria, Maio 2014.

D’Avelar, Ana Maria (2011). *Inspeção Sanitária de Ovinos*. [Dissertação de Mestrado]. Repositório da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal.

Debien, E., Hélie, P., Buczinski, S., Lebœuf, A., Bélanger, D. y Drolet, R. (2013). Proportional mortality: A study os 152 goats submitted for necropsy from 13 herds in Quebec, with a special focus on caseous lymphadenitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, vol (54), pp. 581-587.

Ermini, L. & Antenucci, P. (2014). *Manuale Pratico delle Malattie deglie Ovini e dei Caprini*. Milano: MSD Animal Health.

Ferreira, Jacinto (1968). *Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª Edição.

Gómez-Gascón, L., López, P., Cardoso-Toset, F., Luque, I., Huerta, B., Iglesias, C. y Maldonado, A. (2013). Pseudotuberculosis en Andalucía: Actualización del diagnóstico laboratorial. *Producción Animal*, vol (279), pp. 20-29.

Guedes, M., Souza, B., Sousa, T., Loureiro, D., Moura-Costa, L. y Azevedo, V. (2015) Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. *Brazilian Journal of Veterinary Research*. 35(8): 701-708.

Jung, B., Lee, S., Kim, H., Byun, J., Shin, D. y Kim, H. (2015). Serology and clinical relevance of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Tropical Animal Health Production*, vol (47), pp. 657-661.

Malone, F., Fee, S., Kamp, E., King, D., Baird, Graham J. y O'Reilly, K. (2006). A serological investigation of caseous lymphadenitis in four flocks of sheep. *Irish Veterinary Journal*. Volume 59(1), pp. 19-21.

Mendonça, Álvaro (2012). *Guia Sanitário para Criadores de Pequenos Ruminantes*. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança.

Oliveira, M., Barroco, C., Mottola, C., Santos, R., Lemsaddeck, A. y Tavares, L. (2014). First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *Veterinary Research*. 10:218.

Oreiby, Atef F. (2015). Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. *Small Ruminant Research*, vol (123), pp. 160-166.

Pacheco, L., Pena, R., Castro, Thiago L., Dorella, F., Bahia, R. y Carminati, R. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*., vol (56), pp. 480-486.

Paton, Michael W. (2010). *The epidemiology and control of Caseous Lymphadenitis in Australian Sheep Flocks*. [Doctoral thesis]. Murdoch University, School of Veterinary and Biomedical Sciences, Australia.

Peel, M., Palmer, G., Stacpoole, A. y Kerr, T. (1996). Human Lymphadenitis Due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of Ten Cases from Australia and Review. *Clinical Infectious Diseases*., vol (24), pp. 185-91.

PORTUGAL (2000). Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Regional (DGADR). Produtos com denominação de origem protegida.

PORTUGAL (2009). Instituto Nacional de Estatística (INE). Efetivo Caprino por Municípios.

PORTUGAL (2014). Instituto Nacional de Estatística (INE). Efetivo Ovino por Municípios.

Smith, Bradford P. *Editor-in-Chief* (2015). *Large Animal Internal Medicine*. Missouri: Elsevier, Fifth Edition

Stanford, K., Brogden, K., McClelland, L., Kozub, G. y Audibert, F. (1998). The incidence of Caseous Lymphadenitis in Alberta Sheep and assessment of Impact by Vaccination with Commercial and Experimental vaccines. *Canadian Journal of Veterinary Research*, vol (62), pp. 38-43.

Stauber, E., Armstrong, P., Chamberlain, K. y Gorgen, B. (1973). Caseous Lymphadenitis in white-tailed deer. *Journal of Wild Life Diseases*. 9, 56.

UNITED NATIONS (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOStat).

Windsor, Peter A. (2011). Control of Caseous Lymphadenitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. Volume 27, Issue 1, pp. 193-202.

Zasshi, N., Chikamatsu, S., Kong, Z., Kikuchi, N. y Hiramune, T. (1989). Estudio seroepidemiológico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* infección en el ganado ovino en Japón utilizando la enzima ensayo inmunoenzimático y la inmunodifusión. 51 (5): 887-91.



Imagem de capa:
Forma clínica adenítica superficial de Linfadenite Caseosa em ovino de raça
Lacaune (efetivo de ovinos leiteiros da região em estudo, 2015).

