

**Análise da Variabilidade  
Intra-espécie dos Genes *pld*  
e *rpoB* de *Corynebacterium*  
*pseudotuberculosis* por  
Meio de Marcadores PCR-RFLP**





ISSN 1983-974X

Setembro, 2007

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

## **Documentos 167**

### **Análise da Variabilidade Intra-espécie dos Genes *pld* e *rpoB* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por Meio de Marcadores PCR- RFLP**

*Grácia Maria Soares Rosinha  
Carina Elisei  
Renata Bastos  
Odinéia Forner  
Cleber Oliveira Soares  
Flávio Ribeiro de Araújo  
Renata Cunha Madureira  
Rinaldo Aparecido Mota  
Sílvio Romero de Oliveira Abreu*

Embrapa Gado de Corte  
Campo Grande, MS  
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Corte**

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 3368 2083

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.cnpqc.embrapa.br>

E-mail: [publicacoes@cnpqc.embrapa.br](mailto:publicacoes@cnpqc.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Grácia Maria Soares Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio Chagas Jacinto, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Tênisson Waldow de Souza, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Elane de Souza Salles*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Ecila Carolina N. Z. Lima*

Foto da capa: *Arquivo Embrapa Gado de Corte*

**1ª edição**

1ª impressão (2007): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Gado de Corte.**

---

Análise da variabilidade intra-espécie dos genes *pld* e *rpoB* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por meio de marcadores PCR-RFLP / Grácia Maria Soares Rosinha... [et al.]. -- Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2007.

24 p. ; 21 cm. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X ; 167).

Autores: Grácia Maria Soares Rosinha; Carina Elisei; Renata Bastos; Odinéia Forner; Cleber Oliveira Soares; Flávio Ribeiro de Araújo; Renata Cunha Madureira; Rinaldo Aparecido Mota; Sílvia Romero de Oliveira Abreu.

1. Sanidade animal. 2. Imunologia. 3. Caprino. 4. Ovino. 5. Linfadenite caseosa. 6. Pseudotuberculose. 7. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 8. Marcador molecular. 9. RFLP-PCR. I. Rosinha, Grácia Maria Soares. II. Elisei, Carina. III. Bastos, Renata. IV. Forner, Odinéia. V. Soares, Cleber Oliveira. VI. Araújo, Flávio Ribeiro de. VII. Madureira, Renata Cunha. VIII. Mota, Rinaldo Aparecido. IX. Abreu, Sílvia Romero de Oliveira. X. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). XI. Série.

CDD 636.0896079 (21.ed.)

---

© Embrapa Gado de Corte 2007

## **Autores**

### **Grácia Maria Soares Rosinha**

Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, [rosinha@cnpqc.embrapa.br](mailto:rosinha@cnpqc.embrapa.br)

### **Carina Elisei**

Bióloga, Ph.D., Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect)/CNPq, [elisei@cnpqc.embrapa.br](mailto:elisei@cnpqc.embrapa.br)

### **Renata Bastos**

Estudante de Biologia da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (Uniderp). Bolsista de Iniciação Científica/CNPq, [morenabastos@hotmail.com](mailto:morenabastos@hotmail.com)

### **Odinéia Forner**

Bióloga. Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial-ID/CNPq, [odiforner@cnpqc.embrapa.br](mailto:odiforner@cnpqc.embrapa.br)

**Cleber Oliveira Soares**

Médico-Veterinário, Ph.D. em Ciências Veterinárias,  
pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo  
Grande, MS, cleber@cnpqg.embrapa.br

**Flávio Ribeiro de Araújo**

Médico-Veterinário, Ph.D. em Imunologia, pesquisa-  
dor da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS,  
flavio@cnpqg.embrapa.br

**Renata Cunha Madureira**

Médica-Veterinária, Ph.D., Embrapa Gado de Corte,  
Bolsista de DTI/CNPq,  
rmadureira@cnpqg.embrapa.br

**Rinaldo Aparecido Mota**

Médico-Veterinário, Ph.D., Faculdade de Veterinária  
da Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Recife, PE, canjani\_ch@hotmail.com

**Sílvio Romero de Oliveira Abreu**

Médico-Veterinário, Ph.D., Fundação Educacional  
Jayme de Altavila, Centro de Ensino Superior de  
Maceió, Faculdade de Ciências Biológicas e da  
Saúde, Curso de Medicina Veterinária, Marechal  
Deodoro, AL, silviobiotec@yahoo.com.br

## **Agradecimentos**

Este trabalho recebeu suporte do Sistema de Gestão da Embrapa, do Banco do Nordeste do Brasil (BNB) e CNPq.





## Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>9</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>Metodologia</b> .....	<b>14</b>
Coleta e identificação das amostras .....	14
Extração de DNA genômico .....	15
Oligonucleotídeos iniciadores e PCR dos genes <i>pld</i> e <i>rpoB</i> .....	15
PCR-RFLP para os genes <i>pld</i> e <i>rpoB</i> .....	16
<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>17</b>
<b>Referências</b> .....	<b>22</b>



# Análise da Variabilidade Intra-espécie dos Genes *pld* e *rpoB* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por Meio de Marcadores PCR-RFLP

---

Grácia Maria Soares Rosinha

Carina Elisei

Renata Bastos

## Resumo

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos, uma doença infectocontagiosa crônica caracterizada por abscessos em linfonodos superficiais ou internos. Os animais acometidos podem apresentar lesões internas ou externas, o que representa perdas econômicas graves na caprinovinocultura, como o comprometimento da produção de lã em ovinos, deficiência reprodutiva, condenação da carne ou morte do animal. Uma vez estabelecida a infecção no rebanho, torna-se difícil sua erradicação. Com o objetivo de avaliar a variabilidade genética intra-espécie em *C. pseudotuberculosis*, 31 isolados provenientes de seis municípios do Estado de Pernambuco, sendo 23 de caprinos e oito de ovinos, tiveram os seus DNAs genômicos extraídos e analisados por reação em cadeia da polimerase e análise de polimorfismos por tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Os *locis* escolhidos foram os genes *pld* e *rpoB*, cujas seqüências dos oligonucleotídeos amplificaram fragmentos de 924 e 447 pares de bases (pb), respectivamente. Os produtos da amplificação foram digeridos com as enzimas *Pst I* e *Msp I* (gene *pld*) e *HpyCh4 IV* e *Msp I* (gene *rpoB*). Os fragmentos de restrição foram corridos em gel de poliacrilamida a 15%, os quais foram corados com brometo de etídeo. Para o gene *pld*, digerido com a enzima *Pst I*, foram obtidos fragmentos de 566, 195, 91 e 72 pb; e com a enzima *Msp I*,

fragmentos de 395, 369, 108 e 52 pb. O gene *rpoB* digerido com a enzima *HpyCh4 IV* apresentou fragmentos de 235, 126 e 86 pb; e com a enzima *Msp I* apresentou fragmentos de 222, 93, 78 e 54 pb. O padrão de bandas obtido para os 31 isolados de *C. pseudotuberculosis*, analisados neste estudo, foi monomórfico, não havendo, portanto, polimorfismo entre os diferentes isolados, independentes da espécie hospedeira ou da área geográfica estudada, o que corrobora com o padrão homogêneo da infecção para a região.

**Termos para indexação:** linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, polimorfismo genético, PCR-RFLP.

# **Analysis of Intra-species Variability of *pld* and *rpoB* Genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using PCR-RFLP Markers**

---

## **Abstract**

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiological agent of caseous lymphadenitis in goat and sheep. External and internal abscesses in lymphnodes and other organs characterize this chronic infectious contagious disease. Such lesions lead to economic losses, due to the reduction of wool production, reproductive deficiency, condemnation of carcasses or deaths. Also, it is very difficult to eradicate the infection from a herd. With the aim of evaluate the intra-species variability of *C. pseudotuberculosis*, 31 isolates from 6 municipalities of Pernambuco State (23 isolates from goats and 8 from sheep) were used. Genomic DNA was purified and a 924 bp fragment of *pld* gene and a 447 bp fragment of *rpoB* gene were amplified by PCR. Then, the amplicons were digested with *Pst*I and *Msp*I (*pld*) or *HpyCh4* IV and *Msp*I (*rpoB*). The restriction fragments were run on a 15% polyacrylamide gel, which was stained with ethidium bromide. All the 31 isolates shown the same RFLP digestion pattern. In the case of the *pld* fragment digested with *Pst*I, bands of 566, 195, 91, and 72 bp were shown. The same fragment digested with *Msp*I showed bands of 395, 369, 108, and 52 bp. In the case of the *rpoB* fragment digested with *HpyCh4* IV, bands of 235, 126, and 86 bp were shown; with *Msp*I, fragments were 222, 93, 78, and 54 bp. It was not detected polymorphism intra-species in this study, independent of the origin of the

species the host or the studied geographic area, what it corroborates with the homogeneous standard of the infection for the region.

**Index terms:** caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, genetic polymorphism and RFLP-PCR.

## Introdução

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria gram-positiva, responsável por causar a doença linfadenite caseosa (LC), que acomete principalmente ovinos e caprinos. Essa enfermidade se caracteriza principalmente pela formação de abscessos e conseqüente hipertrofia dos gânglios linfáticos localizados nas diversas regiões do corpo do animal, e também abscessos em vísceras, como intestino, fígado, pulmões, entre outros. Há relatos de mastite em cabras leiteiras determinadas por essa bactéria (AMEH et al., 1993) e também infecção em humanos com estreito contato com animais, embora ocorra raramente (PEEL et al., 1997; MILLS et al., 1997).

A LC é um fator limitante para a ovinocaprinocultura, por causa, principalmente, dos prejuízos econômicos causados. No Brasil, houve uma expansão significativa na criação de ovinos e caprinos, sendo estimado em 2006, um plantel de 16 milhões de ovinos e 10 milhões de caprinos, com destaque para a região Nordeste como a maior produtora desses animais (IBGE, 2008).

A implantação de programas de erradicação efetivos para LC esbarra na dificuldade da identificação de animais verdadeiramente positivos e negativos (DERCKSEN et al., 2000). E o tratamento empregado não é eficiente, sendo o descarte do animal na maioria das vezes a única solução para evitar a propagação da doença.

Vacinas vêm sendo desenvolvidas como método de controle para LC (EGGLETON et al., 1991; RIBEIRO et al., 1991; SIMMONS et al., 1997). Com o avanço da biologia molecular, têm-se pesquisado novos genes a fim de serem utilizados no diagnóstico e terapia dessa doença.

O gênero *Corynebacterium* possui mais de 60 espécies. As principais são patogênicas aos animais e aos humanos (OLIVEIRA, 1984). O uso de métodos moleculares para análise seqüencial do gene RNAr 16S (DNAr) tem possibilitado um maior delineamento do gênero, e a disponibilidade em comparar a seqüência desses genes com informações fenotípicas melhoradas tem aumentado significativamente a confiabilidade na identificação das espécies. Esses avanços na taxonomia e nos métodos de detecção, com o interesse nas corinebactérias como agentes oportunistas em infecções em humanos, recentemente resultaram no delineamento de um vasto grupo de novas espécies desse gênero (KHAMIS et al., 2005).

Dentro da espécie *C. pseudotuberculosis*, são reconhecidos dois biovars, que foram diferenciados inicialmente pela capacidade ou não em reduzir nitrato a nitrito. O biovar *equi*, nitrato-positivo, que é normalmente isolado de eqüinos e bovinos, e biovar *ovis*, nitrato-negativo, isolado, de caprinos e ovinos, e excepcionalmente bovinos (SONGER et al., 1988). Entretanto, já foi demonstrado que o biovar *equi* pode, apesar de pouco freqüente, apresentar-se sob a forma de nitrato-negativo, mantendo, no entanto, sua classificação anterior com base em estudo de ribotipagem (COSTA et al., 1998).

A maioria das espécies de *Corynebacterium* pode ser diferenciada pelo polimorfismo das bandas de restrição para o gene do RNAr 16S por causa da alta variabilidade das seqüências do DNAr 16S interespecies para esse gênero, que pode ser visto por um grande número de padrões de restrição (VANEECHOUTTE et al., 1995).

Entretanto, esse padrão de variabilidade interespecies não é verdadeiro para as espécies *C. pseudotuberculosis* e *Corynebacterium ulcerans* que não se diferenciam filogeneticamente quando comparadas suas seqüências do DNAr (RIEGEL et al., 1995).

Apesar de o gene do RNAr 16S ser o marcador molecular mais utilizado para determinar as relações filogenéticas bacterianas, para o gênero *Corynebacterium*, o gene *rpoB* (gene codificador da subunidade b da RNA

polimerase) parece ser melhor marcador na distinção entre as espécies. (KHAMIS et al., 2004).

Um dos fatores de maior relevância para a patogenia da linfadenite caseosa é a capacidade de *C. pseudotuberculosis* produzir a exotoxina fosfolipase D (PLD), codificada pelo gene *pld* (HODGSON et al., 1992; McNAMARA et al., 1994). Essa toxina parece só ser produzida por duas espécies de *Corynebacterium*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, sendo considerada um bom marcador para a identificação delas (BARKSDALE et al., 1981).

Sutherland et al. (1989) compararam a PLD de quatro cepas de *C. pseudotuberculosis*, avaliando taxa de letalidade em ratos brancos, atividade hemolítica, capacidade em inibir a hemolisina estafilocócica e a atividade antigênica no ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay), encontrando variação na letalidade, mas não na antigenicidade. Essa variabilidade na intensidade da ação patogênica da PLD poderá ser resultado de mutações no gene *pld*.

Considerando a importância dessa doença, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a variabilidade genética intra-espécie de diferentes isolados de *C. pseudotuberculosis* obtidos de caprinos e ovinos do sertão pernambucano por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase e análise de polimorfismos por tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) dos genes *pld* e *rpoB*.

## Metodologia

### Coleta e identificação das amostras

Foram coletadas 31 amostras de abscessos superficiais (linfonodos) de caprinos e ovinos provenientes do sertão pernambucano. Destas, seis amostras foram provenientes do município de Carnaíba (quatro de caprinos e duas de ovinos), oito de Itapetim (quatro de caprinos e quatro de ovinos), 12 de São José do Egito (todas de caprinos), cinco de Floresta (três de caprinos e duas de ovinos).



As amostras foram cultivadas em meio ágar sangue e identificadas como *C. pseudotuberculosis* por meio do teste APIcoryne (Bio Merieux-França), confirmando bioquimicamente as amostras como sendo *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* e enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular Animal da Embrapa Gado de Corte para as análises moleculares.

### **Extração de DNA genômico**

A extração do DNA foi realizada pelo método modificado de Zhang et al. (1994). As amostras de *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas em 10 mL de meio LB sob agitação a 37°C por 72 horas, posteriormente centrifugadas e transferidas para tubos tipo Eppendorf contendo 1 mL de tampão Tris-EDTA pH 8,7. Após centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 800 µL de tampão TE pH 8 acrescido de 10,3% (wt/vol) de glicose e 10 mg/mL de lisozima e incubados por 18 horas a 37°C, seguido de tratamento com 100 µL de SDS a 10%, 20 µL de NaCl a 5M e 13 µL de proteinase K a 20% e incubação a 56°C por 12 horas aproximadamente. Em seguida, foi adicionado 0,8 mL de fenol e centrifugação por 10 minutos a 9.900 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e adicionado clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Seguido de outra centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foi adicionado 0,6% de isopropanol. A suspensão foi homogeneizada levemente e centrifugada. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de álcool a 70%. Logo após centrifugou-se, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente, sendo ressuspenso em 50 µL de água ultrapura e estocado a -20°C.

### **Oligonucleotídeos iniciadores e PCR dos genes *pld* e *rpoB***

A escolha dos genes *pld* e *rpoB* foi fundamentada na literatura, balizada em estudos de espécies de *Corynebacterium*.

Para o gene *pld* foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores a partir de seqüência depositada no banco de dados GenBank, com número

de acesso L16587, para amplificar uma região correspondente a 924 pares de bases (pb), e para o gene *rpoB* utilizou um par de oligonucleotídeos iniciadores citado em Khamis et al. (2004), para amplificar uma região correspondente a 447 pb.

As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 50  $\mu$ L contendo 5  $\mu$ L de tampão de PCR 10X, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 250  $\mu$ M de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), 100 ng de DNA molde e 5 pmol/ $\mu$ L de cada oligonucleotídeo iniciador (F 5' ATGAGGGAGAAAGTTGTTTTA 3' e R 5' TCACCACGGGTTATCCGC 3' para o gene *pld*, e F 5' CGTATGAACATCGGCCAG 3' e R 5' TCCATTTCCGCCGAAGCGC 3' para o gene *rpoB*). A amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient programado para 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C (para o gene *pld*) e 56°C (para o gene *rpoB*) por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, e mais 3 minutos a 72°C para a extensão final.

Os produtos da amplificação foram resolvidos por eletroforese a 100V por 1 hora em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador sobre luz ultravioleta, utilizando como padrão de tamanho o marcador Low mass (Invitrogen<sup>®</sup>).

### **PCR-RFLP para os genes *pld* e *rpoB***

Para a técnica PCR-RFLP foram escolhidas enzimas de restrição por meio da análise do mapa dos sítios de restrição obtidos no *site* <http://www.carolina.com/cgi-bin/carolinaup.pl>. Essa escolha levou em consideração o número de cortes, tamanho e distância entre os fragmentos gerados pelo tratamento com cada endonuclease.

As reações de digestão foram realizadas com 500 ng dos produtos da PCR, utilizando 20 U das enzimas *Pst* I (Invitrogen<sup>®</sup>) e *Msp* I (Amersham<sup>®</sup>) para o gene *pld* e 20U das enzimas *HpyCh4* IV (NewEngland<sup>®</sup>) e *Msp* I (Amersham<sup>®</sup>) para o gene *rpoB*, e incubadas a 37°C por 6 horas. As amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de

poliacrilamida 15% a 80V por 3 horas, seguida de coloração em brometo de etídeo (5 µg/µL) por 20 minutos.

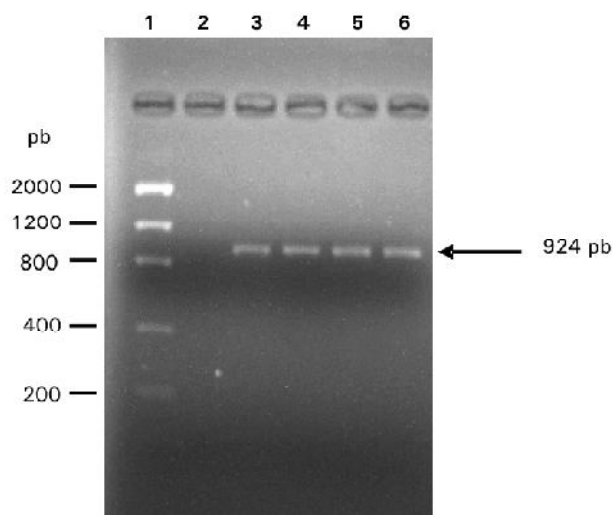
## Resultados e Discussão

A região Nordeste do Brasil é a que apresenta a maior frequência de casos de linfadenite caseosa, provavelmente em decorrência da grande concentração de ovinos e caprinos, além do tipo de vegetação que contém espinhos, facilitando a porta de entrada para as bactérias. Situado nessa região, o Estado de Pernambuco tem o sertão como sua maior área natural, ocupando 70% do seu território e tendo sua economia baseada na pecuária, principalmente bovina, caprina e ovina, sendo as duas últimas de grande importância econômica, principalmente para o pequeno produtor rural.

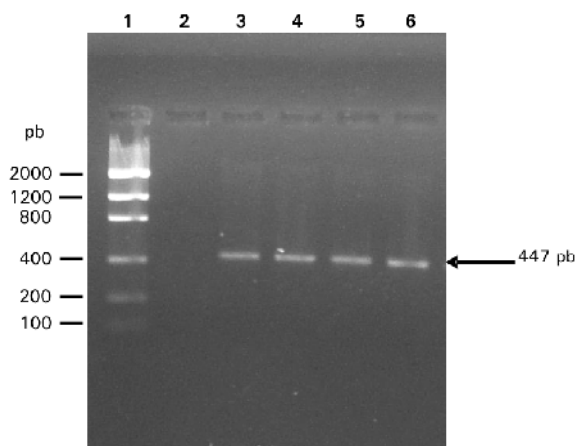
Os municípios de Carnaíba, Itapetim, São José do Egito e Floresta situam-se nas microrregiões do sertão do Pajeú e o do Moxotó, predominando, em quase toda a área das duas regiões, o clima semi-árido e uma forte concentração de caprinos e ovinos (<http://www.pe-az.com.br/regioes/regioes.htm>).

As 31 amostras de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* amplificadas com oligonucleotídeos iniciadores apresentaram os perfis de bandas esperados de 924 pb para o gene *pld* (Fig. 1) e de 447 pb para o gene *rpoB* (Fig. 2).

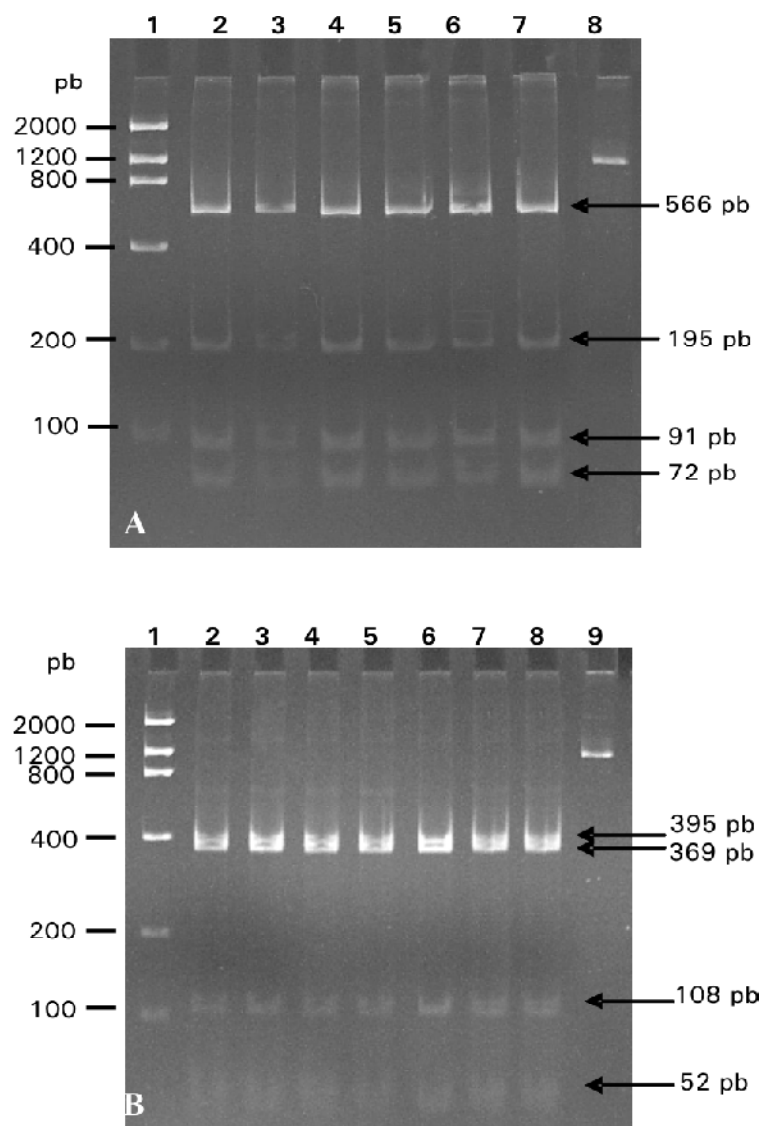
O gene *pld* digerido com a enzima *Pst* I apresentou fragmentos de 566, 195, 91 e 72 pb e a digestão com a enzima *Msp* I gerou fragmentos de 395, 369, 108 e 52 pb (Fig. 3). Os padrões de digestões encontrados neste estudo são compatíveis com o esperado pelas análises *in silico* de fragmentos do gene *pld* disponível no GenBank, delimitados pelos oligonucleotídeos utilizados.



**Fig. 1.** Perfil de bandas da reação de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores do gene *pld* de *C. pseudotuberculosis* em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Linha 1: Marcador de pares de bases *Low DNA Mass Ladder*; linha 2: controle negativo; linhas 3 a 6: padrão de amplificação do gene *pld*.



**Fig. 2.** Perfil de bandas da reação de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores do gene *rpoB* de *C. pseudotuberculosis* em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Linha 1: Marcador de pares de bases *Low DNA Mass Ladder*; linha 2: controle negativo; linhas 3 a 6: padrão de amplificação do gene *rpoB*.



**Fig. 3.** Fragmentos de PCR-RFLP do gene *pld* (924pb) em gel de poliacrilamida 15%, corado com brometo de etídeo. (A) linha 1: marcador *Low DNA Mass Ladder*; linhas 2 a 7: produtos de PCR de isolados de *C. pseudotuberculosis*, digeridos com *Pst* I; linha 8: produto de PCR do gene *pld* não digerido. (B) linha 1: marcador *Low DNA Mass Ladder*; linhas 2 a 8: produtos de PCR do gene *pld* digeridos com *Msp* I; linha 9: produto de PCR do gene *pld* não digerido.

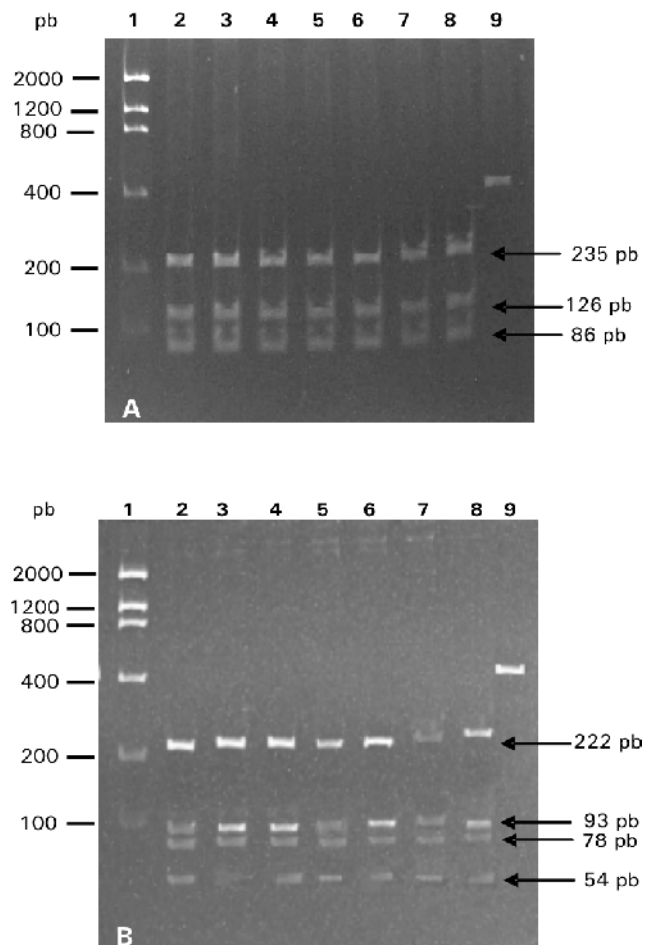
Este é o primeiro estudo a comparar por PCR-RFLP, o gene *pld* de *C. pseudotuberculosis*, principal fator de virulência dessa espécie. Pela análise dos resultados foi demonstrado que não houve variação genotípica para esse gene entre as amostras de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* estudadas independente da região de origem ou da espécie hospedeira. Tal fato sugere que esse fator de virulência contra o qual muitos trabalhos de proteção vacinal têm sido elaborados (ELLIS et al., 1991; TACHEDJIAN et al., 1995; HODGSON et al., 1999), mantém uma homogeneidade nas suas características genéticas, permitindo assim que respostas imunes desenvolvidas contra a proteína PLD possam ser exploradas como instrumento de controle da doença também na região estudada.

Vários trabalhos de ribotipagem foram desenvolvidos até o momento para comparar padrões genotípicos entre amostras de *C. pseudotuberculosis* utilizando o gene *16S*, tendo todos eles encontrado homogeneidade das amostras dentro dos seus respectivos biovares, mesmo entre aquelas com origem em mais de uma região do mundo e causando sintomas de intensidade variável nos hospedeiros (SUTHERLAND et al., 1993; SUTHERLAND et al., 1996; COSTA et al., 1998; LITERÁK et al., 1999).

O gene *rpoB* digerido com a enzima *HpyCh4* IV apresentou fragmentos de 235, 126 e 86 pb, e com a enzima *Msp* I apresentou fragmentos de 222, 93, 78 e 54 pb (Fig. 4). Os padrões de digestões encontrados neste estudo são compatíveis com o esperado pelas análises *in silico* de fragmentos do gene *rpoB* (disponível no GenBank sob o nº de acesso AY492239) delimitados pelos oligonucleotídeos utilizados. O gene *rpoB* vem sendo utilizado para identificação de espécies e subespécies de *Corynebacterium* spp. a partir de desenhos de oligonucleotídeos iniciadores para pequenas regiões hipervariáveis, tornando-se uma importante ferramenta no auxílio de diagnóstico (KHAMIS et al., 2004).

Os isolados de *C. pseudotuberculosis* coletados no sertão pernambucano apresentaram perfil de bandas monomórfico, não sendo observada variação genética intra-espécie quando analisados por meio da técnica PCR-RFLP para os genes *pld* e *rpoB* com as enzimas de restrição utilizadas.

Esse padrão observado para o gene *pld*, tanto para isolados de caprinos como de ovinos, pode ser atribuído a todos os isolados de *C. pseudotuberculosis* por terem sido coletados de abscessos de animais infectados que apresentavam quadro clínico semelhante à doença.



**Fig. 4.** Fragmentos de PCR-RFLP do gene *rpoB* de isolados de *C. pseudotuberculosis* em gel de poli-acrilamida 15%, corado com brometo de etídeo. (A) linha 1: marcador *Low DNA Mass Ladder*; linhas 2 a 8: produtos de PCR de isolados de *C. pseudotuberculosis* digeridos com *HpyCH4 IV*; linha 9: produto de PCR do gene *rpoB* não digerido. (B) linha 1: marcador *Low DNA Mass Ladder*; linhas 2 a 8 produtos de PCR digeridos com *Msp I*; linha 9: produto de PCR do gene *rpoB* não digerido.

## Referências

- AMEH, J. A.; ADDO, P. B.; ADEKEYE, J. O.; GYANG, E. O. Prevalence of clinical mastitis and of intramammary infections in Nigerian goats. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 17, p. 41-46, Oct. 1993. Issues 1-2.
- BARCKSDALE, L.; LINDER, R.; SULEA, I. T.; POLLICE, M. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 335-343, Feb. 1981.
- COSTA, L. R. R.; SPIER, S. J.; HIRSH, D. C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin. **Veterinary Microbiology**, v. 62, p. 135-143, May 1998. Issue 2.
- DERCKSEN, D. P.; BRINKHO, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T. MAANEN, C. V.; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 167-175, July 2000. Issue 2.
- EGGLETON, D. G.; HAYNES, J. A.; MIDDLETON, H. D.; COX, J. C.; MIDDLETON, H. D.; MINTY, D. W. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, p. 322-325, Oct. 1991. Issue 10.
- ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 28, p. 303-316, July 1991. Issues 3-4.
- HODGSON, A. L.; KRYWULT, J., CORNER, L. A.; ROTHEL, J. S.; RADFORD, A. J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2900-2905, July 1992.
- HODGSON, A. L. M.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L. A.; McCOLL, M.; CAMARON, A. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Vaccine**, v. 17, p. 802-808, Feb. 1999. Issues 7-8.



IBGE – Banco de dados agregados, 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *rpoB* Gene Sequencing for identification of *Corynebacterium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 3925–3931, Sept. 2004.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; La SCOLA, B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1934–1936, Apr. 2005.

LITERÁK, I.; HORVÁTHOVA, A.; JAHNOVÁ, M.; RYCHLÍK, I.; SKALKA, B. Phenotype and genotype characteristics of Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 32, p. 107-109, Apr. 1999. Issue 2.

McNAMARA, P. J.; BRADLEY, G. A.; SONGER, J. G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 12, p. 921-930, Jun 1994. Issue 6.

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

OLIVEIRA, S. J. *Corynebacterium*. In: GUERREIRO, M.G. et al. Bacteriologia especial com interesse em saúde animal e saúde pública., Porto Alegre, SULINA, 1984. 492p. (Coleção técnica rural).

PEEL M. M.; PALMER G. G.; STACPOOLE A. M.; KERR T. G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 185-191, Feb. 1997.

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

RIEGEL, P.; RUIMY, R.; de BRIEL, D.; PRÉVOST, G.; JEHL, F.; CHRISTEN, R.; MONTEIL, H. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev., **FEMS Microbiology Letter**, v. 126, n. 3, p. 271–276, Mar. 1995.

SIMMONS, C. P.; HODGSON, A. L. M.; STRUGNELL, R. A. Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 8, p. 3048-3056, Aug. 1997.

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

SUTHERLAND, S. S.; SPEIJERS, E. J.; ANDRES, B. Comparison of the exotoxins of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Research in Veterinary Science**, v. 47, n. 2, p. 190-194, Sept. 1989.

SUTHERLAND, S. S.; HART, R. A.; BULLER, N. B. Ribotype analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, p. 454-456, Dec. 1993. Issue 12.

SUTHERLAND, S. S.; HART, R. A.; BULLER, N. B. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. **Veterinary Microbiology**, v. 49, p. 1-9, Mar. 1996. Issues 1-2.

TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; MOORE, R. J.; HODGSON, A. L. M. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. **Vaccine**, v. 13, p. 1785-1792, 1995. Issue 18.

VANEECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; BRIEL, D.; MONTEIL, H.; VERSCHRAEGEN, G.; DE ROUCK, A.; CLAEYS, G. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. **Research in Microbiology**, v.146, p. 633-641, 1995.

ZHANG, Y.; PRASZKIER, J.; HODGSON, A.; PITTARDI, A. J. Molecular analysis and characterization of a broad-Host-Range plasmid, pEP2. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 5718-5728, Sept. 1994. Issue 18.

**Embrapa**

---

*Gado de Corte*

**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

**Governo  
Federal**

CGPE 7733