

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Rastreo de agentes infecciosos em linfadenite granulomatosa de animais selvagens

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Ana Patrícia Araújo Dias

Orientadora: Prof. Doutora Ana Cláudia Coelho

Co-orientadora: Prof. Doutora Maria Manuela Matos



Vila Real, 2014

Rastreo de agentes infecciosos em linfadenite granulomatosa de animais selvagens

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Ana Patrícia Araújo Dias

Orientadora: Prof. Doutora Ana Cláudia Coelho

Co-orientadora: Prof. Doutora Maria Manuela Matos

Composição do Júri:

Agradecimentos

A realização deste trabalho apenas foi possível, devido ao contributo de várias pessoas a quem não posso deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Magnífico Reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

À Professora Doutora Ana Cláudia Coelho, por aceitar orientar, pela ajuda, encorajamento e disponibilidade que sempre manifestou e pela revisão crítica do texto.

À Professora Doutora Maria Manuela Outeiro Correia de Matos, co-orientadora, pela ajuda na realização prática do trabalho e pela disponibilidade mostrada ao longo deste e ainda pela revisão crítica do texto.

À Professora Doutora Sandra Marisa Monteiro, pela disponibilidade e apoio prestado.

À Doutora Ana Coimbra, pelo apoio e profissionalismo prestado.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Biotecnologia, em especial à mestra Ana Luzio, pela ajuda no material e todo o apoio demonstrado.

Ao laboratório de Biologia Molecular, pelas condições de trabalho proporcionadas e pelo espaço cedido.

À Márcia Morais, colega de trabalho, pela sua ajuda ao longo do trabalho, pelo seu companheirismo e amizade.

A todos os meus amigos, em especial à Stefani Santos e à Filipa Afonso, que indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, pelos momentos que me proporcionaram e pela coragem e apoio prestado.

Por último, e não menos especiais, aos meus pais e irmão, pelo carinho, confiança, pelos valores transmitidos e por sempre me apoiarem.

Resumo

Há vários agentes infecciosos considerados, responsáveis por linfadenite granulomatosa. Deste modo, detetar a linfadenite granulomatosa é difícil uma vez que identificação clínica precoce dos animais infetados é um grande obstáculo. O diagnóstico baseia-se essencialmente em testes *post mortem*, como o exame macroscópico e histopatológico das lesões, técnicas microbiológicas e moleculares. Este trabalho teve como principal objetivo a identificação de agentes etiológicos infecciosos implicados em linfadenite granulomatosa de animais selvagens (veados e javalis) em Portugal, como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, e dos géneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium*. Assim como a identificação de *Emmonsia crescens* em saca-rabos pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Realizaram-se ensaios moleculares através da técnica de PCR, com amostras de tecidos de gânglios linfáticos oriundos de animais selvagens, em Portugal. Foram estudados 46 gânglios linfáticos provenientes de 25 veados e 21 javalis que apresentavam lesões do tipo linfadenite granulomatose e 14 saca-rabos com suspeitas de linfadenite granulomatosa compatível com adiaspiromicose.

Dos 46 gânglios linfáticos analisados, obtiveram-se resultados positivos para o género *Mycobacterium* em 60,9% dos gânglios. Para os géneros *Nocardia* e *Corynebacterium* obtiveram-se 15,2% positivos e para *Rhodococcus* nenhum gânglio foi positivo. A deteção de *Mycobacterium* foi superior em veados do que em javalis. Quatro (8,7%) gânglios linfáticos foram simultaneamente positivos ao género *Mycobacterium* e ao género *Nocardia* e outros quatro (8,7%) foram simultaneamente positivos ao género *Mycobacterium* e ao género *Corynebacterium*. Três (6,5%) amostras foram simultaneamente positivas a *Nocardia* e a *Corynebacterium*. Três amostras foram simultaneamente positivas aos três géneros.

Dos catorze saca-rabos analisados, apenas três apresentaram linfadenite granulomatosa compatível com adiaspiromicose. *Emmonsia crescens* foi detetada por biologia molecular num macho de 3 anos, com boa condição corporal.

Com os resultados obtidos neste estudo, foi possível verificar a presença de diferentes agentes infecciosos implicados em linfadenite granulomatosa em animais selvagens em Portugal.

Palavras-chave: Linfadenite granulomatosa; PCR; *Nocardia*; *Rhodococcus*; *Mycobacterium*

Abstract

There are several infectious agents identified as responsible for granulomatous lymphadenitis. Detection of granulomatous lymphadenitis it is difficult since early clinical identification of infected animals is a big obstacle. The diagnosis is mainly based on *post mortem* tests, such as macroscopic and histopathological lesions, microbiological and molecular techniques.

This study aimed to identify the etiologic agents involved in infectious granulomatous lymphadenitis in wildlife (deer and wild boar) in Portugal, as *Corynebacterium pseudotuberculosis* and genus *Nocardia*, *Rhodococcus* and *Mycobacterium*. As well as identification of *Emmonsia crescens* in mongooses by polymerase chain reaction (PCR).

Molecular assays were used by PCR in tissue samples derived from lymph nodes of wild animals of Portugal. 46 lymph nodes from 25 deer and 21 wild boars that had lesions of granulomatous lymphadenitis type were studied, as well as 14 mongooses with suspected granulomatous lymphadenitis compatible with adiaspiromycosis.

Of the 46 lymph nodes analyzed 60,9%, had positive results for the genus *Mycobacterium*. 15,2% had positive results for *Corynebacterium* genus and *Nocardia* and for the *Rhodococcus* none of the tissues was positive. Four (8.7%) lymph nodes were positive for *Mycobacterium* and *Nocardia* genus and another four (8.7%) were positive for *Mycobacterium* and the *Corynebacterium* genus. Three (6,5%) samples were simultaneously positive to *Nocardia* and *Corynebacterium*. Three samples were positive for the three genus simultaneously.

Of the fourteen mongooses, only three showed granulomatous lymphadenitis compatible with adiaspiromycosis. *Emmonsia crescens* was detected by molecular biology in male with three years old, in good body condition.

The results of this study, confirm the presence of several infectious agents implicated in granulomatous lymphadenitis in wildlife in Portugal.

Keywords: Granulomatous lymphadenitis; PCR; *Nocardia*; *Rhodococcus*; *Mycobacterium*

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice Geral	IV
Índice de Figuras	VI
Índice de Tabelas	VI
Abreviaturas	VII
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Linfadenite Granulomatosa	1
1.2.1.2 Agentes Etiológicos de Linfadenite Granulomatosa	2
1.2.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	2
1.2.2 Género <i>Nocardia</i>	2
1.2.3 Género <i>Rhodococcus</i>	3
1.2.4 Género <i>Streptococcus</i>	4
1.2.5 Género <i>Mycobacterium</i>	5
1.2.6 <i>Emmonsia crescens</i>	6
1.3.1.3. Principais doenças com manifestação clínica de linfadenite granulomatosa	7
1.3.1 Linfadenite caseosa	7
1.3.2 Sarcoidose	8
1.3.3 Tularemia	8
1.3.4 Tuberculose	9
1.4.1.4 Diagnóstico Molecular	9
1.5.1.5 Objetivos	11
Capítulo 2 – Material e Métodos	12
1.6.2.1 Extração de DNA a partir de tecidos	12
1.7.2.2 Quantificação de DNA	13
1.8.2.3 Amplificação	13
2.3.1 Reação de PCR 16S rDNA para o género <i>Mycobacterium</i>	13
2.3.2 Reação de PCR “multiplex” para a identificação de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	14
2.3.3 Reação de PCR 16S rDNA para a deteção de <i>Rhodococcus equi</i>	15
2.3.4 Reação de PCR para a deteção de <i>Nocardia</i>	16

2.3.5 Reação de PCR para a detecção de <i>Emmonsia crescens</i>	17
1.9.2.4 Eletroforese	18
1.10. 2.5 Análises de dados	18
Capítulo 3 – Resultados	19
1.11. 3.1 Diagnóstico diferencial de linfadenite granulomatosa de etiologia infecciosa e parasitária em 46 ungulados	19
1.12. 3.2 Detecção de <i>Emmonsia crescens</i> por métodos moleculares.....	22
Capítulo 4 – Discussão	23
Capítulo 5 – Conclusão	29
Bibliografia	30

Índice de Figuras

Fig. 1 Distribuição dos géneros detetados nos gânglios linfáticos por espécies.....	19
Fig. 2 Detecção de <i>Emmonsia crescens</i> através de PCR.....	22

Índice de Tabelas

Tabela 1 “Primers” específicos para o género <i>Mycobacterium</i>	14
Tabela 2 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio 16S rDNA	14
Tabela 3 “Primers” específicos no ensaio PCR “multiplex” para <i>Corynebacterium</i>	15
Tabela 4 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio PCR “multiplex”	15
Tabela 5 “Primers” específicos para <i>Rhodococcus equi</i>	15
Tabela 6 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio PCR 16S rDNA	16
Tabela 7 “Primers” específicos para <i>Nocardia</i>	16
Tabela 8 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio PCR 16S rDNA	17
Tabela 9 “Primers” específicos para <i>Emmonsia crescens</i>	17
Tabela 10 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio 16S rDNA	17
Tabela 11 Taxa de detecção de <i>Mycobacterium</i> spp. de acordo com as variáveis demográficas dos animais.....	20
Tabela 12 Taxa de detecção de <i>Nocardia</i> spp. de acordo com as variáveis demográficas dos animais	21
Tabela 13 Taxa de detecção de <i>Corynebacterium</i> spp. de acordo com as variáveis demográficas dos animais	21
Tabela 14 Comparação entre a detecção simultânea de diferentes géneros.	22

Abreviaturas

CMNR- *Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia e Rhodococcus*

ELISA- “Enzyme-linked immunosorbent assay”

GLA- Linfadenite granulomatosa do inglês “Granulomatous Lymphadenitis”

CLA- Linfadenite caseosa do inglês “Caseous Lymphadenitis”

pb- Pares de bases

PCR- Reacção em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase chain reaction”

RAPDs – Amplificação aleatória de DNA polimórfico, do inglês “Random Amplified Polymorphic DNA”

TBE - Tampão Tris-Borato-EDTA

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Linfadenite Granulomatosa

As doenças granulomatosas que originam com a formação de granulomas compreendem um grande grupo, tendo em comum a formação de granulomas. Estes têm tamanhos variados e tendem a ser confluentes ou discretos, o grau de necrose é variável, e os componentes celulares diferem entre si. Um granuloma é um conjunto de células inflamatórias, normalmente mononucleares, formado como resultado da persistência de um produto não degradável ou como resposta à hipersensibilidade (James, 2000).

A linfadenite granulomatosa (GLA), caracterizada por abscessos, é em termos histológicos formada por um padrão de alterações reativas nos gânglios linfáticos no decorrer de várias doenças infecciosas (Kojima *et al.*, 1995). Esta pode ter etiologia infecciosa e não infecciosa. Dentro das granulomatoses de origem infecciosa pode ainda ocorrer a subdivisão em linfadenite supurativa e não supurativa (Asano, 2012).

Como exemplo de doenças infecciosas com manifestação de linfadenite supurativa existe a tularemia causada por *Francisella tularensis*, e a doença do arranhão do gato causada por *Bartonella henselae* capazes de afetar as regiões axilares e cervicais. A linfadenite supurativa inclui a linfadenite tuberculosa que aparece principalmente nos gânglios cervicais, a lepra, brucelose entre outras. A toxoplasmose é uma infecção por protozoários que também se pode manifestar por linfadenite supurativa (Asano, 2012).

A linfadenite granulomatosa não infecciosa pode manifestar-se em humanos em doenças como beriliose, linfoma de Hodgking, linfoma não Hodgking, a doença de Crohn e sarcoidose. Estas doenças raramente apresentam abscessos e necrose no centro dos granulomas (Asano, 2012).

1.2 Agentes Etiológicos de Linfadenite Granulomatosa

Vários são os agentes etiológicos de linfadenite granulomatosa. Em seguida efetua-se uma revisão bibliográfica sobre os principais agentes isolados em animais.

1.2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Edward Nocard em 1888, isolou um organismo incomum de um caso de linfadenite num bovino. Cerca de 3 anos depois Hugo Van Preisz identificou uma bactéria semelhante em culturas de um abscesso renal em uma ovelha. Como consequência dessas descobertas o organismo em questão tornou-se conhecido como bacilo “Preisz-Nocard”, um nome ao qual ficou ligado durante décadas. Mais tarde Lehmann e Neumann mudaram o nome para *Bacillus pseudotuberculosis* e na primeira edição do Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology publicado em 1923 o organismo é colocado no género *Corynebacterium*. No entanto devido a semelhanças morfológicas e composição da parede celular entre *Bacillus corynebacterium* e *C. diptheriae* efetuou-se uma alteração da nomenclatura para *Corynebacterium ovis*. Em 1948 foi atribuída a nomenclatura de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) que se mantém até hoje (Baird e Fontaine, 2007). A espécie *C. pseudotuberculosis* pertence à classe das Actinobactérias, família Corynebacteriaceae e género *Corynebacterium* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi). Este género é um dos constituintes do grupo CMNR, caracterizado pela parede celular composta fundamentalmente por peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos, além de um elevada porção de G+C no seu genoma (Guimarães *et al.*, 2011). *C. pseudotuberculosis* caracteriza-se como um bacilo Gram-positivo, curto e irregular (0,5 a 0,6 por 1 a 3µm), podendo apresentar aspeto cocóide. Pode apresentar-se isolado ou formando grupos irregulares ou, ainda em paliçada. São bacilos imóveis, anaérobios facultativos, fermentativos e não formadores de esporos (Benham *et al.*, 1962; Batey, 1986; Merchant e Packer, 1965; Quinn *et al.*, 1994 citado por Costa, 2002).

1.2.2 Género *Nocardia*

As bactérias inicialmente colocadas no género *Nocardia* foram isoladas por Edmond Nocard em 1888 tendo sido nomeada de *Nocardia farcinica* pela Trevisan em 1889 (Conville e Witebsky, 2004). Este organismo tornou-se assim uma espécie do género *Nocardia* e a estirpe tipo da espécie *N. farcinica*. Ao estudar isolados designados para *N. farcinica* e *N. asteroides*, Ruth e os seus colaboradores em 1962 descobriram que os organismos eram

idênticos através de testes bioquímicos. Como havia alguma confusão em torno da espécie isolada por Nocard a espécie do género foi alterada para *N. asteroides* (Conville e Witebsky, 2010). Mais tarde, como se acreditava que havia várias espécies diferentes, mas fenotipicamente semelhantes, este conjunto de organismos passaram a ser chamados de “*Nocardia asteroides complex*” (Conville e Witebsky, 2004).

A taxonomia do género *Nocardia* está a mudar rapidamente quanto ao reconhecimento e descrição de novas espécies existindo controvérsia quanto ao número de espécies válidas dentro do género (Corti e Fioti, 2003; Saubolle e Sussland, 2003).

Este género é responsável por infeções localizadas ou disseminadas em animais e humanos. As espécies mais associadas a infeções são *N. abscessus*, *N. africana*, *N. brasiliensis*, *N. brevicatena complex*, *N. carnea*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum*, *N. paucivorans*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. puris*, *N. transvalensis*, e *N. veterana* (Conville e Witebsky, 2004).

Em termos filogenéticos, as espécies do género *Nocardia* pertencem à classe das Actinobacterias, ordem Actinomycetales e família Nocardiaceae juntamente com várias outras famílias e géneros que têm paredes celulares semelhantes (Conville e Witebsky, 2004; www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi)

Os membros deste género estão associados ao grupo de microrganismos conhecidos como actinomicetas aeróbios. São bactérias Gram-positivas, aeróbias filamentosas, bacilares, fracamente álcool-ácido resistentes, que vivem como saprófitas do solo (Corti e Fioti, 2003).

1.2.3 Género *Rhodococcus*

As bactérias do género *Rhodococcus* são membros da família Nocardiaceae. Existem várias espécies diferenciadas pela diversidade do metabolismo e aplicação industrial, duas delas são reconhecidas com agentes patogénicos: *Rhodococcus equi* em mamíferos e *Rhodococcus fascians* em plantas (Krewer *et al.*, 2008; www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi).

Rhodococcus equi anteriormente denominado de *Corynebacterium equi*, é reconhecido em todo o mundo como sendo a principal causa de infeções em várias espécies animais e em humanos (Schlusselhuber *et al.*, 2012). *Rhodococcus equi* é considerado um actinomiceta nocardioforme, devido ao seu crescimento em micélio com fragmentação de elementos cocóides ou cocobacilares que, após coloração apresentam-se como bactérias Gram-positivas pleomórficas e capsuladas. É considerado um microrganismo intracelular facultativo, aeróbio,

uma vez que provoca lesões piogranulomatosas nos animais, devido à sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se no interior dos macrófagos. Uma das características mais importantes deste género é a presença de ácidos micólicos na parede celular (Krewer *et al.*, 2008).

A rodococose, a doença causada por *Rhodococcus* ocorre preferencialmente em organismos imunodeprimidos seja naturalmente ou devido a doença ou tratamento médico (Schlusselhuber *et al.*, 2012). Uma das manifestações da infeção por *Rhodococcus equi* é a broncopneumonia supurativa crónica em potros (Bidaud *et al.*, 2012) e esporadicamente linfadenite e abscessos pulmonares em suínos, ovinos e caprinos (Takai *et al.*, 2003).

Esta bactéria é amplamente distribuída no ambiente e tem sido isolada de uma grande variedade de fontes, incluindo solos, fezes, e nos intestinos de animais doentes e saudáveis (Krewer *et al.*, 2008).

1.2.4 Género *Streptococcus*

As bactérias do género *Streptococcus* são cocos, Gram-positivos e diferem pela sua capacidade em produzir ácido a partir de hidratos de carbono. São muito comuns especialmente na pele, mucosas e intestino do homem e animais, bem como no leite (Merchant e Packer, 1965).

A reação de hemólise é importante para o agrupamento de estreptococos e juntamente com as características fisiológicas é suficiente para a identificação clínica. Os grupos mais frequentes incluem o grupo A (*Streptococcus pyogenes*), o grupo B (*Streptococcus agalactiae*), o grupo C (*Streptococcus equi*) e o grupo D (os *Enterococcus*) (Jawetz *et al.*, 1989).

Amplamente distribuído na natureza este género contém numerosas espécies clinicamente importantes, sendo responsáveis por uma grande variedade de infeções no homem e nos animais (Jawetz *et al.*, 1989).

Nos animais, *Streptococcus equi* é o principal agente infeccioso. Este organismo está normalmente associado a uma doença respiratória grave e altamente contagiosa em cavalos (Harrington *et al.*, 2002). No entanto, como agente patogénico oportunista, o organismo não está apenas associado a cavalos mas também em muitas outras espécies animais como porcos, ovelhas, vacas, cabras, raposas, macacos e pássaros. Para além destas espécies este organismo foi ainda encontrado num leopardo (*Panthera uncia*), mantido num jardim zoológico do Japão (Yamaguchi *et al.*, 2012).

Entre 2002 e 2003, na Tanzânia, duas hienas morreram por infecção causada por *Streptococcus equi* (Speck *et al.*, 2008).

1.2.5 Género *Mycobacterium*

Taxonomicamente, as micobactérias pertencem ao género *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae* e ordem Actinomycetales (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi). Esta ordem inclui diversos microrganismos diferenciados com base em características fenotípicas (Rastogi *et al.*, 2001).

O género *Mycobacterium* é constituído por organismos Gram-positivos e álcool-ácido resistentes. Esta última propriedade deve-se à presença, na superfície da célula micobacteriana, de componentes lipídicos chamados ácidos micólicos, encontrados apenas no género *Mycobacterium*. Geralmente é um organismo pleomórfico que pode sofrer ramificação ou crescimento filamentosos, tornando-se em elementos bacilares ou cocóides (Brock e Madigan, 1991).

Em geral, as micobactérias podem ser separadas em dois grupos principais: crescimento lento e crescimento rápido. *Mycobacterium tuberculosis* é um exemplo de micobactérias de crescimento lento (Brock e Madigan, 1991).

Uma característica de muitas micobactérias é a sua capacidade de formar pigmentos carotenóides amarelos. Baseado na pigmentação pode-se classificar as micobactérias em três grupos: não pigmentadas (*M. tuberculosis*, *M. bovis*), pigmentos formados apenas na presença de luz, fenómeno chamado fotocromogénica (*M. kansasii*, *M. marinum*) e pigmentos formados na presença ou ausência de luz, fenómeno chamado de escotocromogénese (*M. gordonae*, *M. paraffinicum*) (Brock e Madigan, 1991).

A parede celular das micobactérias é constituída por peptidoglicano ligado covalentemente a um polímero que confere o carácter hidrofóbico da superfície da célula micobacteriana (Brock e Madigan, 1991).

Este género contém um certo número de agentes patogénicos, que infetam humanos e animais. Nos humanos e animais os principais agentes incluem *M. tuberculosis*, agente causador da tuberculose, e *M. leprae* que causa lepra (Rastogi *et al.*, 2001).

A tuberculose é uma doença infécciosa granulomatosa crónica, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Esta doença é de elevada prevalência em espécies como javali, veado e gado, sendo estas consideradas, como reservatórios da doença, em toda a Europa (Hardstaff *et al.*, 2014).

1.2.6 *Emmonsia crescens*

Emmonsia crescens (ou *Chrysosporium parvum* var. *crescens*) é um fungo saprófita, que pertence à classe Eurotiomycetes, à ordem Onygenales e ao género *Emmonsia* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi).

É um fungo dimórfico cujos aleuroconídeos, medindo 2-4 µm, transformam-se em esferas de grandes dimensões (diâmetro médio maior que 200 µm) multinucleadas de paredes espessas (adiconídios) que crescem até 700 µm provocando uma resposta inflamatória (Buyuksirin *et al.*, 2011). Existe uma grande variação no número, tamanho, intensidade de coloração e quantidade de citoplasma entre os fungos presentes nos granulomas. Geralmente, apresentam-se como estruturas anelares vazias ou com pequenos glóbulos hialinos refrativos e finos grânulos basófilos ao longo da parede interna sem evidências de multiplicação (Santos *et al.*, 2000).

Emmonsia crescens tem sido relatado em todo o mundo em várias espécies, mais comumente em pequenos roedores, mas também em lontras, esquilos, caprinos, cães, cavalos, castores e outras espécies. Apesar da elevada ocorrência, este fungo tem recebido pouca atenção porque raramente afeta os humanos (Dot *et al.*, 2009).

Adaspiromicose é uma infecção fúngica, especialmente em pequenos roedores, causada por *Emmonsia crescens* e *Emmonsia parva*. A infecção resulta da inalação de esporos, induzindo rapidamente uma resposta granulomatosa no pulmão do roedor, no entanto a sintomatologia depende do tamanho do esporo inalado (Edward *et al.*, 2011).

A reação inflamatória desencadeada no organismo pelos adiconídios em desenvolvimento é intensa e provoca a destruição dos mesmos em algumas semanas ou meses. Inicialmente exsudativa, quando o número de conídios inalados é excessivo, a reação pode levar o hospedeiro à morte por insuficiência respiratória. Passada a fase inicial, ocorre a formação de granulomas e a limitação do processo, seguida de fibrose e cura espontânea (Lima *et al.*, 1998).

No que diz respeito à adaspiromicose, o diagnóstico é difícil porque o fungo não cresce facilmente em cultura e ainda não existem quaisquer testes serológicos disponíveis. O diagnóstico implica a realização de uma biópsia seguida de um exame histológico através da observação de grandes esférulas com uma parede trilamelar que pode ser rodeada por granulomas com ou sem necrose ou fibrose. Na esperança de um melhor diagnóstico as técnicas moleculares poderão ser uma boa alternativa (Dot *et al.*, 2009).

1.3. Principais doenças com manifestação clínica de linfadenite granulomatosa

1.3.1 Linfadenite caseosa

A linfadenite caseosa (CLA) também denominada “mal do caroço” foi relatada, por Preisz e Guinard em 1891, no Irão por Afnan e seus colaboradores em 1964 e Nocard em 1996 (Hosseinzadeh *et al.*, 1996). A doença é de carácter crónico e contagioso que afeta pequenos ruminantes, mas também outras espécies como cavalos, bovinos (Moura-Costa *et al.*, 2008), veados selvagens (Chiu *et al.*, 2009), lamas, alpacas, búfalos, cervos e camelos (Zavoshti *et al.*, 2012).

A principal característica desta doença é a formação de abscessos nos gânglios linfáticos superficiais e internos (Muckle e Gyles, 1982; Collins, 1986 citado por Chirino-Zárraga *et al.*, 2006). Em casos graves, estes abscessos também são encontrados em órgãos internos associados às vísceras, caracterizando-se como linfadenite caseosa visceral. Em alguns casos a infeção produz poucos sinais clínicos no animal, não sendo possível ser reconhecida até a realização de um exame *post mortem* (Dorella *et al.*, 2006).

As primeiras manifestações da doença são a formação de granulomas e outros problemas inflamatórios. O tipo de infeções mais frequentes inclui pneumonia, abscessos, adenite, osteomielite e celulite. Outras complicações pulmonares incluem adenopatia hilar e empiema (Dorella *et al.*, 2006).

O principal agente etiológico da doença é *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Guimarães *et al.*, 2011), mas outros agentes, tais como, membros do género *Nocardia* são frequentemente encontrados em doenças agudas ou crónicas, supurativas ou granulomatosas (Brown *et al.*, 2004).

Existem vários métodos serológicos utilizados no diagnóstico como a imunofluorescência indireta, a imunodifusão em gel de agar, a fixação de complemento, a técnica de ELISA e hemaglutinação indireta (Kaba *et al.*, 2001; Belchior *et al.*, 2006; Baird e Fontaine, 2007). A maior desvantagem dos testes serológicos é a baixa sensibilidade, baixa especificidade e uma incapacidade para distinguir os animais que estiveram expostos anteriormente e os que apresentam infeção ativa (Pacheco *et al.*, 2007). Comercialmente estão disponíveis “kits” de ELISA que detetam animais infetados entre 30-60 dias pós-infeção, com

especificidade e sensibilidade que ronda os 85%. Os testes serológicos apresentam falsos-positivos devido à similaridade antigénica entre as corinebactérias (Motta *et al.*, 2010)

A relevância económica da CLA, a sua ocorrência generalizada, associada à falta de conhecimento sobre seus mecanismos patogénicos, levou à sua investigação, com o objetivo de desenvolver estratégias de tratamento eficazes contra esta doença (Baird e Fontaine, 2007).

1.3.2 Sarcoidose

A sarcoidose é uma doença multissistémica de etiologia ainda desconhecida. Um antígeno, mediado por células da resposta imunológica conduz a uma cascata de citocinas, à formação de granulomas sarcoides e eventualmente à fibrose sarcoidose (Asano, 2012).

A doença envolve múltiplos órgãos, tais como os gânglios linfáticos, os pulmões, olhos e pele. A cegueira, dificuldade de respiração e insuficiência cardíaca são as principais complicações da sarcoidose que podem interferir na vida diária (Asano, 2012).

No Japão, bactérias anaeróbias, tais como *Propionibacterium acne* e *P. granulosum* são considerados os agentes inféculos desta doença. Na Europa tem sido citada a associação entre sarcoidose e *Mycobacterium tuberculosis* (Asano, 2012).

Os granulomas da sarcoidose geralmente podem ser distinguidos de outras doenças, através das suas características acentuadas de delimitação, à falta de necrose central e à sua coloração com prata (Asano, 2012).

1.3.3 Tularemia

A tularemia é uma doença infécula aguda, causada por *Francisella tularensis*, um cocobacilo Gram-negativo. Esta doença encontra-se dispersa entre os animais selvagens como roedores, coelhos e lebres sendo letal para os animais (Asano, 2012).

O agente inféculo invade o hospedeiro, não só através de membranas mucosas, mas também através da pele, multiplicando-se no local da invasão. Em seguida o microrganismo migra para o gânglio através da drenagem linfática, induzindo a infeção durante a sua estadia (Asano, 2012).

As úlceras dérmicas são observadas até à segunda semana de infeção. A partir desta semana, aparecem no córtex e paracórtex, pequenos granulomas epitelióides com necrose central. Depois da sexta semana a necrose progride e o granuloma aparece na derme. O microrganismo é isolado após o segundo dia na área central necrótica do granuloma (Asano, 2012).

1.3.4 Tuberculose

A tuberculose do gânglio linfático (linfadenite tuberculosa) é a forma mais comum de tuberculose extrapulmonar, e uma das causas mais frequentes de linfadenopatia (Asano, 2012).

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica, induzida pelo *M. tuberculosis* sendo este, clinicamente, a principal causa da formação de granulomas, caracterizando-se pela presença de necrose caseosa central. Tipicamente existe uma zona central de detritos granulares caseosos amorfos rodeada por células epitelióides, linfócitos, histiócitos e fibroblastos. Os granulomas caseosos são normalmente o achado clássico em casos de tuberculose, embora também possam ocorrer granulomas não caseosos (Zumla e James, 1996).

Na maioria dos casos a doença é detetada clinicamente ou facilmente diagnosticada através da histologia (Totch *et al.*, 1996).

1.4 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular está a revolucionar a prática clínica de doenças infecciosas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica molecular mais utilizada até agora, e tem uma série de potenciais e aplicações clínicas incluindo a detecção de agentes patogénicos. Os métodos baseados em PCR podem ser mais eficazes do que os métodos tradicionais, uma vez que a técnica é altamente sensível e específica no diagnóstico. Porém tem como limitação o custo de implantação inicial, e eventuais reações cruzadas entre espécies geneticamente relacionadas (Yang e Rothman, 2004; Motta *et al.*, 2010).

Ao longo do tempo a PCR tem sido modificada para expandir a sua utilidade e versatilidade. De modo a melhorar a detecção foi desenvolvida a PCR “multiplex” (mPCR), sendo uma ferramenta poderosa e amplamente utilizada para a identificação rápida e específica de bactérias patogénicas, uma vez que permite a amplificação de múltiplos *loci* numa única reação (Pacheco *et al.*, 2007).

A amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPDs) é outro dos métodos descritos para a detecção de agentes patogénicos. Utilizam como “primer” um único oligonucleotídeo (10 bases) e sua sequência é desenhada aleatoriamente, o que resulta na amplificação de uma sequência alvo desconhecida. Tem como vantagem apresentar um custo mais baixo relativamente a outras técnicas, não necessita de trabalhos preliminares, facilidade

metodológica e a técnica necessita apenas de uma quantidade mínima de DNA para a análise (Castiglioni e Bicudo, 2003).

Os genes 16S e 23S rDNA são particularmente adequados como alvos para a identificação de microrganismos até mesmo a nível de espécie (Dvorská *et al.*, 2001). A sequência 16S rDNA é um dos marcadores moleculares mais utilizados para determinar relações filogenéticas de bactérias (Khamis *et al.*, 2004).

Outros dos ensaios desenvolvidos é a PCR em tempo real. Esta é capaz de detetar uma sequência específica durante a amplificação, não necessitando de tempo de processamento adicional para a análise. Este é um método fácil de usar e tem uma elevada sensibilidade (Coppens *et al.*, 2004).

Vários ensaios moleculares foram descritos para alguns dos agentes etiológicos de linfadenite granulomatosa como por exemplo a utilização de PCR com “primers” específicos para a deteção e identificação de micobactérias em diversos tipos de amostras clínicas (Zumla e James, 1996). A PCR em tempo real foi outro dos ensaios desenvolvido para diagnosticar e identificar os agentes causadores de linfadenite micobacteriana. “Primers” e sondas foram concebidos, permitindo o reconhecimento do género *Mycobacterium* e espécies *M. avium* e *M. tuberculosis* (Coppens *et al.*, 2004).

Ensaio como os RAPDs e 16S rDNA têm sido descritos como um método de identificação para espécies de *Nocardia* (Castiglioni e Bicudo, 2003), permitindo que a análise seja realizada em 1 ou 2 dias em comparação com o isolamento microbiológico que pode levar semanas. O 16S rDNA tem ainda facilitado a análise dos géneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* resultando numa melhor e mais fiável identificação das espécies (Rogall *et al.*, 1990, Pitulle *et al.*, 1992, Khamis *et al.*, 2004).

A PCR foi utilizada para detetar *Rhodococcus equi* tendo como grande vantagem o reconhecimento do fragmento de gene que codifica a região 16S do rDNA de *R. equi* sendo portanto uma técnica bastante específica (Arriaga *et al.*, 2002). Este ensaio não somente identifica microrganismos como também pode identificar estirpes virulentas pela amplificação de genes relacionados à virulência, como a identificação do gene *vapA*. Este diagnóstico pode ainda ser feito pela técnica de PCR “multiplex”, na qual se identifica estirpes de *R. equi* e se avalia a presença de genes *vapA*. A técnica apresenta assim as vantagens na diferenciação de isolados virulentos e avirulentos (Krewer *et al.*, 2008). Uma maior eficiência pode ser obtida pela PCR quantitativa em tempo real, para a deteção e quantificação de isolados de *R. equi* virulentos (*vapA*) (Harrington *et al.*, 2005).

A técnica de PCR “multiplex” foi também utilizada na identificação em espécies de *Streptococcus* confirmando a presença das bactérias nas amostras. Para além de ser uma ferramenta barata e rápida, a utilização de genes específicos torna-a numa técnica mais específica e sensível, quando comparada com as técnicas convencionais (Okada *et al.*, 2002, Pacheco *et al.*, 2007, Morávková *et al.*, 2008).

1.5 Objetivos

Ao longo da história, a vida selvagem tem atuado como reservatório de agentes infecciosos transmissíveis aos seres humanos e a outros animais. Atualmente as zoonoses, constituem um importante problema de saúde pública, afetando todos os continentes. Estão envolvidos centenas de agentes patogénicos e vários modos de transmissão diferentes.

O principal objetivo deste trabalho é desenvolver uma estratégia específica, confiável e rápida para a deteção de agentes etiológicos infecciosos implicados em linfadenite granulomatosa de animais selvagens através de técnicas de biologia molecular. O estudo foi realizado a partir de amostras de tecidos de saca-rabos, javalis e veados.

Deste modo os objetivos deste trabalho são:

- Estudar a ocorrência de género *Mycobacterium* através da técnica de PCR “multiplex”;
- Efetuar o rastreio da espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) “multiplex”;
- Estudar a ocorrência do género *Rhodococcus* através da técnica de PCR;
- Efetuar o rastreio molecular do género *Nocardia* para despistar possíveis casos de infeção por estes organismos;
- Estudar a ocorrência de *Emmonsia crescens* em animais suspeitos de adiospiromicose através da técnica de PCR;
- Relacionar os resultados da infeção com as variáveis demográficas;

Capítulo 2 – Material e Métodos

As amostras de gânglios linfáticos com o diagnóstico histopatológico de linfadenite granulomatosa eram provenientes de veados e javalis do distrito de Castelo Branco. Os animais selvagens eram provenientes de montarias e caçadas. Todos os animais foram sujeitos a avaliação anatômo-patológica e histopatológica por um médico veterinário experiente, antes da amostra ser incluída no presente trabalho. Relativamente aos animais foram registados os seguintes dados: sexo, idade, condição corporal. O sexo foi determinado pela observação dos órgãos sexuais internos. A idade foi determinada pelo exame à dentição. Os animais foram divididos em duas classes: maior que dois anos ou idade menor ou igual a dois anos. A condição corporal foi avaliada através da atribuição de “scores” em boa ou má condição corporal.

Neste estudo foram ainda estudados por biologia molecular sacarrabos com diagnóstico histopatológico de adiaspiromicose, provenientes do distrito de Castelo Branco. Todos os animais foram sujeitos a avaliação anatômo-patológica e histopatológica por um médico veterinário experiente, antes da amostra ser incluída no presente trabalho.

2.1 Extração de DNA a partir de tecidos

Nesta dissertação foram utilizadas amostras de DNA previamente extraídas a partir de tecidos e que se encontravam armazenadas a -20°C . Em seguida resume-se a técnica. A totalidade das amostras dos tecidos foi processada a nível laboratorial numa câmara de fluxo laminar de nível de biossegurança 2. A cada amostra, inicialmente, armazenada a -20°C retirou-se cerca de 20 mg de tecido, o qual foi macerado num almofariz, com recurso a azoto líquido. Posteriormente, colocou-se o macerado num tubo de 2 ml. Estes tubos foram conservados a -20°C até à realização da extração de DNA.

Realizou-se a extração de DNA a partir de alguns tecidos através do “kit” comercial “DNeasy Blood & Tissue Kit” (Qiagen®, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. De acordo com este “kit”, os ácidos nucleicos celulares ligam-se selectivamente à membrana de sílica da coluna de extracção e o DNA ligado à coluna sendo posteriormente lavados com um tampão adequado, para a eliminação de eventuais contaminantes celulares. Por fim, a diluição com baixa concentração salina vai possibilitar a libertação do DNA da membrana.

Homogeneizou-se aproximadamente 25 mg de tecido (gânglio mesentérico) num tubo de 1,5 ml, efectuando-se uma incubação a 56°C com 20 µl de proteinase K e 180 µl de tampão de lise (Buffer ATL), até se obter a lise completa dos tecidos. Adicionou-se, posteriormente, 200 µl de tampão de ligação (Buffer AL) e agitou-se vigorosamente recorrendo ao vórtex. Juntou-se 200 µl de etanol a 96% e homogeneizou-se a mistura. Combinou-se a coluna de extracção com o tubo de recolha, pipetou-se o total da mistura para a coluna e centrifugou-se durante 1 minuto a 6000g, à temperatura ambiente. Desprezou-se o fluído recolhido, combinou-se a coluna com o novo tubo de recolha. Adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem (Buffer AW1) e centrifugou-se durante 1 minuto a 6000g, à temperatura ambiente. Desprezou-se o fluído recolhido e combinou-se a coluna com um novo tubo de recolha. Realizou-se uma lavagem, durante 1 minuto a 20000g, com 500 µl de tampão de lavagem (Buffer AW2). Por fim eluiu-se o DNA extraído com 200 µl de tampão de eluição (Buffer AE) e centrifugou-se durante 1 minuto a 6000g. Depois de extraído, o DNA foi conservado a -20°C até posterior utilização.

2.2 Quantificação de DNA

Os ácidos nucleicos absorvem luz ultravioleta (UV) num comprimento de onda de 250 até 280 nm com um máximo de 260 nm. A leitura a 260 nm possibilita o cálculo da concentração de ácidos nucleicos na amostra. A razão entre a leitura de 260 e 280 permite estimar a pureza da amostra de ácidos nucleicos.

A quantificação de DNA foi executada no NanoDrop ND-1000® (NanoDrop Technologies) através da medição da absorvância a um comprimento de onda de 260. Para cada uma das amostras foram consideradas duas leituras, uma a 260 nm que permite quantificar e outra a 280 nm, pois a razão $A(260)/A(280)$ permite estimar a pureza do DNA. A fórmula $I(A260)=50 \mu\text{g/ml}$ foi seguida para efectuar a quantificação do DNA.

2.3 Amplificação

2.3.1 Reação de PCR 16S rDNA para o género *Mycobacterium*

Todas as amostras foram inicialmente testadas por uma técnica de PCR 16S rDNA modificada por Moravkova *et al.* (2008). A reação de amplificação foi realizada com um volume final de 20µl por reação, misturando-se 3µl de DNA genómico, 1µl de cada “primer” (10µM), 10µl de *Taq PCR Master Mix* (Qiagen®, Hilden, Germany) e 3µl de água ultrapura

(Qiagen®) para perfazer o volume. As sequências dos “primers” utilizados encontram-se na tabela 1.

As misturas de reação foram de seguida colocadas num termociclador (BIO RAD® MyCycler Thermal Cycler) a condições de temperatura e ciclos adequados (Tabela 2). O produto de amplificação foi conservado a 4° C até à realização da eletroforese.

Tabela 1 “Primers” específicos para o género *Mycobacterium*

Nome “Primer” específico	“Primer” específico (3’-5’)
MYCGEN-F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
MYCGEN-R	TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA
MYCAV-R	ACC AGA AGA CAT GCG TCT TG
MYCINT-F	CCT TTA GGC GCA TGT CTT TA

Tabela 2 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio 16S rDNA

Ciclos	Temperaturas	Tempos
1	94°C	1 min.
	94°C	1 min.
35	62°C	2 min.
	72°C	1 min.
1	72°C	10 min.

Esta técnica permite a identificação do género *Mycobacterium* pela presença de uma banda de 1030pb e permite também a distinção entre *M. avium* (180 pb) e *M. intracellulare* (850 pb).

2.3.2 Reação de PCR “multiplex” para a identificação de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Para a identificação de *Corynebacterium pseudotuberculosis* segundo Cetinkaya *et al.* (2002) e Khamis *et al.* (2004), realizou-se uma reação multiplex com um volume final de 20µl, misturando-se 3µl de DNA genómico, 1µl de cada “primer” (10µM), 10µl de Taq PCR *Master Mix* (Qiagen®, Hilden, Germany) e 3µl de água ultrapura (Qiagen®) para perfazer o volume. As sequências dos primers utilizados encontram-se na tabela 3.

De seguida as misturas de reação foram colocadas num termociclador (BIO RAD® MyCycler Thermal Cycler) a temperaturas e ciclos adequados (Tabela 4). O produto foi guardado a 4°C até à realização da eletroforese.

Tabela 3 “Primers” específicos no ensaio PCR “multiplex” para *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Nome “Primer” específico	“Primer” específico (3’-5’)
16S-F	ACCGCACTTTAGTGTGTGTG
16S-R	TCTCTACGCCGATCTTGTAT
C2700F	CGTATGAACATCGGCCAGGT
C3130R	TCCATTTGCGCCGAAGCGCTG

Tabela 4 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio PCR “multiplex”

Ciclos	Temperaturas	Tempos
1	95°C	3min.
	95°C	1min.
40	58°C	40s
	68°C	1min.30s
1	68°C	7min.

A técnica permite a identificação de espécies de *Corynebacterium* pela presença de uma banda de 816 pb e de uma banda de 446pb.

2.3.3 Reação de PCR 16S rDNA para a deteção de *Rhodococcus equi*

Para a identificação de *Rhodococcus equi* segundo Arriaga *et al.* (2002), realizou-se uma reação com um volume final de 20µl, misturando-se 3µl de DNA genómico, 2µl de cada “primer” (10µM), 10 µl de *Taq PCR Master Mix* (Qiagen®, Hilden, Germany) e 3µl de água ultrapura (Qiagen®) para perfazer o volume. As sequências dos primers utilizados encontram-se na tabela 5.

As misturas de reação foram colocadas de seguida num termociclador (BIO RAD® MyCycler Thermal Cycler) a temperaturas e ciclos adequados (Tabela 6). O produto foi guardado a 4°C até à realização da eletroforese.

Tabela 5 “Primers” específicos para *Rhodococcus equi*

Nome “Primer” específico	“Primer” específico (3’-5’)
RF	TCCAGAAGCGGGATGAGGATTC
RR	TTC ACC GCT ACA CCA GGA AT

Tabela 6 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio PCR 16S rDNA

Ciclos	Temperaturas	Tempos
1	95°C	2min.
25	94°C	20s
	62°C	40s
1	72°C	10min.

Esta técnica permitiu a identificação de *Rhodococcus equi* pela presença de uma banda a 700 pb.

2.3.4 Reação de PCR para a detecção de *Nocardia*

Para a identificação de *Nocardia* segundo Laurent *et al.* (1999) e Wada *et al.* (2003), realizou-se uma reação com um volume final de 20µl, misturando-se 3µl de DNA genómico, 1µl de cada “primer” (10µM), 10 µl de *Taq PCR Master Mix* (Qiagen®, Hilden, Germany) e 3µl de água ultrapura (Qiagen®) para perfazer o volume. As sequências dos “primers” utilizados encontram-se na tabela 7.

As misturas de reação foram colocadas de seguida num termociclador (BIO RAD® MyCycler Thermal Cycler) a temperaturas e ciclos adequados (Tabela 8). O produto foi guardado a 4°C até à realização da eletroforese.

Tabela 7 “Primers” específicos para *Nocardia*

Nome “Primer” específico	“Primer” específico (3’-5’)
NG1	ACC GAC CAC AAG GGGG
NG2	GGT TGT AAA CCT CTT TCG A
NF	CGT GCT TAA CAC ATG CAAGT
NR	TTC ACC GCT ACA CCA GGA AT

Tabela 8 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio PCR 16S rDNA

Ciclos	Temperaturas	Tempos
1	94°C	11 min.
30	94°C	1 min.
	55°C	20s
	72°C	1 min.
1	72°C	1 min.

Através desta técnica foi possível a identificação de *Nocardia*, pela presença de uma banda de 600pb e de uma banda de 620pb.

2.3.5 Reação de PCR para a detecção de *Emmonsia crescens*

A reação de amplificação para *Emmonsia crescens* segundo Dot *et al.* (2009), foi realizada para um volume final de 20µl por reação, misturando-se 3µl de DNA genômico, 2µl de cada “primer” (10µM), 10 µl de *Taq PCR Master Mix* (Qiagen®, Hilden, Germany) e 3µl de água ultrapura (Qiagen®) para perfazer o volume. As sequências dos primers utilizados encontram-se na tabela 9.

A PCR foi executada num termociclador (BIO RAD® MyCycler Thermal Cycler) a temperatura e ciclos adequados (Tabela 10). O produto de amplificação foi guardado a 4°C até à realização da eletroforese.

Tabela 9 “Primers” específicos para *Emmonsia crescens*

Nome “Primer” específico	“Primer” específico (3’-5’)
His3	GTCGTAACAAGGTTTC CGTAG
His4	AGCGGGTATCCCTACCTGAT

Tabela 10 Ciclos, temperaturas e tempos utilizados no ensaio 16S rDNA

Ciclos	Temperaturas	Tempos
1	94°C	1 min.
30	94°C	1 min.
	58°C	40s
	72°C	1 min.
1	72°C	5 min.

A técnica permite a identificação de *Emmonsia crescens* pela presença de uma banda de 613pb.

2.4 Eletroforese

Após a realização da PCR, os produtos de amplificação do ensaio 16S rDNA foram submetidos a eletroforese num gel de agarose a 1% (p/v), em tampão de Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, deixando-se ferver a mistura até obter a dissolução completa da agarose e adicionando 3µl de solução de brometo de etídio (0,4µg/µL). De seguida o conteúdo foi vertido para um suporte com pente, deixando-se arrefecer até à polimerização.

Depois da preparação do gel, este foi colocado numa tina de eletroforese, cobriu-se com tampão de eletroforese (TBE), até ficar completamente submerso. Em parafilme colocou-se 3µl de solução de deposição e 11µl de DNA, sendo o volume final colocado em cada poço do gel. Este processo foi também efetuado para os controlos positivos e negativos. Nos extremos do gel colocou-se um marcador de peso molecular GeneRuler (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder)

A separação dos fragmentos foi efetuada mediante eletroforese horizontal em géis de agarose com uma voltagem constante de 100V, durante cerca de 80 minutos. Após a eletroforese a visualização dos produtos obtidos efetuou-se mediante um transiluminador de luz ultravioleta (VilbertLourmat®), conectado a um sistema informático de tratamento de imagens (Programa BioCapt® version 99.02 for Windows).

O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foram calculados em função da sua migração, quando comparada com a migração dos fragmentos do marcador de peso molecular (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 pb).

2.5 Análises de dados

O teste de qui-quadrado foi utilizado para determinar se as variáveis demográficas se encontravam associadas à deteção de agentes infécciosos em linfadenite granulomatosa por biologia molecular. A análise foi feita com recurso ao programa informático SPSS 19.0. Uma probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada como estatisticamente significativa.

Capítulo 3 – Resultados

3.1 Diagnóstico diferencial de linfadenite granulomatosa de etiologia infecciosa e parasitária em 46 ungulados

Neste trabalho foram estudados 46 gânglios linfáticos provenientes de 46 ungulados que apresentavam lesões do tipo linfadenite granulomatosa. Destes animais, 21 (45,7%) eram javalis e 25 (54,3%) eram veados. Quanto ao sexo, 17 (37,0%) eram machos e 29 (63,0%) eram fêmeas. Relativamente à idade, 50% tinham idade igual ou inferior a 2 anos e, 50% tinham idade superior. A maioria dos animais (69,6%; n=32) apresentava má condição corporal.

A distribuição dos géneros detectados por biologia molecular por espécies encontra-se no gráfico 1.

O género *Mycobacterium* foi detetado por PCR em 60,9% (n=28) gânglios. O género *Nocardia* e o género *Corynebacterium* foram detectados, cada um, em 15,2% (n=7). Nenhum gânglio foi positivo para *Rhodococcus* spp.

Quer nos javalis quer nos veados foram detetados por PCR três géneros diferentes. A deteção de *Mycobacterium* spp. foi superior em veados do que em javalis. A diferença foi estatisticamente significativa (P=0,001).

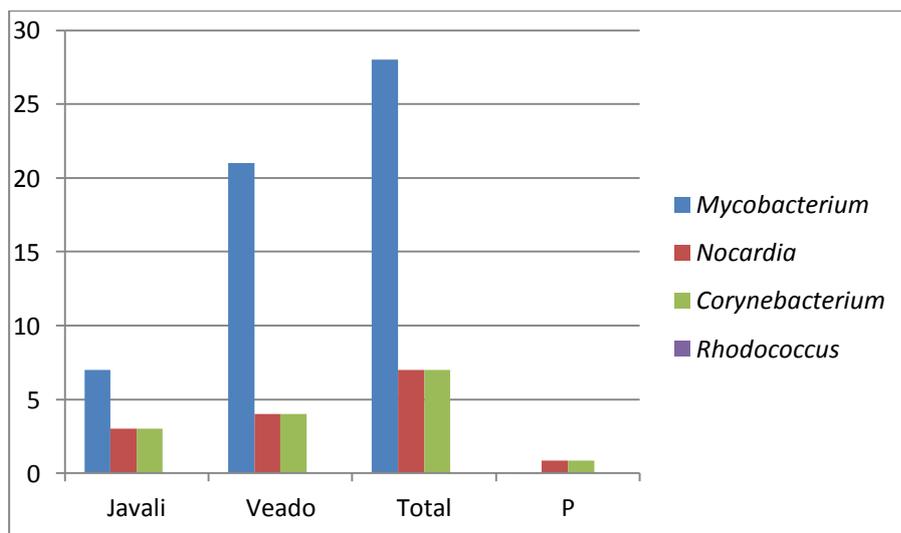


Fig. 1 Distribuição dos géneros detetados nos gânglios linfáticos por espécies

Relativamente ao género *Mycobacterium* spp. a taxa de detecção foi superior em machos que em fêmeas mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,533$). Quanto à idade, a detecção foi superior nos indivíduos com mais de 2 anos (40,0%) e com má condição corporal (45,7%), não sendo as diferenças significativas ($P=0,130$ e $P=0,345$, respectivamente) (Tabela 11).

Tabela 11 Taxa de detecção de *Mycobacterium* spp. de acordo com as variáveis demográficas dos animais

	Positivo	Negativo	P
Sexo			0,533
Macho	19 (41,3%)	10 (21,7%)	
Fêmea	9 (19,6%)	8 (17,4%)	
Idade			
Menor ou igual a 2 anos	11 (23,9%)	12 (26,1%)	0,130
Superior a 2 anos	17 (40,0%)	6 (13,0%)	
Condição corporal			0,345
Boa	7 (15,2%)	7 (15,2%)	
Má	21 (45,7%)	11(23,9%)	

Quanto à taxa de detecção de *Nocardia* spp. a maior percentagem de positivos ocorreu em machos, embora as diferenças não fossem estatisticamente significativas ($P=0,234$) (Tabela 12). Relativamente à idade ocorreu maior detecção em animais com idade superior a 2 anos. As diferenças não foram significativas ($P=0,500$). A taxa de detecção foi superior em animais com boa condição corporal. As diferenças foram estatisticamente significativas ($P=0,020$).

Tabela 12 Taxa de detecção de *Nocardia* spp. de acordo com as variáveis demográficas dos animais

	Positivo	Negativo	P
Sexo			0,234
Macho	6 (13,0%)	23 (50,0%)	
Fêmea	1 (2,2%)	16 (34,8%)	
Idade			0,500
Menor ou igual a 2 anos	3 (6,5%)	20 (43,5%)	
Superior a 2 anos	4 (8,7%)	19 (41,3%)	
Condição corporal			0,020
Boa	5 (10,8%)	9 (19,6%)	
Má	2 (4,4%)	30 (65,2%)	

Relativamente à taxa de detecção de *Corynebacterium* spp. a maior percentagem de positivos ocorreu em machos, embora as diferenças não fossem estatisticamente significativas ($P=0,612$) (Tabela 13). Quanto à idade ocorreu maior detecção em animais com idade superior a 2 anos. As diferenças não foram significativas ($P=0,681$). A taxa de detecção foi superior em animais com má condição corporal. As diferenças não foram estatisticamente significativas ($P=0,658$).

Tabela 13 Taxa de detecção de *Corynebacterium* spp. de acordo com as variáveis demográficas dos animais

	Positivo	Negativo	P
Sexo			0,612
Macho	5 (10,8%)	24 (52,2%)	
Fêmea	2 (4,4%)	15 (32,6%)	
Idade			0,681
Menor ou igual a 2 anos	3 (6,5%)	20 (43,5%)	
Superior a 2 anos	4 (8,7%)	19 (41,3%)	
Condição corporal			0,658
Boa	3 (6,5%)	11 (23,9%)	
Má	4 (8,7%)	28 (60,9%)	

Quatro (8,7%) gânglios linfáticos foram simultaneamente positivos ao género *Mycobacterium* e ao género *Nocardia*. Quatro (8,7%) gânglios foram simultaneamente positivos ao género *Mycobacterium* e ao género *Corynebacterium*. Três (6,5%) amostras foram simultaneamente positivas a *Nocardia* e a *Corynebacterium* (Tabela 14). Três amostras foram simultaneamente positivas aos 3 géneros. As 3 amostras pertenciam a veados machos.

Tabela 14 Comparação entre a deteção simultânea de diferentes géneros

	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Nocardia</i> spp.
<i>Nocardia</i> spp.	4 (8,7%)	3 (6,5%)	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	4 (8,7%)	-	-
<i>Mycobacterium</i> spp.	-	-	-

3.2 Deteção de *Emmonsia crescens* por métodos moleculares

Neste estudo foram analisados catorze saca-rabos e destes apenas três apresentaram linfadenite granulomatosa compatível com adiaspiromicose conforme o observado previamente em análise anátomo-patológica. Destes 50% eram fêmeas e 50% eram machos. Dez animais (71,4%) tinham idade igual ou inferior a 2 anos. A maioria dos animais (78,6%) apresentava uma boa condição corporal. Na anatomia patológica, foi observada pneumonia parasitária em 3 (21,4%). *Emmonsia crescens* foi detetada por biologia molecular num macho de 3 anos, com boa condição corporal (Figura 1).

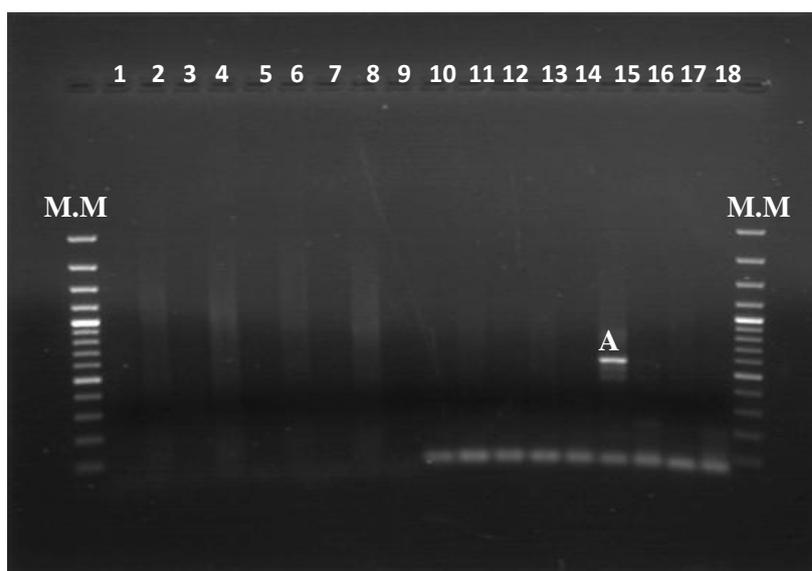


Fig. 2:Deteção de *Emmonsia crescens* através de PCR (M.M- marcador moléculas; 1-18 - amostras A- amostra positiva)

Capítulo 4 – Discussão

As mudanças ambientais e as alterações ecológicas causadas por fenómenos naturais ou por intervenção humana, são considerados fatores importantes na emergência e reemergência de doenças infecciosas e têm gerado interesse na investigação, assim como, na preocupação com a conservação da biodiversidade a nível global. Existem vários fatores que facilitam a transmissão de agentes infecciosos, entre estes deve-se realçar uma maior interação entre os seres humanos e a vida selvagem (Richini-Pereira *et al.*, 2010). A deteção de linfadenite granulomatosa é difícil, uma vez que a identificação clínica precoce dos animais infetados é um grande obstáculo. O diagnóstico baseia-se essencialmente em testes *post mortem*, como o exame macroscópico e histopatológico das lesões, técnicas microbiológicas e moleculares (Sobestiansky *et al.*, 1999, Lara *et al.*, 2011).

Nos últimos dois anos verificou-se um aumento considerável do número de infeções por *Mycobacterium* em veados selvagens e javalis (Aranaz *et al.*, 2004, Parra *et al.*, 2013). Provavelmente porque aumentou a investigação destes agentes na referida espécie. Estas infeções também foram relatadas nestas espécies em regiões de Portugal continental, e ainda em bovinos, aumentando a suspeita de uma possível transmissão para animais selvagens ou *vice-versa* (Cunha *et al.*, 2012).

O valor elevado de ocorrência de casos detetados por biologia molecular (60,9%) no presente trabalho, mostra a dimensão do problema.

Parra *et al.*, (2003), num estudo realizado em Espanha, isolou *M.bovis* em 37 javalis que apresentavam diferentes graus de lesões granulomatosas nos gânglios linfáticos. Todos os isolados foram identificados com base nas suas características macroscópicas e testes bioquímicos convencionais, e a sua identidade foi confirmada por PCR.

No Monte de El Pardo, em Espanha foi também encontrada infeção por *M.bovis* em espécies selvagens como veados, gamos, javali, lebre, lince ibérico e animais domésticos. As amostras eram provenientes de animais encontrados mortos ou doentes terminais que apresentavam lesões visíveis compatíveis com tuberculose. A identificação dos animais infetados por *M. bovis* foi analisada por cultura e a sua identificação foi realizada por PCR (Aranaz *et al.*, 2004).

A infeção por *M. bovis* foi ainda relatada em Nova Zelândia e Itália. No norte de Itália têm sido referidos vários casos de lesões compatíveis com tuberculose após exames anatomopatológicos de javalis selvagens. Um estudo realizado em Nova Zelândia também

constatou infecção por *M. bovis* em javalis que apresentavam lesões nos pulmões e brônquios (Serraino *et al.*, 1999; Wakelin e Churchman, 1991).

Considera-se que as lesões granulomatosas nos nódulos linfáticos, são típicas de uma infecção por micobactérias, contudo, outros agentes infecciosos originam este tipo de lesões. No presente estudo não se detetou a presença de *Rhodococcus equi* em animais com linfadenite granulomatosa. No entanto, *Rhodococcus equi* pode ser isolado de lesões em nódulos linfáticos submaxilares, principalmente em suínos, com linfadenite granulomatosa (Prescott 1991, Takai *et al.*, 1996, Komijn *et al.*, 2007).

Komijn *et al.* (2007), realizaram um estudo na Holanda, para determinar a prevalência de lesões granulomatosas em suínos. Foram selecionados um número considerável de gânglios linfáticos com e sem lesões granulomatosas, para exame patológico e bacteriológico para *Mycobacterium avium* subsp. *avium* e *R. equi*, sendo a identificação de *R. equi* realizada por PCR. Os testes foram todos negativos para micobactérias, incluindo *M. avium*. Contudo, *R. equi* foi isolada em 44 de 98 dos gânglios linfáticos submaxilares com lesões granulomatosas, e a partir de dois gânglios linfáticos mesentéricos, de 160 examinados, em que não foram verificadas lesões durante o exame (Komijn *et al.*, 2007).

A prevalência de *R. equi* e micobactérias atípicas, em gânglios linfáticos de suínos e bovinos, sem sinais clínicos foi estudada na República Checa. Dos 492 suínos, *R. equi* foi isolado a partir de gânglios linfáticos submaxilares com uma frequência de 19,5%, micobactérias atípicas foram isoladas em 30,1% e infecção mista em 4,9%. Por outro lado de 639 suínos, *R. equi* só foi isolado de gânglios linfáticos mesentéricos em 0,5% dos animais. Estes resultados estão de acordo com relatos já supracitados anteriormente, que indicam que o isolamento de *R. equi* é mais frequente nos gânglios linfáticos submaxilares (Dvorska *et al.*, 1999).

Lara e seus colaboradores (2011) investigaram a ocorrência de microrganismos nos gânglios linfáticos, com ou sem lesões em suínos e javalis. *R. equi*, *Mycobacterium* spp e outros microrganismos foram investigados em gânglios linfáticos de 258 suínos e 120 javalis. As amostras foram submetidas a exame microbiológico e colônias sugestivas de *Mycobacterium* spp foram submetidas a análise molecular. Em suínos com linfadenite, os microrganismos encontrados com mais predominância foram *Mycobacterium* spp (24,1%) e *R. equi* (13,2%), já em javalis os microrganismos predominantes foram *Streptococcus* (10,0%), *Mycobacterium* spp (8,4%) e *R. equi* (6,6%) (Lara *et al.*, 2011).

No presente estudo o género *Corynebacterium* spp. e *Nocardia* foram detetados, por biologia molecular em igual percentagem, com 15,2%.

Os membros do género *Corynebacterium* têm sido identificados em países onde existem grandes criações de pequenos ruminantes como na Austrália, na Europa, África e no norte e sul da América (Costa, 2002; Baird e Fontaine, 2007).

Num estudo realizado em Espanha por Notario e colaboradores (2010), investigou-se a presença de várias espécies bacterianas em javalis que apresentavam anomalias externas e alterações anatomopatológicas (gânglios linfáticos, abscessos e presença de endoparasitas). Foram realizadas análises bacteriológicas num total de 229 javalis, sendo isoladas e identificadas várias espécies inclusive *Corynebacterium* com uma prevalência de 4,8% (Notario *et al.*, 2010). Este resultado não pode ser comparado com o presente estudo uma vez, que o nosso foi efetuado com recurso a análise molecular e não cultura.

Normalmente a maior parte dos diagnósticos baseiam-se em exames microbiológicos seguidos pela identificação bioquímica dos isolados. Pacheco *et al.* (2007), no seu estudo, para detetar *C. pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos, utilizou a PCR “multiplex, visando três genes: o gene 16S rDNA, *rpoB* e *pld*. O ensaio mostrou-se eficiente e suficiente para diferenciar *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans* (Pacheco *et al.*, 2007).

Em ungulados selvagens as infeções por *Nocardia* spp foram relatadas em renas (Vemireddi *et al.*, (2007), lamas (Chang *et al.*, 1993) e gazelas (Domenis *et al.*, 2009). Em todos estes animais foram identificadas lesões piogranulomatosas, provavelmente devido ao mau estado de saúde dos animais ou o agente causar este tipo de lesão nestas espécies.

Leger *et al.*, (2009), na América do Norte, isolaram *Nocardia* spp a partir de graves lesões que se revelaram fatais em mamíferos marinhos. Nocardiose foi confirmada por cultura bacteriana em cinco de nove casos avaliados em pinípedes livres na natureza e seis de dez casos em cetáceo. Para a confirmação e identificação das espécies realizou-se a PCR em diferentes órgãos. Os órgãos mais afetados foram os pulmões e gânglios linfáticos torácicos (Leger *et al.*, 2009).

No presente trabalho foram detetadas infeções simultâneas. Quatro (8,7%) dos gânglios linfáticos foram simultaneamente positivos ao género *Mycobacterium* e ao género *Nocardia*, também 8,7% dos gânglios linfáticos foram positivos ao género *Mycobacterium* e ao género *Corynebacterium* e 6,5% das amostras foram positivas a *Nocardia* e a *Corynebacterium*.

Shitaye *et al.* (2006), isolaram uma infecção simultânea de micobacteriose e *R. equi* em suínos com uma prevalência de 62%. A positividade variou entre 44% em 1997 e 73% em 2004. Num estudo semelhante Pate e seus colaboradores em 2004, também encontraram algumas infecções mistas, em 10 casos *R. equi* foi isolado juntamente com *M. avium*, em dois casos com *M. terrae* e em mais dois casos com espécies de micobactérias indeterminadas (Pate *et al.*, 2004).

Emmonsia crescens é um fungo muito difundido na Europa. Vulgarmente é isolado do solo mas também de vários pequenos mamíferos, tais como roedores (Kim *et al.*, 2012). No presente estudo foram analisados catorze saca-rabos, no entanto apenas três apresentaram linfadenite granulomatosa compatível com adiaspiromicose. *Emmonsia crescens* foi detetado num macho de três anos, com boa condição corporal.

Num estudo realizado por Leighton e Wobeser, (1978), no Canadá, foi encontrada uma infecção por *Emmonsia crescens* em esquilos selvagens. A infecção foi mais comum em adultos do que em jovens de cerca de um ano de idade. O mesmo fungo foi também isolado em Inglaterra, através de um exame anatomopatológico de uma lontra imatura que morrera em estado selvagem. O exame histológico revelou um grande número de estruturas fúngicas e uma resposta inflamatória bastante severa. Considerou-se que a insuficiência respiratória foi a principal causa de morte da lontra (Simpson e Gavier–Widen, 2000).

Também Morner *et al.* (1999), isolaram no seu estudo *Emmonsia crescens* num castor europeu, no norte da Suécia. O animal estava em boa condição corporal e não foram observados sinais de doença, sendo este o primeiro relatório de adiaspiromicose em castores europeus.

Um outro estudo foi efetuado em guaxinins no noroeste dos Estados Unidos, com base em achados morfológicos e histoquímicos sendo detetada adiaspiromicose com uma prevalência de 8%. No entanto, é provável que maior prevalência fosse obtida se várias secções dos pulmões fossem avaliadas, uma vez que foi examinada apenas uma pequena área do pulmão (Hamir, 1999).

Em Portugal existe o relato de um caso de adiaspiromicose pulmonar devido a *Emmonsia crescens* num ouriço europeu que foi encontrado morto. O qual pode ter-se infetado como resultado da inalação de esporos encontrados no solo (Seixas *et al.*, 2006).

A PCR é uma das técnicas mais utilizadas atualmente para diversos fins, uma vez que permite detetar pequenas quantidades de DNA e ser muito rápida, comparativamente com outras técnicas (Miranda, 2010).

É fundamental obter DNA de boa qualidade para obter bons resultados. Neste trabalho nem sempre os resultados foram os esperados, tal poderá dever-se ao método de extração realizado, à distribuição das bactérias nos gânglios linfáticos não ser uniforme e ao próprio órgão utilizado dificultar a extração (Garrido *et al.*, 2000; Biase *et al.*, 2002; Slana *et al.*, 2010).

O uso de métodos moleculares, nomeadamente a 16S rDNA tem facilitado uma circunscrição dos géneros, resultanto numa melhor e mais confiável identificação de espécies bacterianas (Khamis *et al.*, 2004).

Neste estudo, o ensaio 16S rDNA mostrou ter alguma eficiente na deteção de *Mycobacterium* spp, *Nocardia* spp e *Emmonsia crescens*, uma vez que foram obtidos resultados positivos, o que demonstra que a técnica funciona. A deteção de *Emmonsia crescens* em saca-rabos, por método molecular, sem uma prévia cultura fungica é o primeiro caso relatado, segundo pesquisas bibliograficas.

De modo a melhorar este estudo, para deteção de *Corynebacterium* spp utilizou-se a PCR “multiplex”. Este ensaio foi capaz de detetar de modo rápido e fiável *Corynebacterium* spp em sete unglados o que ilustra a sua reprodutibilidade e sensibilidade elevada.

A principal vantagem deste ensaio é a utilização de genes específicos para distinguir *Corynebacterium* de outras bactérias filogeneticamente similares, e além disso, este teste possibilita a utilização do DNA extraído diretamente de amostras clínicas. Os genes alvo da reação são: 16S rDNA, que é um género conservado em géneros bacterianos, o *rpoB*, gene relacionado a estudos filogenéticos de microrganismos dos géneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* e o gene *pld*, que codifica a exotoxina PLD (Pacheco *et al.*, 2007).

A ausência de amplificação por vezes verificada no presente estudo pode ser atribuída à presença de inibidores da *Taq polimerase* (Erume *et al.*, 2001).

Apesar de eficientes, as técnicas de PCR utilizadas neste trabalho a partir de tecidos requerem pesquisas adicionais para uma melhor otimização, uma vez que os relatos de identificação de bactérias diretamente de tecidos, sem cultura anterior são poucos (Slana *et al.*, 2010). Existem outros métodos como a PCR em tempo real, que podem mostrar-se vantajosos para a deteção de infeções diretamente do material analisado, nomeadamente de tecidos, no entanto apresentam um elevado custo (Moravkova *et al.*, 2008).

A identificação exata do agente causador da uma doença, permite a introdução de medidas preventivas para o controlo da infeção nos animais (Moravkova *et al.*, 2008).

Portanto são necessários estudos posteriores que permitam um diagnóstico fácil e rápido, no menor espaço de tempo possível.

Capítulo 5 – Conclusão

Há um grande número de animais selvagens em todo o mundo e a diversidade de espécies selvagens é imensa. Populações de animais selvagens são o principal reservatório de agentes patogénicos e por isso, tornam-se em objetos de estudo em todo o mundo nas últimas décadas, uma vez que tem impacto significativo sobre a saúde humana, produção agrícola, economias com base na vida selvagem e na conservação da vida selvagem.

Tendo em conta os objetivos definidos para este estudo pode concluir-se que: o exame *post mortem* revela-se muito útil na identificação das lesões a nível macroscópico no diagnóstico e estudo epidemiológico, no entanto é necessário combiná-lo com outras técnicas para uma maior eficiência.

No presente estudo, foram detetados por biologia molecular três géneros diferentes: *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* quer em veados quer em javalis e *Emmonsia crescens* em saca-rabos. Estes resultados fornecem, portanto, evidências da presença de diferentes agentes infecciosos em animais silvestres com linfadenite granulomatosa em Portugal.

Os casos de infeções detetados neste estudo por técnicas moleculares, nomeadamente a 16S rDNA e PCR “multiplex” revelaram um elevado valor no diagnóstico de infeções, pois mostraram-se úteis para a identificação e determinação da prevalência de *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* spp e *Rhodococcus equi* em veados e javalis, e *Emmonsia crescens* em saca-rabos. Esta estratégia oferece vantagens, pois os métodos utilizados mostram ser independentes de cultura bacteriana, havendo deste modo uma redução do tempo de análise.

Em suma, a técnica de PCR mostrou-se um método simples, rápido e barato no diagnóstico de linfadenite granulomatosa, no entanto são ainda necessários estudos posteriores de forma a aprofundar os resultados obtidos. É necessário continuar o processo de otimização da técnica de PCR, recorrendo numa primeira fase à descontaminação correta das amostras, apesar de a técnica ter revelado elevado valor de diagnóstico. Seria ainda interessante em trabalhos futuros sequenciar as amostras de DNA de forma a comprovar a presença e identificação dos agentes patogénicos.

A PCR em tempo real, apesar de cara para diagnóstico de rotina devido ao alto custo por amostra testada, poderá também ser uma boa solução para realizar no futuro.

Bibliografia

1. Aranaz A, Juan L, Montero N, Sánchez C, Galka M, Delso C, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Vela AI, Briones V, Mateos A, Domínguez L (2004). Bovine Tuberculosis *Mycobacterium bovis* in Wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 42(6): 2602-2608.
2. Arriaga JM, Cohen ND, Derr JN, Chaffin MK, Martens RJ (2002). Detection of *Rhodococcus equi* by polymerase chain reaction using species-specific nonproprietary primers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14(4): 347-353.
3. Asano S (2012) Granulomatous Lymphadenitis. *Journal of Clinical Experimental Hematopathology* 52(1): 1-16.
4. Baird GJ, Fontaine MC (2007). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *Journal of Comparative Pathology*, 137(4): 179-210.
5. Batey RG (1986). Lesions of the head in ovine caseous lymphadenite. *Australian Veterinary Journal* 63(4): 131.
6. Belchior SE, Gallardo A, Abalos A, Jodor N, Jensen O (2006). Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Revista Veterinaria Argentina* 23(224): 258-278.
7. Benham CL, Seaman A, Woodbine M (1962). *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. *Veterinary Bulletin* 32: 645-657.
8. Biase FH, Franco MM, Goulart LR, Antunes RC(2002) . Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. *Genetics and Molecular Biology* 25(3): 313-15.
9. Bidaud P, Hébert L, Barbey C, Appourchaux AC, Torelli R, Sanguinetti M, Laugier C, Petry S (2012). *Rhodococcus equi* 's extreme resistance to hydrogen peroxide is mainly conferred by one of its four catalase genes. *Plos One* doi:10.1371/journal.pone.0042396.
10. Brock TD, Madigan MT (1991) The Bacteria. In: Prentice-Hall Tnternational (ed). *Biology of Microorganisms*, 6ª edição. Englawood Cliffs, Estados Unidos da América, 785-786.
11. Brown JM, Pham KN, McNeil MM, Lasker BA (2004). Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. *Journal of Clinical Microbiology* 42(8): 3655- 3660.
12. Castiglioni L, Bicudo HE (2003). A Técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e suas aplicações para estudos em genética molecular. *Revista UNORP* 3(2): 63-77.
13. Cetinkaya B, Karahan M, Atil E, Kalin R, Baere T, Vaneechoutte M (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology* 88: 75-83.
14. Chang CD, Boosinger TR, Dowling PM, McRae EE, Tyler JW (1993). Nocardiosis in llama. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5(4): 631-634.
15. Chirino-Z´arraga C, Scaramelli A, Rey-Valeirón C (2006). Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research* 65(1):170–175.
16. Chiu J, Wobeser G, Bollinger T (2009). Granulomatous inflammation in retropharyngeal lymph nodes of wild cervids in saskatchewan. *Journal of Wildlife Diseases* 45(3): 625-630.

17. Conville PS, M.S, Witebsky GF (2004). Current issues pertaining to the *Nocardia* species. *Clinical Microbiology Newsletter* 26(8): 57-62.
18. Conville PS, M.S, Witebsky GF (2010). The complexity of *Nocardia* Taxonomy: implications for the clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter* 32(16): 119-125.
19. Copenraet ES, Lindeboom JA, Prins JM, Peeters MF, Claas EC, Kuijper EJ (2004). Real-Time PCR assay using fine-needle aspirates and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children. *Journal of Clinical Microbiology* 42(6): 2644-2650.
20. Corti ME, Fioti MFV (2003). Nocardiosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases* 7(4): 243-250.
21. Costa LFM (2002). *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the ethiological agente of the caseous lymphadenitis in goats. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* (1)1: 105-115.
22. Cunha MV, Matos F, Cantos A, Albuquerque T, Alberto JR, Aranha JM, Pinto MV, Botelho A (2012). Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: Amolecular epidemiology perspective. *Research in Veterinary Science* 92(2): 225-235.
23. Domenis L, Pecoraro P, Spedicato R, Corvonato M, Peletto S, Zuccon F, Acutis P (2009). *Nocardia otitidiscaviarum* Pneumonia in an Alpine Chamois (*Rupicapra rupicapra rupicapra*). *Journal of Comparative Pathology* 14(1): 70-73.
24. Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis. *Veterinary Research* 37(2): 201–218.
25. Dot JM, Debourgogne A, Champigneulle J, Salles Y, Brizion M, Puyhardy JM, Collomb J, Ple´nat F, Machouart M (2009). Molecular diagnosis of disseminated adiaspiromycosis due to *Emmonsia crescens*. *Journal of Clinical Microbiology* 47(4): 1269-1273.
26. Dvorska L, Parmova I, Lavickova M, Bartl J, Vrbas V, Pavlik I (1999). Isolation of *Rhodococcus equi* and atypical mycobacteria from lymph nodes of pigs and cattle in herds with the occurrence of tuberculoid gross changes in the Czech Republic over the period of 1996-1998. *Veternarni Medicina* 44(11): 321–330.
27. Dvorská L, Bartos M, Martin G, Erler W, Pavlík I (2001). Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular. *Veterinary Medicine* 46(11-12): 309-328.
28. Edward J. Bottone, Ph.D (2011). Histologic diagnosis of cutaneous adiaspiromycosis in the absence of successful culture of *Emmonsia crescens* or *Emmonsia parva*. *Clinical Microbiology Newsletter* 33- 17.
29. Erume J, Spergser J, Rosengarten R(2001). Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *African Health Sciences* 1(2): 83-89.
30. Ferreira I (2010). Rastreo sorológico de alguns agentes de zoonoses em canídeos silvestres no norte de Portugal. Dissertação, Universidade Técnica de Lisboa.
31. Garrido JM, Vicente J, Carrasco-García R, Galindo RC, Minguijón E, Ballesteros C, Aranaz A, Romero B, Sevilla I, Juste R, de la Fuente J, Gortazar C (2010). Experimental infection of Eurasian wild boar with *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Veterinary Microbiology* 144(1-2): 240-245.

32. Guimarães A, Carmo F, Pauletti R, Seyffert N, Ribeiro D, Lage A, Heinemann M, Miyoshi A, Azevedo V, Gouveia A (2011). Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. *The IIOAB Journal* 2(2):33-43.
33. Hamir NA (1999). Pulmonary adiaspiromycosis in raccoons (*Procyon lotor*) from Oregon. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1(6)1: 565-567.
- Hardstaff JL, Marion G, Hutchings MR, White PCL (2014). Evaluating the tuberculosis hazard posed to cattle from wildlife across Europe. *Research in Veterinary Science*, doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.12.002.
34. Harrington DJ, Sutcliffe JC, Chanter N (2002). The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. *Microbes and Infection* 4(4): 501-510.
35. Harrington, Golding MC, Martens RJ, Halbert ND, Cohen ND (2005). Evaluation of a real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and quantitation of virulent *Rhodococcus equi*. *American Journal of Veterinary Research* 66(5): 755-761.
36. Hosseinzadeh S, Haghkhah M, Zehtab K, Shekarfroush Sh (1996). The frequency of caseous lymphadenitis in sheep slaughtered in Shiraz abattoir. *Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran* 51(1-2): 81-88;
37. James GD (2000). A clinicopathological classification of granulomatous disorders. *Postgraduate Medical Journal* 76: 457-465.
38. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN (1989) *The Streptococci*. Em: Prentice – Hall International Inc. (ed). *Medical Microbiology*, 8ª edição. United States of America, pp 193.
39. Kaba J, Kutschke L, Gerlach G (2001). Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. *Veterinary Microbiology* 78(2): 155-163.
40. Khamis A, Raoult D, Scola B (2004). *rpoB* Gene Sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology* 42(9): 3925-3931.
41. Kim TH, Han JH, Chang SN, Kim DS, Abdelkader TS, Seok SH, Park JH, Oh HS, Kim JT, Lee BH, Shin JH, Kim JH, Kim JM, Park JH (2012). Adiaspiromycosis of an *Apodemus agrarius* captured wild rodent in Korea. *Laboratory Animal Research* 28(1): 67-69.
42. Kojima M, Nakamura S, Kurabayashi Y, Itoh H, Yoshida K, Asano S, Suchi T, Jochita T (1995). Suppurative lesions without prominent epithelioid cell response in abscess-forming granulomatous lymphadenitis. *Pathology Research and Practice* 191(11): 1072-1077.
43. Komijn RE, Wisselink HJ, Rijsman VMC, Stockhofe-Zurwieden N, Bakker D, Zijderveld FG, Eger T, Wagenaar JA, Putirulan F, Urlings BAP (2007). Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology* 120(3-4): 352-357.
44. Krewer CC, Costa MM, Schrank I, Vargas AC (2008). *Rhodococcus equi*. *Institute Biology* 75: 553-545.
45. Krewer CC, Spricigo DA, Botton SA, Costa MM, Schrank I, Vargas AC (2008). Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates of horse breeding farms from an endemic region in south of Brazil by multiplex PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(1): 188-193..
46. Lara GHB, Ribeiro MG, Leite CQF, Paes AC, Guazzelli A, Silva AV, Santos ACB, Listoni FJP (2011). Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph

- nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). *Research in Veterinary Science* 90(2): 185-188.
47. Laurent FJ, Provost F, Boiron P (1999). Rapid Identification of Clinically Relevant *Nocardia* Species to Genus Level by 16S rRNA Gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 37(1): 99.
 48. Leger JAS, Begeman L, Fleetwood M, Frasca S, Garner MM, Lair S, Trembley S, Linn MJ, Terio KA (2009). Comparative Pathology of Nocardiosis in Marine Mammals. *Veterinary Pathology* 46(2): 299-308.
 49. Leighton FA, Wobeser G (1978). The prevalence of adiaspiromycosis in three sympatric species of ground squirrels. *Journal of Wildlife Diseases* 14: 362-365.
 50. Lima TSM, Moraes MAP, Magalhães HQ, Athayde NSG (1998). Human pulmonary adiaspiromycosis: a new case diagnosed by transbronchial biopsy. *Journal Pneumology* 24 (5):339-341.
 51. Merchant I, Packer R (1965) Género *Streptococcus*. Editorial Acribia (ed). *Bacteriologia y Virologia Veterinarias*, 2ª edição. Zaragoza Espanha, 549.
 52. Michael DP (2001). Caseous lymphadenitis in Sheep. *Vet's Corner* 1: 4.
 53. Miranda CI (2010). Diagnóstico de micobacterioses em suínos abatidos para consumo por técnicas histopatológicas e de biologia molecular. Tese (mestrado), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
 54. Moravkova M, Hlozek P, Beran V, Pavlik I, Preziuso S, Cuteri V, Bartos M (2008). Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Research in Veterinary Science* 85(2): 257-64.
 55. Moravkova M, Hlozek P, Beran V, Pavlik I, Preziuso S, Cuteri V, Bartos M (2008). Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Research Veterinary Science* 85:257-64.
 56. Mörner T, Avenäs A, Mattsson R (1999). Adiaspiromycosis in a European beaver from Sweden. *Journal of Wildlife Diseases* 35(2): 367-370.
 57. Motta R, Cremasco AM, Ribeiro MG (2010). Infecciones por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en animales de producción. *Veterinaria e Zootecnia* 17(2): 200-213.
 58. Moura-Costa LF, Bahia RC, Carminati R, Vale VLC, Paule BJA, Portela RW, Freire SM, Nascimento I, Schaer R, Barreto LMS, Meyer R (2008). Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde' goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126(1-2): 131-141.
 59. Muckle CA, Gyles CL (1982). Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Canadian Journal Comparative Medicine* 46(2): 206-208.
 60. Notario A, Moro J, Fuentes O, Castresana L, Respaldiza E, Ionescu O, Nahlik A (2010). Comparative Bacteriological Study of Two Wild Boar Populations in Sierra Morena (Jaén, Spain). *Notulae Scientia Biologicae* 2(4): 18-23.
 61. Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, Kozai K (2002). PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. *Journal of Medical Microbiology* 51(5): 443-447.
 62. Pacheco LG, Pena RR, Castro TL, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, Frota MN, Oliveira SC, Meyer R, Alves FS, Miyoshi A, Azevedo V (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* 56(4): 480-486.

63. Parra A, Llarío PF, Tato A, Larrasa J, García A, Alonso JM, Mendoza MH, Mendoza JH (2003). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Veterinary Microbiology* 97(1-2): 123-133.
64. Pate M, Zdovc I, Pirs T, KRT B, Očepček M (2004) Isolation and characterisation of *Mycobacterium avium* and *Rhodococcus equi* from granulomatous lesions of swine lymph nodes in slovenia. *Acta Veterinaria Hungarica* 52(2): 143-150.
65. Pitulle C, Dorsch M, Kazda J, Wolters J, Stackebrandt E (1992) Phylogeny of rapidly growing members of the genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(3): 337-342.
66. Prescott JF (1991). *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology reviews* 4 (1): 20-34.
67. Radostits OM, Blood DC, Gay CC (2007). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of catlee, sheep, pigs, goats and horses*. 9th ed. Philadelphia: Bailliere Tindall 830-839.
68. Rastogi N, Legrand E, Sola C (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 20(1): 21-54.
69. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Barrozo L, Bagagli E (2010). Road-killed wild animals: a preservation problem useful for eco-epidemiological studies of pathogens. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16(4): 607-613.
70. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC (1990) Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40(4): 323-330;
71. Ruiz J, D'Afonseca V et al (2011). Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. *Plos One* 6(4).
72. Santos VM, Reis MA, Adad SJ, Saldanha JC, Teixeira VPA (2000). Contribution to morphologic diagnosis of pulmonary adiaspiromycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(5): 493-497.
73. Saubolle AM, Sussland D (2003). Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *Journal of Clinical Microbiology* 41(10): 4497.
74. Schlüsselhuber M, Jung S, Bruhn O, Goux D, Leippe D, Leclercq R, Laugier C, Grötzinger J, Caucharda J (2012). In vitro potential of equine DEFA1 and eCATH1 as alternative antimicrobial drugs in rhodococcosis treatment. *Journals American Society for Microbiology* 56(4): 1749- 1755.
75. Seixas F, Travassos P, Pinto ML, Pires I, Pires MA (2006). Pulmonary adiaspiromycosis in a European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Portugal. *Veterinary Record* 158(8): 274-275.
76. Serraino A, Marchetti G, Sanguinetti V, Rossi MC, Zanoni RG, Catozzi L, Bandera A, Dini W, Mignone W, Franzetti F, Gori A (1999). Monitoring of Transmission of Tuberculosis between Wild Boars and Cattle: Genotypical Analysis of Strains by Molecular Epidemiology Techniques. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (9): 2766-2771.
77. Shitaye JE, Parmova I, Matlova L, Dvorska L, Horvathova A, Vrbas V, Pavlik I (2006). Mycobacterial and *Rhodococcus equi* infections in pigs in the Czech Republic between the years 1996 and 2004: the causal factors and distribution of infections in the tissues. *Veterinární Medicína* 51(11): 497-511.

78. Simpson VR, Gavier-Widen D (2000). Fatal adiaspiromycosis in a wild Eurasian otter (*Lutra lutra*). *Veterinary Record* 14(9): 239-241.
79. Slana I, Kaevska M, Kralik P, Horvathova A, Pavlik I (2010). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR. *Veterinary Microbiology* 144(3-4): 437-443.
80. Sobestiansky J, Barcellos D, Mores N, Carvalho L, Oliveira S (1999). Clínica e Patologia Suína. 2ª edição Goiânia-Goiás 290-95.
81. Speck S, Honer OP, Wachter B, Fickel J (2008). Characterization of *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* isolated from spotted hyenas (*Crocuta crocuta*) and plains zebras (*Equus burchelli*), and identification of a M-like protein (SrM) encoding gene. *Veterinary Microbiology* 128(1-2): 148-159.
82. Takai S, Fukunaga N, Ochiai S, Ima Y, Sasaki Y, Tsubaki S, Sekizaki T (1996). Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. *Journal Clinical Microbiology* 34(4): 1034-1037.
83. Takai S, Tharavichitkul P, Takarn P, Khantawa B, Tamura M, Tsukamoto A, Takayama S, Yamatoda N, Kimura A, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Maneekarn N, Sirisanthana T, Kirikae T (2003). Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* of intermediate virulence isolated from patients with and without acquired immune deficiency syndrome in Chiang Mai, Thailand. *Journal of Infectious Diseases* 188(11): 1717-1723.
84. Totsch M, Bocker W, Brommelkamp E, Fille M, Kreczy A, Ofner D, Schmid KW, Dworniczak BD (1996). Diagnostic value of different PCR assays for the detection of mycobacterial DNA in granulomatous lymphadenopathy. *Journal of Pathology* 178(2): 221-226.
85. Vemireddi V, Sharma A, Wu CC, Lin TL (2007). Systemic nocardiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19(3): 326-329.
86. Wada R, Itabashi C, Nakayama Y, Ono Y, Murakami C, Yagihashi S (2003). Chronic granulomatous pleuritis caused by nocardia: PCR based diagnosis by nocardial 16S rDNA in pathological specimens. *Journal of Clinical Pathology* 56: 966-969.
87. Wakelin CA, Churchman OT (1991). Prevalence of bovine tuberculosis in feral pigs in central Otago. *Surveillance* 18(5): 19-20.
88. www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi. Acedido em 7 de Maio de 2014.
89. Yamaguchi R, Nakamura S, Hori H, Kato Y, Une Y (2012). Purulent meningoventriculitis caused by *Streptococcus equi* subspecies *zooeconomicus* in a snow leopard (*Panthera uncia*). *Journal Comparative Pathology* 147(2-3): 397-400.
90. Yang S, Rothman RE (2004) PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases* 4(6): 337-348.
91. Zarraga CC, Scaramelli A, Valeiron CR (2006). Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. *Small Ruminant Research* 65(1): 170-175.
92. Zavošti FR, Khoojine ABS, Helan JA, Hassanzadeh B, Heydari AA (2012). Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. *Comparative Clinical Pathology* 21(5): 667-671.

93. Zumla A, James DJ (1996). Granulomatous Infections: Etiology and Classification. *Clinical Infectious Diseases* 23: 146-158.