

## IV - Banco de Germoplasma

### Coleção de Microrganismos Patogênicos a Caprinos e Ovinos - CMPCO

Patrícia Yoshida Faccioli-Martins<sup>a</sup>, Viviane de Souza<sup>a</sup>, Raymundo Rizaldo Pinheiro<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4, C.P. 71, CEP: 62010-970, Sobral, CE, Brasil. E-mails: patricia.yoshida@embrapa.br, viviane.souza@embrapa.br, rizaldo.pinheiro@embrapa.br

#### Resumo

Esta publicação tem por objetivo descrever a história, a composição da Coleção de trabalho de Microrganismos Patogênicos a Caprinos e Ovinos, e de que forma ela tem conservado, caracterizado, documentado e utilizado seus isolados. A coleção foi criada em 2012 e atualmente é composta por 141 cepas bacterianas e seis cepas virais, pertencentes às espécies *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus* e ao gênero *Lentivirus*. Esses isolados são utilizados para produção de antígenos para imunodiagnósticos, em diagnósticos moleculares e na avaliação de resistência a antimicrobianos e ação de anti-sépticos e antimicrobianos. Participa de projetos das coleções institucionais e de gestão da qualidade.

Palavras-chave: banco de germoplasma, conservação, caracterização, resistência, diagnóstico, qualidade.

#### Abstract

**(Collection of Goat and Sheep Pathogenic Microorganisms - CMPCO)** The purpose of this publication is to describe the history, composition of the Work Collection of Goat and Sheep Pathogenic Microorganisms, and how it has conserved, characterized, documented and used their isolates. The collection was created in 2012 and currently consists of 141 bacterial strains and six viral strains, belonging to the species *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus* and the genus *Lentivirus*. These isolates are used for antigen production for immunodiagnosics, molecular diagnostics, and evaluation of the antimicrobial resistance and the action of antiseptic and antimicrobials. Participates in projects of institutional collections and quality management.

Keywords: germplasm bank, conservation, characterization, resistance, diagnosis, quality.

#### HISTÓRIA DO BANCO

A Coleção de Trabalho de Microrganismos Patogênicos a Caprinos e Ovinos (CMPCO) surgiu em 2012, a partir da sua inserção no projeto “Modelo Corporativo de Gestão para as Coleções de Micro-organismos da Embrapa – GESTCOL”. Esse projeto foi uma iniciativa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para implementar um único modelo de gestão dos Centros de Recursos Biológicos, Coleções Institucionais e Coleções de Trabalho da empresa, baseado em experiências e normas nacionais e internacionais. Desde então a CMPCO, pertencente à Embrapa Caprinos e Ovinos, tem incorporado ao seu acervo cepas selvagens e de referência de vírus e bactérias patogênicos isolados de caprinos e ovinos. Atualmente participa dos projetos da Embrapa: Coleções Institucionais de Microrganismos e Gestão da qualidade QUALIMICRO. Até o momento foram responsáveis pela coleção os curadores Raymundo Rizaldo Pinheiro e Patrícia Yoshida Faccioli Martins.

#### COLEÇÕES QUE COMPÕE O BANCO

A coleção é composta por 141 cepas bacterianas (123 isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* – casos de linfadenite caseosa, e 12 *Staphylococcus aureus* – casos de mastite subclínica caprina) e seis cepas virais (quatro amostras de *Lentivirus* caprino e duas cepas padrão - CAEV Cork e MVV K1514). Esses isolados foram obtidos de pequenos

ruminantes acometidos pelas enfermidades (Figura 1), provenientes de estudos epidemiológicos realizados em rebanhos comerciais (São Paulo, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco) e em trabalhos realizados nos rebanhos da Embrapa Caprinos e Ovinos (Ceará).



**Figura 1.** Isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ágar sangue.  
Autor: Patrícia Yoshida.

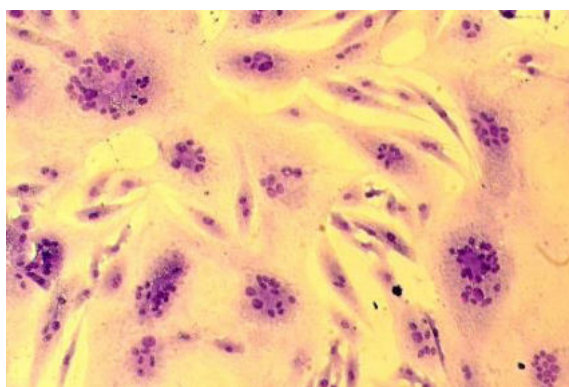
## MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO

Desde 2016 os isolados bacterianos vêm sendo introduzidos à coleção e conservados de acordo com os Requisitos de Qualidade do Modelo Corporativo de Gestão das Coleções. São preparadas cinco subamostras (repetições) de longo termo (a  $-80^{\circ}\text{C}$ , em ultrafreezer) e duas subamostras (a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em freezer), em criotubos contendo 1 mL de cultura de 24 horas em caldo cérebro-coração e 20% de glicerol. O caldo cérebro-coração para crescimento de *C. pseudotuberculosis* foi suplementado com 0,1% de Tween 80<sup>®</sup>. Os vírus também são mantidos da mesma forma em meio MEM. O teste de viabilidade das cepas bacterianas conservadas em ultrafreezer é realizado bianualmente, pela reativação de 10% dos acessos do ano em placas de ágar sangue. Das cepas virais o teste de viabilidade é realizado a cada três anos de uma alíquota mantida no  $-80^{\circ}\text{C}$ , e co-cultivada em membrana nictitante.

## CARACTERIZAÇÃO E DOCUMENTAÇÃO

As bactérias foram caracterizadas por testes bioquímicos – fermentação açúcares, teste da urease, redução do nitrato (MARKEY et al., 2013).

Com relação aos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) foi realizada a caracterização molecular de amostras isoladas (Figura 2) de caprinos do Nordeste (FEITOSA et al., 2010). Caracterizou-se, também, baseado no sequenciamento completo dos genes *gag* e *pol*, duas amostras de LVPR circulantes no Brasil (AZEVEDO et al., 2019).



**Figura 2.** Efeito citopático (sincícios) da infecção pelo LVPR. Autor: Raymundo Rizaldo Pinheiro.

A confirmação das cepas de *S. aureus* pelas técnicas de PCR (Figura 3) e Real-Time PCR foi possível pelo projeto intitulado “Avaliação celular e molecular aplicada ao estudo da mastite caprina” (MONTEIRO e SOUZA, 2015).

Os isolados estão sendo registrados nos cadernos dos laboratórios e, após identificação em nível de gênero, são cadastrados no sistema AleloMicro (Acesso em <http://alelomicro.cenargen.embrapa.br>).



**Figura 3.** Exemplo de um resultado da amplificação do fragmento de 108 pb específico para *S. aureus* (amostras 1 e 31). Eletroforese em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio. M: marcador molecular em escala de 100 pb, C+: ATCC 25923, C-: controle negativo. Autor: Jomar Patrício Monteiro

## USO E POTENCIAL INOVAÇÃO

Os isolados bacterianos e virais são utilizados como referência para o diagnóstico molecular (PCR), na produção de antígenos para imunodiagnóstico - Western Blot (WB), Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), Imunoabsorção Enzimática (ELISA) de Lentivírus de pequenos ruminantes e ELISA de *C. pseudotuberculosis*, e na avaliação de resistência a antimicrobianos (*S. aureus* e *C. pseudotuberculosis*) e ação in vitro de anti-sépticos e antimicrobianos (*C. pseudotuberculosis*).

O ELISA, utilizando antígeno de isolados de *C. pseudotuberculosis* da coleção, tem possibilitado a realização de inquéritos soropidemiológicos de amostras de rebanhos de caprinos e ovinos provenientes dos estados de Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (ALVES et al., 2018; FARIAS, et al., 2018; FARIAS et al., 2019).

Os isolados de *C. pseudotuberculosis* tem sido utilizados também na padronização da infecção in vitro de macrófagos para a avaliação da eficácia de nanopartículas de cloxacilina e de outros antimicrobianos no tratamento da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos (ALBUQUERQUE et al., 2017; FACCIOLI-MARTINS et al., 2018).

Os isolados de *S. aureus* obtidos de leite de cabras com mastite subclínica, de diferentes rebanhos do Nordeste e Sudeste, estão sendo submetidos ao perfil de resistência antimicrobiana in vitro (Figura 4), com o intuito de recomendar a droga ideal e específica para cada caso e rebanho acometido (MENEZES et al., 2019; SOUZA et al., 2017; PINTO et al., 2017).

Pretende-se em projetos futuros utilizar os isolados de *S. aureus*, para avaliar a ação de extratos vegetais, seus bioativos e formulações, bem como aprimorar a prevenção e o controle da mastite caprina por meio do teste de eficácia de um tratamento antimicrobiano.



**Figura 4.** Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Polisensidisc DME Gram Positivo) de uma amostra de *Staphylococcus aureus* pela técnica de difusão em disco, incubado à 37° C por 24 horas. Autor: Alex Miranda de Araujo.

## PERSPECTIVAS FUTURAS / PARCERIAS

A CMPCO tem parceria e vínculo com a Coleção Institucional de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária (CMIAP) para envio e armazenamento do backup dos seus isolados bacterianos.

### Referências

ALBUQUERQUE, V. Q.; MEDEIROS, R. H. G.; PINHEIRO, R. R.; AZEVEDO, D. A. A.; SOUSA, A. L. M.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y. **Avaliação de ferramenta nanotecnológica para o controle de linfadenite caseosa; dados preliminares.** In: VI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS - Anais. Sobral, CE: Embrapa Caprinos e Ovinos. v. 6., p. 60-61, 2017.

ALVES, J. R. A.; FARIAS, A. E. M.; LIMA, G. M. S.; LIMEIRA, C. H.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; AZEVEDO, S. S.; ALVES C. J. Seroprevalence of caseous lymphadenitis in goats sold in an animal fair in the northeastern semi-arid region of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p. 1067-1076, 2018.

AZEVEDO, D. A. A.; MONTEIRO, J. P.; PINHEIRO, R. R.; MUDADU, M. A.; ANDRIOLI, A.; ARAUJO, J. F.; SOUSA, A. L. M.; SIDER, L. H.; PEIXOTO, R. M.; TEIXEIRA, M. F. S. Molecular characterization of circulating strains of small ruminant lentiviruses in Brazil based on complete *gag* and *pol* genes. **Small Ruminant Research**, v. 9177, p. 160-166, 2019.

FARIAS, A. E. M.; ALVES, J. R. A.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LIMA, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; ALVES C. J. Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 4, p. 745-752, 2019.

FARIAS, A. M.; ALVES, J. R. A.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LIMA, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; ALVES C. J. Estudo sorológico sobre infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos no Nordeste brasileiro utilizando técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA-indireto). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1344-1350, 2018.

FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; ALBUQUERQUE, V. Q.; MONTEIRO, J. P. **An in vitro system for infection of sheep macrophages with *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** In: 14<sup>a</sup> Reunião Regional da SBBq 2018. Salvador, Bahia. (Pôster)

FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. da S.; PINHEIRO, R. R.; CUNHA, R. M. S. da; LIMA, J. P. M. S.; ANDRIOLI, A.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P. de; PINHEIRO, D. C. S. N. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 94, n. 1, p. 205-209, 2010.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. **Clinical Veterinary Microbiology**, 2nd ed. St Louis: Mosby Elsevier, 2013. 901p.

MENEZES, L. M. F.; ÂNGELO, F. F.; ALCINDO, J. F.; TEIXEIRA, D. M. A.; LIMA, A. R.; ARAUJO, R. F.; MESQUITA, F. L. T.; SOUZA, V. **Antimicrobial Resistance on *Staphylococcus aureus* isolated from cases subclinical mastitis in goats.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 30., 2019, Foz do Iguaçu. Resumos. Maceió: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2019.

MONTEIRO, J. P.; SOUZA, V. de. **Diagnóstico de mastite subclínica caprina por meio da detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de RT-PCR.** Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2015. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 153).

PINTO, D. S.; SOUSA, F. R.; NOBRE, C. O. R.; SOUZA, V. **Sensibilidade antimicrobiana de estafilococos coagulase positivos isolados no leite de cabras com mastite.** In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, 6., 2017, Sobral. Anais... Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2017. p. 42-43.

SOUZA, V.; MARTINS, P. Y. F.; PINTO, D.; FERNANDES, D. R.; LIMA, A. R. **Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados no leite de cabras com mastite subclínica.** Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2017. 7 p. il. Color. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 167).