

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM  
CAPRINOS INOCULADOS COM VACINA ATENUADA  
LIOFILIZADA CONTRA *Corynebacterium  
pseudotuberculosis***

**Silvania Conceição Silva**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**2017**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAPRINOS  
INOCULADOS COM VACINA LIOFILIZADA CONTRA  
*Corynebacterium pseudotuberculosis***

**Silvania Conceição Silva**  
Bacharel em Biologia  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Defesa Agropecuária.

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante  
**Coorientador:** Dr. Robson Bahia Cerqueira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586a

Silva, Sylvania Conceição.

Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com vacina atenuada liofilizada contra *C. pseudotuberculosis* / Sylvania Conceição Silva.\_ Cruz das Almas, BA, 2017.

78f.; il.

Orientador: Ana Karina da Silva Cavalcante.

Coorientador: Robson Bahia Cerqueira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Caprino – Linfadenite caseosa – Doenças.  
2.Corynebacterium pseudotuberculosis – Vacina.  
3.Zoonoses – Controle. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.39089

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAPRINOS  
INOCULADOS COM VACINA LIOFILIZADA CONTRA  
*Corynebacterium pseudotuberculosis***

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Silvania Conceição Silva

Aprovada em: 11 de Setembro de 2017

Profa. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante  
UFRB – Orientadora

Prof. Dr. Joselito Nunes Costa  
UFRB – Examinador Interno

Prof. Dr. Fred Julião.  
IFbaiano – Examinador Interno

MSc. Ângela Cristina Oliveira Lima  
UFRB – Examinadora Externa ao Programa

## **DEDICATÓRIA**

Dedico primeiramente à Deus, autor do meu destino e a todos que acreditaram em meu potencial.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as glórias que me foram concedidas até hoje.

A minha família, em especial a todos aqueles que me fizeram acreditar que sou capaz.

À Profa. Dra. Ana Karina, por ter sido muito mais do que uma orientadora, uma amiga. Obrigada pela paciência, principalmente nas horas das correções, pela confiança no meu trabalho e ter sempre acreditado em mim. Expresso aqui meu reconhecimento e gratidão.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Robson Cerqueira, pelos ensinamentos, apoio e contribuição para minha formação.

Ao programa de Pós-graduação em Defesa Agropecuária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade.

Aos meus colegas de mestrado, pela amizade e momentos que passamos juntos. Em especial, a minha amiga Andrine, por toda força, por muitas vezes ser a minha psicóloga e principalmente pela verdadeira amizade. Obrigada por tudo.

A equipe do laboratório LEMA pela disposição e colaboração em uma parte muito importante do meu trabalho. Vocês foram essenciais e sensacionais.

A turma do Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da UFRB, Thaise Marques e Juliana Lira, assim como todos aqueles envolvidos diretamente no projeto da Vacina Liofilizada, Lilian Porto e Ângela Lima que, com seus esforços, tornaram possível a concretização desse trabalho.

Ainda entre os colegas de laboratório, gostaria de agradecer imensamente ao meu querido amigo Vinicius Vieira, que não poupou esforços, estando ao meu lado, pronto para me ajudar sempre que possível. Sem seu apoio teria sido muito mais difícil, por isso, sou imensamente grata a você. Sem deixar de falar de Kayck Barreto, pela amizade e ser tão solícito, você foi muito importante para conclusão desse trabalho, conte sempre comigo.

Ao professor Carlos Crispim Oliveira Ramos, pela ajuda na estatística e sugestões que contribuíram para desenvolvimento desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), pelo apoio financeiro aos meus estudos durante o mestrado.

À Victória que cedeu os animais de sua fazenda para realização do experimento, como também aos seus funcionários que colaboraram de alguma forma para ajudar. Muito obrigada.

À UFRB, pela colaboração com a logística e transporte.

A todos que não foram mencionados aqui, mas de alguma forma foram importante e contribuíram para mais essa etapa da minha vida.

Obrigada!!

## EPÍGRAFE

Ela acreditava em anjo e, porque acreditava,  
eles existiam.

Clarice Lispector

## **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAPRINOS INOCULADOS COM VACINA ATENUADA LIOFILIZADA CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis***

**RESUMO:** A linfadenite caseosa é uma doença de caráter crônico, caracterizada pela presença de abscessos nos linfonodos e órgãos de animais de produção, e tem como agente etiológico a *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A transmissão se dá principalmente através de feridas, ou seja, contato direto de animais portadores da enfermidade com os sadios. As medidas de controle são a vacinação e o isolamento dos animais infectados. No entanto, as vacinas disponíveis, não oferecem a proteção necessária contra a infecção ou não foram ainda suficientemente testadas em campo. Objetivou-se nesse estudo avaliar, a resposta imune humoral de amostras de soro de caprinos, inoculados com vacina atenuada liofilizada utilizando a linhagem vacinal 1002 de *C. pseudotuberculosis*, por meio de ELISA indireto com antígeno BHI. Foram utilizados 100 caprinos, de dois a três anos de idade, divididos em 5 grupos (G1 a G5) com 20 animais cada. Os grupos 1 e 2 receberam a dose de  $10^7$  UFC, no dia zero e com 21 dias o G2 foi revacinado. Os grupos 3 e 4 receberam a dose de  $10^6$  UFC, no dia zero e com 21 dias o G4 foi revacinado. O grupo 5 foi considerado o controle. Os animais foram acompanhados sorologicamente e clinicamente ao longo de 364 dias. Os soros coletados dos caprinos foram analisados pela técnica do ELISA Indireto. Apesar dos valores de D.O. terem variado no decorrer do experimento, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as diferentes doses testadas e tempos de revacinação entre os grupos. Todavia, pôde-se inferir que a dose  $10^6$  UFC é mais indicada do que a de  $10^7$  UFC na imunização de caprinos, visto que uma carga maior do imunógeno não seria necessária para o estímulo da resposta humoral de acordo com o protocolo seguido no experimento. Ademais, os animais apresentaram produção de anticorpos ao longo do estudo, essa situação indica que a cepa 1002 liofilizada foi capaz de induzir uma resposta imunológica pelo período de ao menos um ano.

**Palavras chave:** Elisa indireto; linfadenite; vacinação

**EVALUATION OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN INOCULATED GOATS  
WITH ATTENUED VACCINE LYOPHILIZED AGAINST *Corynebacterium  
pseudotuberculosis***

**ABSTRACT:** Casey lymphadenitis is a chronic disease, characterized by the presence of abscesses in the lymph nodes and organs of production animals, and its etiological agent is *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The transmission is mainly through wounds, that is, direct contact of animals carrying the disease with the healthy ones. Control measures are vaccination and isolation of infected animals. However, the available vaccines do not provide the necessary protection against infection or have not yet been sufficiently tested in the field. The objective of this study was to evaluate the humoral immune response of serum samples from goats inoculated with a lyophilized attenuated vaccine using the 1002 strain of *C. pseudotuberculosis* by means of an indirect ELISA with BHI antigen. 100 goats, two to three years old, were divided into 5 groups (G1 to G5) with 20 animals each. Groups 1 and 2 received a dose of  $10^7$  CFU on day zero and at 21 days G2 was revaccinated. Groups 3 and 4 received a dose of  $10^6$  CFU on day zero and at 21 days G4 was revaccinated. Group 5 was considered the control. The animals were followed serologically and clinically for 364 days. The sera collected from the goats were analyzed by the indirect ELISA technique. Despite the O.D. varied during the experiment, there was no statistical difference ( $p>0.05$ ) between the different doses tested and times of revaccination between the groups. However, it could be inferred that  $10^6$  CFU dose is more indicated than  $10^7$  CFU in immunization of goats, since a greater loading of the immunogen would not be required for stimulating the humoral response according to the protocol followed in the experiment. In addition, the animals showed antibody production throughout the study, this situation indicates that lyophilized strain 1002 was able to induce an immune response for at least one year.

**Keywords:** ELISA indirect; lymphadenitis; vaccination

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA, a partir de amostras de soros do animais do grupo controle .....46
- Gráfico 2 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA, a partir de amostras de soros de animais vacinados com  $1 \times 10^7$  UFC da vacina atenuada liofilizada contra *C. pseudotuberculosis* ..... 47
- Gráfico 3 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA, a partir de amostras de soros de animais vacinados e revacinados com 21 dias, com a dose  $1 \times 10^7$  UFC da vacina atenuada liofilizada contra *C. pseudotuberculosis* ..... 47
- Gráfico 4 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA, a partir de amostras de soros de animais vacinados com  $1 \times 10^6$  UFC da vacina atenuada liofilizada contra *C. pseudotuberculosis* ..... 48
- Gráfico 5 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA, a partir de amostras de soros de animais vacinados e reforçados com 21 dias com  $1 \times 10^6$  UFC da vacina atenuada liofilizada contra *C. pseudotuberculosis* .....49

## LISTA DE ABREVIATURAS

BALB/C – Camundongos Balb/c  
BHI – Brain Heart Infusion  
BMD – Banho-maria dialisado  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
DO – Densidade ótica (*Optical Density*)  
ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
ERIC-PCR – Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR  
ICS – Instituto Ciências da Saúde  
IFN- $\gamma$  – Interferon Gama  
IgA – Imunoglobulina classe A  
IgD – Imunoglobulina classe D  
IgE – Imunoglobulina classe E  
IgG – Imunoglobulina classe G  
IgM – Imunoglobulina classe M  
IL-10 – Interleucina 10  
IL-12 – Interleucina 12  
IL-2 – Interleucina 2  
IL-4 – Interleucina 4  
KDa – KiloDalton  
LC – Linfadenite Caseosa  
MHC I – Complexo principal de Histocompatibilidade I  
MHC II – Complexo principal de Histocompatibilidade II  
MQD – Meio quimicamente definido  
OPD – Orto-fenilenodiamina  
PBS – Tampão fosfato com salina  
PBS-T – Tampão fosfato com salina e Tween 80  
PCR – Reação em Cadeia Polimerase  
PLD – Fosfolipase D  
RNA – Ácido ribonucléico  
SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida  
SRD – Sem raça definida

T CD8 – Linfócito T apresentando a molécula CD 8 na superfície

T CDA 4 – Linfócito T apresentando a molécula CD 4 na superfície

Th1 – Células T auxiliaadoras do tipo 1

Th2 – Células T auxiliaadoras do tipo 2

TPP – *Three Phase Partitioning* (Técnica de separação em três fases)

UFC – Unidade formadora de colônias

µm – Micrômetro

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1 ETIOLOGIA.....	17
3.1.1 Agente etiológico.....	17
3.1.2 Características bacteriológicas.....	18
3.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E ECONÔMICOS.....	19
3.3 TRANSMISSIBILIDADE.....	21
3.4 PATOGENESE E ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICO.....	23
3.5 CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS.....	25
3.6 RESPOSTA IMUNE.....	28
3.6.1 Resposta Imune Humoral.....	28
3.6.2 Resposta Imune Celular.....	30
3.7 IMUNÓGENOS E VACINAS.....	32
3.8 DIAGNÓSTICO.....	36
3.8.1 Clínico.....	36
3.8.2 Laboratorial.....	37
3.9 CONTROLE E PREVENÇÃO.....	39
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 LOCAL.....	41
4.2 ANIMAIS E MANEJO.....	41

4.3 PRODUÇÃO DA VACINA.....	42
4.4 ANTÍGENO.....	43
4.4.1 Produção do antígeno BHI.....	43
4.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA) COM ANTÍGENO BHI .....	44
4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	44
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
ARTIGO 1 .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o estado da Bahia ocupa o primeiro lugar em relação à pecuária de caprinos e ovinos e assim como em outros estados da região Nordeste, a criação de pequenos ruminantes estão concentradas nas regiões de clima semiáridos. (IBGE, 2015). No entanto, as doenças que acometem esses animais trazem grandes prejuízos para os produtores, em decorrência do importante papel sócio econômico. A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa de ocorrência mundial, foi detectada como um problema endêmico no Brasil, com prevalência clínica estimada em aproximadamente 30%, destacando-se numa importante área de produção do país, região Nordeste (SEYFFERT et al., 2010), a qual se destaca como grande produtora de caprino e ovino de corte (BEZERRA et al., 2017).

Segundo Nóbrega (2010), a LC, comumente chamada de mal-do-carço, é uma doença que acometem principalmente ovinos e caprinos e ocasionalmente o homem e tem como agente etiológico *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Machos e fêmeas de caprinos e ovinos podem apresentar a doença, independente da raça e em qualquer idade, porém é mais comum encontrar doentes principalmente após um a dois anos de vida (ALVES; PINHEIRO, 2000). Apesar de não causarem sintomatologia expressiva na maioria das vezes, a enfermidade implica na baixa produtividade dos animais (RIBEIRO et al., 2011; SOUZA et al., 2011; ANDRADE et al., 2012).

Essa enfermidade tem grande importância econômica, pois leva à redução do ganho de peso, da eficiência reprodutiva, como também da produção de lã e leite, podendo acarretar na condenação de carcaça e desvalorização do couro, fatores que comprometem diretamente a redução no desempenho dos animais e a queda na produção (CAMARGO et al., 2010; DUNO et al., 2016). Na região do semiárido, a exploração de caprinos e a agricultura familiar considerada intensa se baseiam na venda de animais, carne, pele, leite e derivados (SANTOS et al., 2014).

Dependendo da localização dos abscessos, pode interferir na mastigação e procura de alimentos (abscesso nos linfonodos mandibulares), locomoção (abscessos nos membros), lactação (abscessos no úbere) (RODOSTITIS et al., 2000; SANTAROSA

et al., 2014). A forma visceral da LC atinge órgãos (fígado, pulmão e baço) e linfonodos (mediastínicos e mesentéricos) (GUEDES et al., 2015).

A transmissão se dá pela via oral e nasal, sendo facilitadas por pequenos ferimentos superficiais nos abscessos (SOLANET et al., 2011). A doença é caracterizada principalmente por necrose caseosa induzida por bactérias nas glândulas linfáticas (SANTANA-JORGE et al., 2016).

O uso de antibióticos não é recomendável, devido à impossibilidade de penetração do fármaco na espessa cápsula dos abscessos e pela possibilidade de deixar resíduos na carne e leite, portanto faz-se necessário o uso de medidas profiláticas. A imunização ou a vacinação é uma das ferramentas mais eficazes e versáteis para o combate das doenças infecciosas em humanos e animais (OSHOP; ELANKUMARAN; HECKERT, 2002).

A imunoprofilaxia indicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é a vacina líquida 1002<sup>®</sup> ( $2 \times 10^6$  UFC), manipulada a partir de uma amostra atenuada de *C. pseudotuberculosis* a qual foi testada em campo e laboratório, sendo indicada apenas para caprinos e pode conferir 83,3% de proteção (SANCHES, 2013).

Algumas vacinas comercializadas têm um curto prazo de validade o que limita sua produção e comercialização. Salientando que a vacina na forma liofilizada seria mais vantajosa, por apresentar um maior tempo de prateleira em relação à líquida, que possui três meses de validade, além de manter a estabilidade do produto (TATTINI et al., 2005).

Várias, têm sido as tentativas de desenvolvimento de uma vacina, entretanto, todas elas evidenciam, até o momento, resultados insatisfatórios no que diz respeito aos índices de imunoproteção conseguidos em caprinos, pois as vacinas disponíveis utilizando antígenos da *C. pseudotuberculosis* não oferecem a proteção necessária contra a infecção ou não foram ainda suficientemente testadas em campo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune humoral de caprinos, inoculados com vacina atenuada liofilizada utilizando a linhagem vacinal 1002 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por meio de ELISA indireto com antígeno BHI.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a dinâmica na produção de anticorpos vacinais em amostras de caprinos ao longo de 364 dias.
- Comparar o desempenho do antígeno BHI em caprinos inoculados com dose  $10^6$  e  $10^7$  UFC da vacina liofilizada contra Linfadenite Caseosa.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ETIOLOGIA

##### 3.1.1 Agente etiológico

Em 1888, Edmond Nocard, um veterinário francês, descreveu pela primeira vez a *C. pseudotuberculosis*, em um caso de linfangite bovina. Em 1891, Hugo Von Preisz, um búlgaro, isolou uma bactéria similar de um abscesso renal de ovino. E consequentemente o microrganismo passou a ser chamado de “Enfermidade de Preisz-Nocard” (DOMINGUES, 2017).

Na Alemanha, em 1894, a bactéria passou a ser chamada de *Bacillus pseudotuberculosis ovis*, o que significa “tubérculos falsos” devido a semelhança das suas lesões com a da tuberculose que é causada pela *Mycobacterium tuberculosis*. Em 1923, o microrganismo passou a ser agrupado no gênero *Corynebacterium*, sendo então renomeado *Corynebacterium ovis* e, em 1948 recebeu uma nova nomenclatura na 6ª edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, passando assim a ser conhecida como *Corynebacterium pseudotuberculosis* até os dias atuais (DORELLA et al., 2006).

No Brasil, o isolamento e caracterização de *C. pseudotuberculosis* ocorreu em 1973 por Moura-Costa, a partir de material de lesões em um caprino no interior da Bahia (MOURA, 2002). A Linfadenite caseosa tem como agente etiológico *C. pseudotuberculosis*, que é responsável pela infecção tanto em ovinos como em caprinos.

O gênero *Corynebacterium* pertence à família Actinomycetae, assim como os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (OLIVEIRA, 2012). Esses gêneros têm em comum entre si uma parede celular composta de peptidoglicano, além de um elevado conteúdo de guanisina-citocina existentes no genoma (FONTAINE et al., 2006).

Em búfalos, *C. pseudotuberculosis* pode causar a doença edematosa da pele (OSD), em humanos afetados pode aparecer abscesso hepático e abscesso nos gânglios linfáticos internos (MOUSSA et al., 2016) e em equinos causa a linfangite ulcerativa conhecida como abscesso do peito ou febre de pombo, podendo ser transmitida também em camelos e animais selvagens (GUEDES et al., 2015).

### 3.1.2 Características bacteriológicas

A bactéria é classificada como um cocobacilo Gram-positivo, ou seja, cadeias alternadas de N-acetilglicosamina e ácido acetilmurânico unidas por curtas cadeias peptídicas laterais (TZARD, 2014). Curto e irregular (0,5-0,6 $\mu$ m x 1-3 $\mu$ m), aeróbico, intracelular facultativo, não esporulado, imóvel e fermentativo, sendo alguns pleomórficos que formam elementos cocoides durante o seu crescimento (DORELLA et al., 2006)

Apresentam-se em arranjos característicos ao microscópio, lembrando o alfabeto chinês, inicialmente as colônias são translúcidas e pequenas, além de poder ocorrer hemólise em ágar sangue (OLIVEIRA, 2012). Após 48 horas de incubação em ágar sangue, forma colônias pequenas de coloração branca-acinzentada com bordas denteadas, na temperatura ideal (*in vitro*) de 37°C, com pH de 7,0 a 7,8 (DORELLA et al., 2006). Em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) também tem um bom crescimento, com desenvolvimento de uma película densa na superfície (MOURA-COSTA, 2002).

A identificação da bactéria é possível através de suas características morfotintoriais e provas bioquímicas como: produção de catalase, urease, redução de nitrato a nitrito e fermentação de carboidratos, sem produção de gás (MOURA-COSTA, 2002).

Dois biovars, de *C. pseudotuberculosis* após análise do DNA cromossômico, foram identificados baseados na produção de nitrato redutase. A redução do nitrato a nitrito caracteriza cepas que infectam preferencialmente equinos e apresentam sensibilidade a estreptomicina, enquanto as cepas que infectam preferencialmente caprinos e ovinos são nitrato negativas. Salientando que as duas biovars possuem a mesma origem evolucionária (SOARES et al., 2013). Segundo Oliveira et al. (2016), uma provável anagênese está ocorrendo lentamente dentro da espécie *C. pseudotuberculosis*. Baseados nos dados estatísticos, análise de sequência e

estrutura das proteínas abordadas nos seus estudos reforçam a hipótese que *C. pseudotuberculosis* biovar Ovis está sendo formada a partir da biovar Equi.

De acordo com Moura-Costa et al. (2002), um meio de cultivo denominado CDM composto por fosfato dibásico, vitaminas e aminoácidos vem sendo utilizado com sucesso pelo fato de obter antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis*, o qual vem auxiliando no estudo da bactéria. Segundo Carvalho et al. (2013), em experimento de curva de crescimento bacteriano, *C. pseudotuberculosis* tem melhor crescimento em soro fetal bovino.

A bactéria pode viver por longos períodos no ambiente e contém lipídios na sua parede bacteriana à semelhança dos ácidos micólicos dos gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium* de grande importância médica, veterinária e biotecnológica, porém, não apresentam álcool-ácido resistência, que é característica de micobactérias (MOTTA, CREMASCO, RIBEIRO, 2010).

Segundo Vale et al. (2003), a *C. pseudotuberculosis* é filogeneticamente relacionada a *Mycobacterium tuberculosis*. Os lipídios presentes na parede celular exercem um importante papel na virulência do microrganismo uma vez que interferem no processo de fagocitose (MEYER et al., 2005).

### 3.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E ECONÔMICOS

Segundo os dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação – FAO (2015), os maiores rebanhos de caprinos e ovinos do mundo estão concentrados na China e nas Américas, sendo nestas, o Brasil assume primeiro lugar. Em 2015, ela complementou que o rebanho mundial de caprinos em 2014 era de 1 bilhão de cabeças, observando-se uma taxa de crescimento anual, nos últimos 5 anos, de 1%. E os ovinos na ordem de 1,2 bilhões de cabeças numa taxa de crescimento anual de 1,5%, apontando para pequenas mudanças deste cenário em 2016.

No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2015), os rebanhos caprinos e ovinos registrados foram de 8.851.879 e 17.614.454 de cabeças, respectivamente. Sendo que cerca de 91,7% de caprinos estão

concentrados na região Nordeste e 3,5% no Sul. Já 57,5% dos ovinos estão na região Nordeste e 29,3% na Sul. A Bahia tem o maior rebanho de caprinos do Brasil, o qual assume o 22º maior rebanho mundial de caprinos e o 18º de ovinos.

A LC é economicamente importante em muitos países, principalmente na Oceania, África e América do Sul, incluindo Argentina e Brasil, onde a caprinocultura e ovinocultura são importantes fontes de rendas pecuaristas. No Brasil, é na região Nordeste, onde se tem alta incidência dessa doença devido à vegetação espinhosa da caatinga facilitar a transmissão (PINHEIRO et al., 2000).

Nassar et al. (2015), em seus estudos com a LC, citaram que essa doença foi relatada pela primeira vez, no estado da Bahia, em 1973. Seyffert et al. (2010) relataram no seu trabalho de soroprevalência na região sudeste que 78% dos caprinos apresentaram pelo menos um animal positivo e 98% dos rebanhos apresentaram pelo menos um animal soropositivo. Salientando que a região sudeste, especificamente o estado de Minas Gerais, se encontra o maior efetivo caprino da região (IBGE, 2015).

Guimarães et al. (2011), em seus estudos epidemiológicos sobre LC em Minas Gerais, mostraram que a doença estava amplamente disseminada nos rebanhos de ovinos (75,8%) e caprinos (78,9%), e que a negligência da maioria dos agricultores, favorece a endemicidade desta doença, o que resulta em perdas econômicas, além da falta de fiscalização no mercado nacional e estrangeiro.

Souza et al. (2010), realizaram um trabalho na região do semiárido da Paraíba, avaliando ovinos abatidos em frigoríficos, constataram que 15,9% apresentaram lesões macroscópicas semelhantes a LC.

As perdas econômicas são grandes pelo fato da diminuição da produção de leite e lã, redução do preço da pele devido às cicatrizes, custos com medicamentos e mão-de-obra para tratamento dos abscessos, além da diminuição da eficiência reprodutiva (ALVES et al., 2007).

Segundo Faccioli-Martins et al. (2014), o custo com o tratamento de animais em uma propriedade com 114 animais e 15 % deles com abscessos externos é ao redor R\$ 10,06 por abscesso. E o custo anual dessa propriedade com o tratamento, sairia aproximadamente de R\$ 205,20, sem colocar as perdas produtivas como, redução no valor do couro entre outros prejuízos.

Apesar do crescimento da caprinocultura no Brasil, o manejo é inadequado e insuficiente do ponto de vista reprodutivo, sanitário e nutricional em decorrência do baixo investimento em tecnologias, o que vem influenciando diretamente no mercado comprador, visto que, principalmente no Nordeste, as atividades de explorações extensivas desempenham um importante papel social e econômico em grandes e pequenas propriedades (RODRIGUES; CRUZ COELHO; COELHO, 2016).

Santos et al. (2011) e Silva et al. (2015), verificando a região do semiárido da Paraíba, obtiveram resultados semelhantes nos seus estudos, em relação ao sistema de criação extensiva que foi considerado predominante, condições sanitárias deficientes, precariedade na disponibilidade alimentar, bem como a presença de ectoparasitas no rebanho caprino, dificultando a prevenção e controle das doenças avaliadas.

Gouveia et al. (2015), avaliando os problemas epidemiológicos e de saúde existentes nas explorações de caprinos leiteiros no Estado de Minas Gerais, afirmaram que as fazendas amostradas podem ser consideradas responsáveis pela propagação de doenças nos rebanhos, como abortos, diarreia, pneumonia, LC entre outras enfermidades. Pois, algumas práticas sanitárias precisam de um melhor suporte técnico, como vacinação e diagnóstico laboratorial das principais doenças de cabras leiteiras. Podendo ressaltar, a LC como uma das doenças infectocontagiosas mais frequentes nos rebanhos de caprinos e ovinos (SANTOS et al., 2011; GOUVEIA et al., 2015).

### 3.3 TRANSMISSIBILIDADE

A transmissão da LC ocorre através de material purulento drenado dos granulomas, pelo contato direto ou por fômites, como o cocho, que é uma importante fonte de contaminação. Uma opção de controle eficiente seria o uso de cochos com um formato que não exija que o animal passe a cabeça por obstáculos, reduzindo a chance de rompimento dos granulomas e a contaminação de alimentos (WINDSOR, 2011).

Radostits et al. (2000) salientam que a transmissão é facilitada por presença de feridas na pele, mas o agente também pode penetrar com a pele íntegra. Estudos relatados por Alves et al. (2004) demonstraram que a bactéria já foi isolada de sêmen caprino, podendo assim, também ser transmitida através da cópula.

Segundo Faccioli-Martin et al. (2014), a partir do local de penetração, a bactéria é levada por macrófagos aos linfonodos locais. Estudos têm demonstrado que aproximadamente 85% da propagação da doença, em rebanhos de ovinos lanados, é através das tosquias, ou seja, a maior parte da transmissão ocorre no período de corte de lã.

Segundo estudos de Spier et al. (2004), *C. pseudotuberculosis* também pode ser transmitido por vetores. Na hipótese de identificar vetores que possam ser importantes transmissores, foram avaliadas espécies de moscas em fazendas na região Norte da Califórnia, onde a infecção por *C. pseudotuberculosis* é endêmica. Os resultados apontaram três vetores potenciais, *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* e *Musca domestica*. Salientando-se que a *M. domestica* já foi encontrada em outros estudos realizados nos Estados Unidos, Israel e Egito em equinos.

Guedes et al. (2015), em seus estudos com infecção por *C. pseudotuberculosis* em equinos, chamou atenção de que essa bactéria pode infectar cavalos, apesar de que, especificamente no Brasil não há registros científicos, acredita-se que, devido à manutenção de pequenos ruminantes infectados em estreita associação com os cavalos em muitas propriedades, essa infecção já pode ser uma realidade.

A bactéria também pode ser disseminada pelo ambiente, pois passa longos períodos viável no solo, madeiras e fios farpados de cercas, como também nos arbustos com espinhos, característicos do semiárido, que, podem causar ferimentos superficiais, servindo como porta de entrada para o patógeno, além do grande risco dos animais consumirem a vegetação contaminada por esse agente (ALVES, 2007).

O período de incubação de *C. pseudotuberculosis*, segundo a literatura, é longo, podendo durar meses, tornando sua erradicação difícil (WILLIAMSON, 2001). O que mostra a importância do tratamento do animal e descarte correto do material contaminado para diminuir a disseminação da doença no rebanho (ALI et al., 2013).

Tem elevada morbidade e baixa mortalidade e a infecção também pode ser adquirida através da ingestão ou inalação da bactéria (OREIBY, 2015).

Em humanos a transmissão da bactéria, ocorre pela exposição ocupacional, ingestão de leite de cabra e de vaca e também o consumo da carne contaminada, colocando os consumidores em risco devido ao seu potencial zoonótico (MOUSSA et al., 2016).

#### 3.4 PATOGÊNESE E ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICO

De acordo com Oliveira (2012), os granulomas nos linfonodos apresentam pus com aspecto cremoso e caseoso, consistem de camadas concêntricas de macrófagos e neutrófilos mortos com linfócitos no centro necrótico, circundado por um tecido fibroso. Segundo Sóstenes et al. (2012), o rompimento natural dos abscessos está associado a um maior risco de ocorrência da infecção.

A patogenia tem início quando bactérias penetram no organismo por fagocitose, ou seja, é transportada pelos fagócitos, ocorrendo a multiplicação intracelular nos fagócitos infectados e a resistência aos efeitos dos fagolisossomos, seguindo de rompimento e morte celular. O microrganismo se dissemina pela linfa atingindo os linfonodos regionais, do sistema respiratório podendo infeccionar outras partes do corpo, causando a debilidade progressiva no animal (MOTTA; CREMASCO; RIBEIRO, 2010).

Estudos de adesão e invasão celular estão atualmente auxiliando a esclarecer os diferentes aspectos da patogênese das doenças infecciosas, mas foram Valdivia et al. (2015), que apontaram, pela primeira vez, a possibilidade de *C. pseudotuberculosis* poder persistir em células não fagocíticas de tecidos diferentes, tanto de ovino como de caprino, facilitando a progressão da doença.

Bactérias patogênicas produzem enzimas que modificam carboidratos (glicanos) dos mecanismos de defesa do organismo, a fim de favorecer a sobrevivência bacteriana. Estudos voltados para glicosidases bacterianas são de grande interesse científico para compreensão da patogenia da doença. A integridade estrutural do anticorpo deve-se ao glicano de IgG, sendo muito provável também a sua importância para a função de outras proteínas (SJOGREN; COLLIN, 2014).

Em um caso relatado por Santarosa et al. (2014), lesões supurativas no sistema nervoso central de pequenos ruminantes podem ser causadas por *C. pseudotuberculosis*, apesar de infecções bacterianas do tecido nervoso de ruminantes serem pouco frequentes, na necropsia realizada, havia abscesso no mesencéfalo, que após análise microbiológica, comprovou-se a presença da bactéria.

Listos et al. (2016), em seus estudos de análises pós-abate de ovinos e cabras em abatedouros nas Ilhas Falkland, Argentina, observaram que ambas as formas clínicas da doença ocorrem em ovinos e caprinos, no entanto, a forma superficial é considerada mais comum em cabras, enquanto a forma que afeta os órgãos internos é mais comum em ovinos.

Othman et al. (2016) investigaram as alterações histopatológicas nos órgãos reprodutivos e nódulos linfáticos de cabras não gestante, infectadas experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*, via intradérmica, intranasal e oral. Seus achados evidenciaram que a bactéria pode levar a infertilidade resultante de lesões no útero e ovários, e mostraram que a via intranasal foi a mais eficaz para o desenvolvimento da infecção no sistema reprodutivo.

Adza Rina et al. (2013) descreveram lesões e respostas clínicas que se desenvolveram em caprinos infectados com dose experimental de  $10^7$  CFU da *C. pseudotuberculosis* inoculados na via intradérmica, intranasal e oral levaram a lesões nos gânglios linfáticos mesentéricos e supra-mamários.

Melo et al. (2014) caracterizaram cinco amostras de cepas da *C. pseudotuberculosis*, biovar *ovis*, isoladas de caprinos e ovinos. A análise anatomopatológica desses animais evidenciou a formação de abscessos no fígado, intestino, baço, rim e estômago. As análises histológicas mostraram um centro necrótico, área de infiltrado inflamatório, camada de tecido fibroso e presença de microabscessos, caracterizando um granuloma.

### 3.5 CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS

Assim como outras corinebactérias, *C. pseudotuberculosis* é capaz de produzir o ácido micólico um importante fator piogênico e uma potente exotoxina, a fosfolipase D (PLD), o principal fator de virulência, que é encontrada no citoplasma e em menores quantidades na parede celular bacteriana, e tem ação de hidrolisar a lisofosfatidilcolina e esfingomiélinas convertendo-as em ceramida de fosfato e colina nas membranas celulares de mamíferos (ALVES; SANTIAGO; PINHEIRO, 2007).

A virulência de *C. pseudotuberculosis* é atribuída à toxina hemolítica que provoca hemorragia possuindo atividade de fosfolipase e aos lipídeos da parede celular (WERNERY; KINNE, 2016).

A PLD provoca necrose dérmica e aumento da permeabilidade vascular facilitando a disseminação do patógeno nos gânglios linfáticos e em doses elevadas é letal para um número de diferentes espécies de animais de laboratório e domésticos (WINDSOR, 2011). Segundo Santana-Jorge et al. (2016), a PLD é única entre as corinebactérias, sendo um dos principais componentes das vacinas comerciais da LC devido ao seu papel bem conhecido na ativação do sistema imunitário e proteção contra infecção por *C. pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos. De acordo com Vale et al. (2003), a exotoxina fosfolipase D pode ser reconhecida pelo sistema imune já no primeiro mês de imunização.

De acordo com Vale et al. (2003), que utilizaram o teste *Western blotting* para detectar proteínas de extrato bacteriano sonificado, de *C. pseudotuberculosis* atenuada e selvagem, da cepa 1002, encontraram proteínas de diferentes pesos moleculares de 21; 24; 28; 31,5; 36; 68; 72; 76 e 92KDa, entre elas a 31,5KDa é reconhecida por anticorpos do soro de animais infectados e imunizados, sendo descrita na literatura como a exotoxina PLD. Provavelmente, proteínas de pesos moleculares 31, 40, 63 e 68KDa, são proteínas secretadas, pois se encontram tanto no sobrenadante como na fração somática (VALE, 2005).

Vacinas baseadas em estirpes bacterianas vivas atenuadas têm a PLD como uma proteína essencial para a sobrevivência de *C. pseudotuberculosis in vivo*. Além da importância como antígeno protetor e potencial para desenvolvimento de uma vacina (HODGSON et al., 1992; BASTOS et al., 2012).

Vale et al. (2016), em seu experimento com camundongos, observaram intensa proliferação de células no baço desses animais, que foram estimulados com a

estirpe T1, utilizando antígenos secretados, demonstrando maior eficácia que os antígenos somáticos. Essa proliferação foi devido à presença da PLD, segregada pela *C. pseudotuberculosis*, no início da infecção, para clivar a membrana da célula hospedeira fazendo os linfócitos B induzirem a produção de anticorpos.

Silva et al. (2017), em seu experimento com modelos murinos utilizando a estirpe 1002 ovis isolada de uma cabra no Brasil, tendo como finalidade identificar possíveis fatores que poderiam estar envolvidos no poder de virulência de *C. pseudotuberculosis*, observaram que várias passagens seriadas *in vitro* reduzem a virulência, como também a fisiologia dessa cepa, e que uma única passagem *in vivo*, em um modelo murino, pode induzir alterações significativas no proteoma extracelular, aumentando a virulência deste patógeno.

A estirpe 1002 já foi testada como uma vacina viva atenuada, principalmente por ter um poder de virulência naturalmente baixo e não causa aparecimento de lesões (MEYER et al., 2002; RIBEIRO et al., 1991). Acredita-se que a PLD, proteína envolvida na invasão celular, não possa ser secretada pela cepa 1002-ovis, sugerindo a baixa virulência dessa cepa, contudo, os mecanismos ainda precisam ser melhor elucidados (PACHECO et al., 2011). Segundo Ruiz et al. (2011), o primeiro genoma de *C. pseudotuberculosis* a ser completamente sequenciado foram os da cepa 1002-ovis, isolada de um caprino no Brasil.

Mahmood et al. (2016) investigaram os efeitos de *C. pseudotuberculosis* e PLD sobre a fertilidade de búfalos, e como resultados dos seus achados sugeriram que a bactéria e a sua exotoxina tiveram efeitos prejudiciais na concentração sérica da testosterona, qualidade do sêmen e circunferência escrotal dos animais em estudo. Segundo os autores, a principal influência da LC na fertilidade pode ser devido à cronicidade da doença, acarretando danos ao sistema reprodutor.

De acordo com Othman et al. (2014), *C. pseudotuberculosis* é responsável pelo desequilíbrio hormonal em cabras não gestantes, podendo ser a causa da infertilidade de fêmeas soropositivas em um rebanho de acordo com hormônios avaliados no estudo.

Zerbinati et al. (2007) produziram um antígeno, denominado BMD (Banho-maria dialisado), e padronizaram um teste ELISA indireto para o diagnóstico da LC em soros caprinos naturalmente infectados e não infectados. Constatou-se que o teste

ELISA indireto, utilizando o antígeno BMD, apresentou maior capacidade de discriminação entre os animais com e sem a doença em relação ao teste ELISA indireto, utilizando o antígeno BHI (Infusão cérebro-coração), salientando-se, que a especificidade foi igual nos dois antígenos.

Paule et al. (2004b) obteve um método de extração de antígeno, a técnica TPP consiste na separação em três fases com sulfato de amônia e butanol a partir de proteínas secretadas da cultura da *C. pseudotuberculosis*. Essa técnica pode concentrar proteínas mantendo as suas propriedades antigênicas reveladas por ensaio de imunorreatividade da resposta imune humoral e celular de caprinos infectados experimentalmente. Além disso, proteínas ainda não identificadas de (16 e 125K Da) foram detectadas por esse método.

Carminati et al. (2005) constataram que o teste ELISA indireto TPP, apresentou capacidade de discriminar animais infectados de não infectados em relação a outros testes. Constatação esta compartilhada por Cerqueira et al. (2006) que além de utilizar o antígeno TPP, usou o MQD, BHI e frações Q5 e Q6 extraídos do sobrenadante da *C. pseudotuberculosis*.

Paule et al. (2004b) realizaram análise por SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida) e *Western blot* de antígenos somáticos e extracelulares da *C. pseudotuberculosis* usando *pool* de soros de cabras naturalmente infectadas, com diferentes técnicas para isolar as frações segregadas, localizadas na superfície celular e somáticas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Foram observadas 20 bandas na fração segregada, 35 bandas no extrato de superfície e 40 a 50 bandas na fração somática, dependendo do procedimento de extração. Sendo que dezesseis proteínas imunorreativas foram detectadas nas frações estudadas e bandas com pesos moleculares de 125, 108, 75, 68, 41, 40, 31 e 24 KDa foram reconhecidas com maior intensidade e todas elas foram observadas na fração segregada.

### 3.6 RESPOSTA IMUNE

O conhecimento atual sobre a patogênese da LC indica que a resposta imune humoral e celular são fundamentais para o controle da doença no animal (VALE et

al., 2016). O organismo animal pode apresentar várias formas de defesas contra agentes estranhos, dentre elas duas podem ser destacadas, a imunidade natural ou inata, que inclui a destruição inicial dos invasores pelo processo de fagocitose, e a imunidade específica que é mediada por células específicas T e pela produção de anticorpos (MURO et al., 2009).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa e é representada pela pele e mucosas que atuam como obstáculos físicos contra agentes invasores pelo processo de fagocitose. Entretanto, esse tipo de defesa é inespecífico agindo contra qualquer agente estranho que tente invadir o organismo, sendo na maioria das vezes suficientes para prevenir infecções, no entanto, quando a barreira é vencida a imunidade específica, representada pela humoral e celular, entra em ação (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

### 3.6.1 Resposta imune humoral

A resposta imune específica é a segunda fase de resposta contra um agente agressor e é ativada quando a defesa inata falha, ocorrendo o reconhecimento do antígeno e envolvendo moléculas, linfócitos T e B e outras células (TZARD, 2014).

Após o reconhecimento do antígeno e ativação dos linfócitos, ocorre a fase efetora, esta por sua vez pode ser celular, mediada por linfócitos T, como exemplo, T CD8+ associado ao complexo MHC I ou T CD4+ associado ao complexo MHC II; ou humoral, quando linfócitos B ativos expressam, na sua superfície, um receptor, no qual a parte responsável pelo reconhecimento do antígeno é uma imunoglobulina com função de anticorpos (VAZ, 2010).

Segundo Cardoso (2012), em resposta ao antígeno, os linfócitos B podem efetuar mudanças no isotipo da imunoglobulina que expressam, podendo assim alterar as propriedades efetoras destas moléculas mantendo a especificidade para o antígeno, essa possibilidade do linfócito B expressar uma forma membranácea ou segregada da mesma imunoglobulina deve-se ao processo *splicing* alternativo do RNA (Ácido ribonucléico).

Os anticorpos são produzidos de forma específica contra o antígeno que estimulou a produção. A relação antígeno-anticorpo possui, entre si, ligações que envolvem enzimas. Quando um determinado antígeno entra no organismo, é apresentado ao

sistema imune e desenvolve-se uma resposta imune humoral (MURO et al., 2009). Segundo Sting et al. (2012), a produção da fosfolipase D por *C. pseudotuberculosis* estimula a imunidade humoral, por se encontrar em maior concentração no meio extracelular.

Jeber et al. (2016) investigaram e compararam a influência da infecção por *C. pseudotuberculosis* e o desafio da PLD, sobre o nível de haptoglobina e amiloide sérica A, proteínas da fase aguda em caprinos. Os resultados demonstraram que a infecção bacteriana desencadeou maior liberação de neutrófilos e macrófagos, responsáveis pela produção de citocinas, que levam ao aumento da taxa de produção de proteínas da fase aguda, em particular a haptoglobina, confirmando o papel do PLD na patogênese da LC.

Bastos et al. (2013) citaram que a haptoglobina e o IgM são importantes marcadores de fase aguda na progressão do desenvolvimento da LC, uma vez que títulos altos desses marcadores aumentaram o risco do animal desenvolver abscessos.

As imunoglobulinas (Ig), IgM, IgD, IgA, IgE e IgG são produzidas e liberadas pelos plasmócitos no espaço sanguíneo e representadas como anticorpos humorais (TZARD, 2002). Segundo Tzard (2014), muitas proteínas protetoras, como anticorpos e componentes do sistema complemento, são encontradas no sangue e somente podem entrar em tecidos durante a inflamação. Gorniak; Pavic; Lauc (2012) citaram que a IgG, além de desempenhar um papel fundamental na imunidade adaptativa é a mais abundante no soro.

Vale et al. (2016) observaram uma forte resposta imune humoral em camundongos BALB/C infectados com a dose  $10^7$  UFC de uma estirpe T1 atenuada da *C. pseudotuberculosis* que demonstrou induzir uma forte resposta humoral, representada por altos níveis de IgG1 e IgG2 contra a bactéria.

### 3.6.2 Resposta imune celular

A imunidade celular pela *C. pseudotuberculosis* é estimulada devido à sua natureza facultativa intracelular (STING et al., 2012). Apesar da imunidade humoral estar presente, é a resposta celular que envolve o tipo TH1 que predomina, devido à natureza intracelular facultativa dos microrganismos com produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e outras citocinas que são importantes para controlar a infecção (VAZ, 2010).

Foram observados, em experimentos com camundongos BALB/C, uma intensa proliferação de linfócitos e produção *in vitro* de IFN- $\gamma$  e as Interleucinas IL-4, IL-10, IL-12 e óxido nítrico, por células do baço estimuladas com antígenos somáticos e secretados da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis* atenuada, bem como, um aumento significativo das citocinas do perfil Th1, 60 dias pós-inoculação (VALE et al., 2016).

Muitos estudos têm demonstrado que o IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12 são necessários para controlar infecções persistentes causadas por parasitas intracelulares, principalmente IL-12, que é uma citocina Th1 crucial para deslocamento, a qual é necessária para impedir a disseminação de agentes patogênicos no interior do alojamento, a fim de controlar a infecção por bactérias intracelulares facultativas, tais como *C. pseudotuberculosis* (PESTKA et al., 2004).

Souza et al. (2014), investigaram em camundongos, o envolvimento das vias de sinalização das proteínas-quinase ativada por mitógeno MAPK (MAPK p38, ERK 1 e ERK 2) com relação à produção de citocinas induzidas por antígenos secretados da estirpe atenuada T1 e a virulenta VD57 por *C. pseudotuberculosis* durante um curso de 60 dias de infecção. Seus resultados levantaram a hipótese de que essas vias são importantes reguladoras da resposta celular, ou seja, foi sugerido que as vias regularam a produção de citocinas pró-inflamatória e reguladoras nas células esplênicas de camundongos. A linhagem selvagem VD57 é conhecida por induzir LC em caprinos e camundongos e a T1 por não induzir a doença nesses animais (MEYER et al. 2005).

É sabido que a produção de IFN- $\gamma$  atua na diferenciação, troca e substituição de isotipos de anticorpos que ativam o complemento e opsonizam bactérias para fagocitose, portanto, a maioria dos estudos recentes está focada na resposta do IFN- $\gamma$ ; sendo a dificuldade da capacidade fagocítica uma das possibilidades para explicar a cronicidade e dificuldade de erradicação da doença (BASTOS et al., 2013).

Fortune et al. (2004), em seus estudos com *M. tuberculosis*, forneceram evidências de que a morte dos macrófagos pode ser através da inibição da sinalização medida por IFN- $\gamma$  no momento da transcrição.

Dorella et al. (2013) enfatizaram que, apesar dos avanços no sequenciamento e organização genômica da *C. pseudotuberculosis*, a sequenciação demonstra dados insuficiente de como as proteínas de um organismo funcionam individualmente ou em conjunto para desempenho de suas funções.

Alves et al. (2016) conseguiram realizar o sequenciamento completo do genoma de *C. pseudotuberculosis*, estirpe PA01, isolado de ovinos infectado no Pará, o comprimento do genoma foi de 2.337.920bp, e 2.003 sequências codificadoras (CDS), 12 rRNAs e 49 tRNAs. A conclusão do sequenciamento de todo o genoma para *C. pseudotuberculosis*, estirpe 1002, contribui para avanços importantes em pesquisas voltadas para a compreensão da biologia desse patógeno (PINTO et al., 2014). Sendo esse o primeiro genoma a ser sequenciado, a partir do isolamento da linhagem de um caprino no Brasil (RUIZ et al., 2011). De acordo com Resende et al. (2011), o genoma da cepa 1002 tem 2.34 Mb (megabases), 2.203 genes que podem expressar provavelmente 2.090 proteínas. Além disso, apresentam um conteúdo de G+C de 52,2%.

De acordo com Bastos et al. (2012), conhecimentos nos mecanismos moleculares e base genética de virulência de *C. pseudotuberculosis* é crucial para compreender as associações hospedeiro-patógeno. Essa interação, que sofre influência de fatores como virulência bacteriana, carga infectante e resistência ao hospedeiro que levará ao resultado de imunidade ou doença (AYELE et al., 2004). Pois, a *C. pseudotuberculosis*, para resistir ao estresse e invadir o sistema imune do hospedeiro, pode alterar sua expressão gênica (SILVA et al., 2017).

Ribeiro et al. (2014) utilizando a tecnologia de próxima geração (Life Technologies<sup>TM</sup>, CA), identificaram um grande número de genes presumidos para serem requeridos por *C. pseudotuberculosis* 1002 para sobrevivência em ambientes desfavoráveis, como acidez, choque térmico e estresse osmótico. Além disso, acredita-se que a identificação desses genes pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas que sejam mais efetivas, kits de diagnóstico e terapias para a linfadenite caseosa.

### 3.7 IMUNÓGENOS E VACINAS

Além do manejo sanitário, a vacinação de animais saudáveis é a estratégia amplamente recomendada como ação de profilaxia, além de ser o método mais adequado para o controle e redução na ocorrência de abscessos no rebanho (ROSLINDAWANI et al., 2016).

Segundo Listos (2016), erradicação da doença por fármacos não é eficaz e a detecção clínica de animais infectados é de eficiência limitada, assim como, aplicação de antissépticos e desinfetantes Santiago et al. (2013) salientando que o animal apresenta melhora clínica com antibióticos, mas não deixa de ser portador da enfermidade.

Faccioli-Martin et al. (2014) afirmaram que, através das vacinas, é possível elaborar formulações que podem modular a resposta imune e prevenir doenças. Muitos estudos neste ramo, voltado para erradicação de LC já serviram para aprimorar a análise de processamento e apresentação de antígenos para uma melhor caracterização da resposta imunológica.

No Brasil, existem três produtos licenciados pelo MAPA para uso em ovinos e caprinos, a Glanvac-6®, Linfo Vac® e a vacina 1002®, porém são necessários mais estudos em campo para uma maior longevidade da resposta imune (FACCIOLI-MARTIN et al., 2014). Sendo que a vacina viva atenuada, produzida pela cepa 1002®, confere uma imunoproteção de 83% (RIBEIRO et al., 1991). A partir dela, a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) lançou sua vacina atenuada em 2000 com 3 meses de validade e revacinação anual.

Além disso, segundo Santana-Jorge et al. (2016), quando compararam com uma vacina de DNA (proteína específica) com as vacinas tradicionais vivas atenuadas e inativadas, relataram que esse tipo de vacina tem um potencial de desenvolver uma resposta imune mais eficaz, específica, segura e duradoura, sem efeitos indesejados.

Fontaine et al. (2006) abordaram em seus estudos de experimentação vacinal em ovelhas, que, se for escolhida uma única vacina comercial, está deverá ter a capacidade de proteger da infecção, independente da variação de isolados diferentes, e da sua origem geográfica, salientando assim, a importância de um modelo eficaz de vacina contra LC.

Segundo Wernery; Kinne (2016), as vacinas contra LC para ovelhas e cabras estão comercialmente disponíveis e são formuladas a partir do sobrenadante da cultura de

*C. pseudotuberculosis* atenuada ou inativada com formalina, contendo PLD, antígenos ultra-filtrados de *C. pseudotuberculosis*; *Cl. perfringens* tipo D e C e *Cl. Tetani*.

Mahmood et al. (2015) avaliaram as alterações sanguíneas em caprinos após o desafio com *C. pseudotuberculosis* e sua exotoxina, PLD. Os resultados mostraram alterações significativas no hemograma, leucograma e na bioquímica do sangue, além de constatarem que, embora a PLD tenha um papel chave na patogênese da LC, quando inoculada separadamente, demonstraram reações e respostas diferentes em relação aos parâmetros do estudo.

Várias vacinas foram testadas com a utilização de células vivas atenuadas e mortas de *C. pseudotuberculosis* (consideradas da primeira geração) e com a toxina atenuada (toxóide) com ou sem adjuvante (segunda geração), todas elas demonstrando diferentes graus de imunoproteção, tanto em caprinos como em ovinos. Entretanto, é necessária a avaliação da eficácia a campo, baseada nas pesquisas já existentes com o propósito da elaboração de um programa integrado de medidas profiláticas contra a doença (SANTOS et al., 2016).

Alves (1998) avaliou a eficácia de uma vacina toxóide no controle da LC em caprinos, através do teste de inibição da hemólise sinérgica (IHS) que demonstrou reduzir a disseminação de *C. pseudotuberculosis* do local da inoculação para outras partes do corpo.

Outra tentativa vacinal contra LC, que vem sendo testada é a vacina de DNA (Ácido desoxirribonucleico) (considerada da terceira geração), esse tipo de vacina introduz, por meio de um plasmídeo, genes que codificam um antígeno específico dentro de uma célula viva do hospedeiro, resultando na ativação contra o imunógeno entregue pelo gene (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Costa et al. (2011) produziram uma vacina de DNA utilizando o gene hsp60, o qual codifica as proteínas de choques térmicos, Hsp60. Essas proteínas são capazes de promover resposta humoral e celular em mamíferos. Seus resultados mostraram que o gene provocou uma produção significativa de isotipo anti-hsp60 IgG, IgG1 e IgG2a em camudongos, mas não conferiram imunidade protetora contra infecção.

Pode-se destacar diversas vantagens da vacina de DNA, como estabilidade, baixo custo de produção além de induzir ambos os tipos de imunidade, celular e humoral

(BABIUK et al. 2000). No entanto, apesar dos pontos positivos, os resultados alcançados ainda são considerados pouco satisfatórios (COSTA et al., 2011).

Segundo Bastos et al. (2012), modelos de vacinas com cepas de bactérias vivas atenuadas já foram realizadas, no entanto, o comum entre essas pesquisas é o fato dessa vacina ter uma variação no nível de proteção imunológica, resposta imune humoral notória e redução apenas no número de lesões de LC. Ruiz et al. (2011) citaram que tipos de adjuvantes, dosagem, via de aplicação da vacina, antígenos entre outros motivos são importantes na eficácia das vacinas.

Ribeiro et al. (1991) demonstraram que a utilização da cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis* como componente de uma vacina viva atenuada, proporciona uma proteção de 83%, enquanto que mesma cepa inativada oferece apenas 42%.

Meyer et al. (2002) avaliaram em caprinos, a resposta imune humoral induzida pela vacina liofilizada, testando várias doses e épocas de reforços, os resultados evidenciaram que o referido preparo liofilizado promove a produção de anticorpos específicos em doses iguais ou maiores que  $10^9$  UFC e que a profilaxia ministrada não promoveu lesões nos animais vacinados.

Roslindawani et al. (2016) utilizaram uma vacina recombinante contra LC, por meio de várias porcentagens de óleo de palma como adjuvante para medir a resposta imune celular em modelos de ratos. Concluindo-se que a vacina, adicionada de 3% de óleo de palma, tem potencial, pois desencadeou uma resposta imune elevada e duradoura, a nível celular.

Droppa-Almeida et al. (2016) desenvolveram uma vacina recombinante baseada na proteína CP40 (rCP40) combinada com adjuvante completo de Freund ou saponina, para avaliar sua eficácia em um modelo murino contra *C. pseudotuberculosis*. Após o desafio com a cepa virulenta C57 ( $10^4$  CFU), foram observadas concentrações elevadas de anticorpos IG2a e IG2b, sinalizando uma resposta do tipo Th1, sendo assim, os autores sugerem que a proteína recombinante proporcionou proteção após o desafio, independente do tipo de adjuvante.

De acordo com os estudos de Shadnezhad; Naegeli; Collin (2016), a proteína CP40 que está sendo desenvolvida como uma vacina promissora contra LC, não é uma protease como abordada na literatura, evidências fortes redefiniram-na como uma endoglicosidase que hidrolisa ligações dentro das cadeias de glicano de IgG, além

de ter atividades em proteínas hospedeiras imunologicamente importantes. Outras glicosidases de agentes patogênicos bacterianos, com atividade em glicoproteínas em mamíferos já foram caracterizadas (GARBE; COLLIN, 2012).

Faccioli-Martin et al. (2014) observaram que a vacina australiana contra LC, baseada principalmente em toxoide, com recomendações de aplicações com duas doses no cordeiro e a associação com revacinações anuais, é capaz de reduzir a prevalência da doença.

Wernery; Kinne (2016), num experimento de vacinação em camelos contra a LC, observaram duas espécies de camelos domesticados da América do Sul que além de serem afetados por esta doença em seus países de origem, também foram encontrados relatos nos EUA e especialmente na Europa em que foram introduzidos como animais de companhia. Afirmaram que os dois biotipos (biovar *ovis* e biovar *equi*) foram identificados em camelos usando o teste de redução de nitrato. Em razão disso, foi elaborada uma vacina contendo 750µg de PLD por dromedário, proporcionando uma proteção completa contra uma dose de resposta contendo  $4,0 \times 10^3$  UFC/mL envolvendo ambos biotipos.

Windsor; Bush (2016) afirmou que a vacina contra a LC, desenvolvida em 1984 para ovinos na Austrália, foi combinada com os componentes da vacina clostridial (Glanvac-6<sup>®</sup>), comumente chamada de “6 em 1”. A inclusão dessa vacina comercialmente levou ao uso generalizado nos rebanhos de ovinos na Austrália e aparente redução da doença, com base nos dados de abatedouros em 2009. Sugerindo-se que a diminuição dos casos de LC, no período estudado, provavelmente esteja relacionada com o uso correto do programa de vacinação na Austrália, atrelado a um maior empenho dos proprietários no controle adequado da doença.

Bastos et al. (2012) salientam que, apesar dos avanços na área da imunização de caprinos e ovinos contra LC, é essencial um modelo vacinal que promova 100% de proteção a esses animais, pois as vacinas comerciais provocam uma proteção parcial. Além disso, deve-se ter atenção aos eventos iniciais da infecção, pois a imunidade inata é responsável pelo controle inicial, sendo necessárias mais pesquisas com vacinas que possa estimulá-la melhor.

### 3.8 DIAGNÓSTICO

Nas últimas décadas, vários métodos têm sido utilizados no diagnóstico da LC em pequenos ruminantes, incluindo hemaglutinação indireta, fixação de complemento, inibição sinérgica, além dos testes sorológicos de imunidade celular e técnicas de biologia molecular. Na prática, o isolamento microbiano de *C. pseudotuberculosis*, a partir do material purulento de linfonodos e órgãos acometidos, ainda representa o procedimento mais utilizado na rotina de diagnóstico (MOTTA; CREMASCO; RIBEIRO et al., 2010).

De acordo com Oreiby (2015), não existe um teste de diagnóstico único que poderia identificar todos os casos ou mesmo diferentes estágios da doença. O diagnóstico da LC em ovinos e caprinos pode falhar se um único teste é utilizado, pois cada método diagnóstico tem limitações, sendo aconselhável o uso de teste repetitivo.

#### 3.8.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico da LC é baseado primeiramente no exame clínico e poderá ser realizado mediante a observação da presença do abscesso superficial, no entanto, ele geralmente é efetivado num estágio avançado, pois quando aparece, o animal já pode estar com a saúde comprometida, além do que a palpação de linfonodos não é confiável, pois sua textura e aspecto é dependente do estágio de infecção da doença (OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA XAVIER et al., 2016).

Esta pode ser expressa de forma interna ou externa, separadamente ou em conjunto. No caso das lesões nos linfonodos superficiais, a LC aparece inicialmente como abscessos que se convertem, mais tarde, em piogranulomas de milímetro a centímetros de diâmetros (ALVES et al., 2016). Geralmente o animal acometido apresenta formação de grandes caroços na região da cabeça, pescoço e mandíbula (OLIVEIRA, 2013).

As lesões viscerais não são detectáveis clinicamente, mas se expressam conforme o seu número, local e efeito sobre o órgão envolvido. Perda de peso progressiva, distúrbios respiratórios e timpanismo ruminal crônico recorrente são os sinais mais proeminentes que podem acompanhar lesões viscerais (HASSAN et al., 2011).

Se os abscessos causados pela *C. pseudotuberculosis*, estiverem localizados nos órgãos vitais do animal, este pode vir a óbito. Pinheiro et al. (2013) localizaram um abscesso na parede da aorta torácica que foi responsável pela formação de aneurisma e levou a morte do animal relacionando a um caso da LC visceral.

De acordo com Chirino-Zárraga et al. (2006), além do exame clínico dos animais, deve-se levar em consideração os dados epidemiológicos da prevalência local e idade do animal. Segundo Rizzo et al. (2017), rebanhos criados em sistema extensivo e semiextensivo apresentam maior chance de ocorrência da LC. Esses autores observaram em seu trabalho com pequenos ruminantes no estado de Sergipe a ocorrência e distribuição topográfica de linfonodos superficiais com alterações clínicas e constataram que a alta taxa da enfermidade, deve-se a falhas importantes no manejo sanitário, como a baixa utilização da quarentena e desinfecção de instalações que propiciam respectivamente a entrada de animais enfermos.

### 3.8.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial deve ser feito através de exame bacteriológico do material caseoso para isolamento e confirmação do agente que é considerado o método mais poderoso de identificação da bactéria (SEYFFERT, 2010; DUNO et al., 2016). No entanto, segundo Rebouças et al. (2011), *C. pseudotuberculosis* é de crescimento relativamente demorado em meios de cultura bacteriológicos e a identificação deste agente em diferentes amostras clínicas por métodos microbiológicos tradicionais, leva cerca de 3 a 5 dias.

De acordo com Listos et al. (2016), *C. pseudotuberculosis* é geralmente fácil de ser isolada do material coletado, que pode conter ao mesmo tempo outras bactérias piogênicas como *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Pasteurella multocida*, sendo importante a diferenciação de patógenos oportunistas que podem vir a causar abscessos. Os testes de hipersensibilidade ou alérgicos foram os primeiros testes indiretos, no entanto, sua especificidade é limitada (FACCIOLI-MARTIN et al., 2014).

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é o teste sorológico mais comum utilizado para detectar respostas imunológicas contra *C. pseudotuberculosis* devido

as suas vantagens, que incluem a eficácia de custo, facilidade de aplicação, a sensibilidade e especificidade aceitável (HOELZLE et al., 2013). Porém, sua especificidade e sensibilidade podem variar de acordo com o antígeno e combinações de conjugados (FACCIOLI-MARTIN et al., 2014).

Seyffert et al. (2010) alcançaram 98,5% de especificidade e 93,5% de sensibilidade realizando o teste ELISA para detecção de imunoglobulinas específicas totais do antígeno secretado pela *C. pseudotuberculosis*.

Segundo Carminati et al. (2003), a sensibilidade e a especificidade são parâmetros fundamentais para a definição de um teste diagnóstico, salientando que a fração secretada da *C. pseudotuberculosis*, desenvolvida para um teste de Elisa Indireto para diagnóstico da LC em caprinos se mostrou eficaz com valores de 93,5% e 100% de sensibilidade e especificidade respectivamente.

Segundo Rebouças et al. (2011), um teste com sensibilidade reduzida pode levar a ter animais falso-negativos nos resultados, enquanto aquele com especificidade mais baixa pode levar a falsos-positivos.

Kaba; Kutschke; Gerlach (2001) trabalharam com extrato da bactéria como antígeno para desenvolvimento de um teste ELISA para o diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* em cabras, correlacionando com os resultados do teste *Western blot*, os quais obtiveram resultados altamente significativos ( $K= 0,93$ ).

Rebouças et al. (2013) utilizaram ELISA indireto para detectar anticorpos específicos contra *C. pseudotuberculosis*, em ovinos, por meio do sobrenadante de cultura da cepa T1 como antígeno, e concluíram que esse teste pode ser utilizado com alto grau de confiança para o diagnóstico da LC em ovinos e caprinos. No entanto, essa técnica ainda não está acessível no Brasil para rebanhos comerciais, apenas em algumas instituições acadêmicas, voltadas para pesquisa em pequenos ruminantes.

Rezende (2013) usou ELISA para diagnóstico de LC em 182 soros de ovinos e revelou sensibilidade e especificidade de 90% e 75,6%, respectivamente, comprovando que o ELISA pode ser utilizado no diagnóstico de LC em rebanhos ovinos com alta sensibilidade.

Fehlberg (2010), além do ELISA, usou PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para diagnosticar a LC em caprinos infectados, salientando que esse teste vem ganhando cada vez mais credibilidade. De acordo com Çentinkaya et al. (2002), a

PCR tem se tornado uma ferramenta acessível em diversos laboratórios de pesquisa e muitos pesquisadores vêm desenvolvendo *primers* específicos para *C. pseudotuberculosis*.

Dorneles et al. (2014) abordaram que a técnica ERIC-PCR (reação em cadeia da polimerase de regiões consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias) como uma das técnicas com a qual se tornou possível diferenciar a cepa *biovar equi* da cepa *biovar ovis*, sendo ela a mais acurada no momento devido à sua utilidade para investigações de epidemiologia molecular.

As proteínas da fase aguda da LC são detectadas no sangue e sua concentração aumenta ou diminui em resposta à infecção, inflamação e lesão. Essas proteínas são consideradas biomarcadores sensíveis, mas não têm especificidade para diferentes agentes infecciosos podendo ser também usadas no diagnóstico de inflamação, acompanhamento do progresso do tratamento, prognóstico e rastreamento do estado de saúde do animal (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

### 3.9 CONTROLE E PREVENÇÃO

De acordo com Mira et al. (2014), um grande fator que interfere no controle da LC é a falta de locais adequados nas propriedades para o isolamento de animais com suspeitas da doença, além do transporte e comercialização destes, que ajudam a disseminar a enfermidade.

Para Windsor et al. (2016), é um processo desafiador e necessário, requerer mudanças no conhecimento, atitudes e práticas do proprietário rural em relação ao gerenciamento das fazendas que trabalham com exploração de caprinos e ovinos.

Para controle da doença nos rebanhos, a vacinação de animais sadios é ainda o melhor método (LACASTA et al., 2015). Medidas mais rigorosas como o abate de animais infectados e incineração de suas carcaças são também utilizadas para se ter o controle dos animais sadios nos rebanhos (WINDSOR, 2011).

O campo de pesquisa para *C. pseudotuberculosis* é amplo e está cada vez mais avançando. As perspectivas futuras estão voltadas para estudos moleculares de

bioinformática e modelos vacinais direcionados para bactérias recombinantes, como também análises proteômicas de proteínas candidatas a vacinas eficazes contra a enfermidade (RADUSKY et al. 2015; SILVA et al. 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL

O experimento foi realizado na Fazenda Vic III, localizada no Município de Rafael Jambeiro-Ba, latitude 12° 23' 57" S, longitude 39° 30' 56" W Oeste de clima tropical com estação seca. Área endêmica, com registros de casos na fazenda.

As análises foram realizadas no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA.

### 4.2 ANIMAIS E MANEJO

Foram utilizados soros de 100 cabras, criadas em sistema extensivo (fundo de pastos), com 2-3 anos de idade, sem raça definida, sem sinais clínicos de doenças e sorologicamente negativas para a linfadenite caseosa. A escolha desses caprinos foi realizada após o *screening*, ou seja, separação dos animais soronegativos e soropositivos através do teste sorológico. Esses animais foram avaliados por exame clínico através da palpação dos linfonodos superficiais, além da sorologia e histórico clínico. Salientando que esses animais pastoreavam livremente, podendo ocorrer contato com animais de outras propriedades.

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=20), vacinados e acompanhados sorologicamente por 364 dias. O G5 (grupo 5) recebeu aplicação de solução fisiológica e foi denominado de grupo controle. A aplicação da vacina (imunobiológico) se deu no dia zero e a revacinação 21 dias após a primeira dose, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 – Grupos, dose vacinal e dias de coleta de sangue dos animais

Grupo	Dose vacinal (UFC)	Vacinação	Revacinação	Coletas (dias)
G1	10 <sup>7</sup>	Dia 0	-	0; 21; 28, 56, 84, 112, 140, 168, 196, 224, 252, 282, 308, 336, 364
G2	10 <sup>7</sup>	Dia 0	21 dias	
G3	10 <sup>6</sup>	Dia 0	-	
G4	10 <sup>6</sup>	Dia 0	21 dias	
G5	Solução Fisiológica	-	-	

A vacina foi aplicada via subcutânea, na dose de 1mL por animal, utilizando-se agulhas individuais e pistola dosadora. Para o experimento vacinal, foram colhidos 10mL de sangue da veia jugular, com tubos BD Vacutainer®, em seguida essas amostras foram centrifugadas para obtenção do soro e posteriormente avaliação da resposta sorológica.

Os animais foram acompanhados pela equipe de pesquisadores durante o período de um ano para registrar o perfil sorológico dos animais e possíveis reações pós-vacinais, sendo, que esse imunobiológico já foi previamente testado em animais de laboratório, portanto é considerado inócuo e seguro para uso em caprinos. Salientando-se que o produto, na forma líquida, com a mesma cepa (*C. pseudotuberculosis* cepa 1002) já é comercialmente utilizado em caprinos e ovinos há mais de uma década, sem problemas.

#### 4.3 PRODUÇÃO DA VACINA

Uma alíquota da cultura semente de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002, foi semeada em caldo Brain Heart Infusion Broth® (BHI) e incubada em estufa 37°C por 48 horas. Após o crescimento bacteriano a cultura foi semeada em Ágar Tryptose® e incubada a 37°C por 48 horas. Findado o período de incubação a cultura foi semeada em Caldo tryptose com *tween* e incubada em estufa a 37°C por 48h. Na sequência, centrifugou-se e separou-se o sobrenadante, cuja amostra foi retirada para bacterioscopia pelo método de Gram e titulação em placa de Ágar Sangue enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril. Com o resultado da titulação, o sobrenadante foi misturado ao estabilizante de liofilização (leite em pó) sob agitação. Após envase em frascos de vidro, o processo foi conduzido em

liofilizador, sob condições de condensação de -40°C e secagem a 15°C, sob vácuo de 10<sup>1</sup>mbar, por 48 horas. A vacina pronta foi submetida aos testes de pureza, titulação em Ágar Sangue, inocuidade e eficácia.

#### 4.4 ANTÍGENO

##### 4.4.1 Produção do antígeno BHI

O protocolo de produção deste antígeno foi realizado segundo Carminati (2003), para tanto utilizou-se uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* (cepa 1002) cedida do ICS (Instituto de Ciências da Saúde) da Universidade Federal da Bahia. Neste protocolo, o cultivo da cepa em caldo BHI foi utilizado para realizar a expansão em 200mL, ao qual foi incubado em estufa a 37°C durante 48 horas. Após esse período, o cultivo foi analisado quanto a sua pureza, aliqotado no fluxo laminar em tubos de ensaio de 10mL e centrifugado durante 30 minutos a 4000g/s. A massa celular foi eliminada e o sobrenadante foi ressuspendido em 10mL de Tampão fosfato-salino (PBS) estéril. A suspensão resultante foi agitada e aquecida em banho-maria a 80°C, durante 2 horas, agitando-se em intervalos aproximados de 15 minutos. Após o resfriamento a suspensão celular foi centrifugada a 4000g/s durante 10 minutos para eliminar as macropartículas e restos celulares. O líquido sobrenadante com o antígeno foi recolhido e congelado durante 48 horas à temperatura de -20°C, e os sedimentos foram descartados após esse período. O antígeno foi descongelado e centrifugado a 4000g/s durante 10 minutos para eliminar os lipídeos. O sedimento foi eliminado e o sobrenadante congelado novamente, o qual foi dialisado a uma temperatura de 4°C, durante 3 dias com PBS, sendo a solução trocada a cada 8 horas. Assim, o antígeno pronto foi congelado a temperatura de -20°C até ser usado.

#### 4.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA) COM ANTÍGENO BHI

Placas de poliestireno de fundo chato (Costar®) foram sensibilizadas com 100µl do antígeno BHI, diluído em 1:100 de tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6 e incubadas em câmara úmida a 4°C por aproximadamente 18 horas. Após duas lavagens com PBS contendo 0,1% de *tween-20* (PBS-T-20), as placas foram bloqueadas com 200µl/poço de PBS-T20 contendo 5% de leite desnatado, durante duas horas. A seguir, foram incubadas com 50µl/poço dos soros testes diluídos em 1:100 de PBS-T-20 contendo 0,5% de BSA (soro fetal bovino) durante 1 hora. Após 5 lavagens em PBS-T-20, adicionou-se às placas, 50µl de imunoglobulinas de coelho anti-imunoglobulina IgG de caprino, conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich®), diluída em 1:10.000 de PBS-T-20. As placas foram incubadas a 37°C por 45 minutos e, em seguida, lavadas cinco vezes em PBS-T-20 e incubadas com 50µl poço da solução reveladora (10mL de tampão cítrico-fosfato pH 5,1 + 4mg de ortofenilenodiamina + 4µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 15 minutos, a temperatura ambiente, protegendo-se da luz. A reação foi freada com 25µl do ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N. A leitura foi realizada em Leitor de ELISA, usando-se filtro de 490nm de comprimento de luz.

O ponto de corte utilizado no experimento foi de 0,248; baseado no teste ELISA BHI para caprinos padronizado por Zerbinati et al. (2007) com sensibilidade e especificidade de 98% ambos.

#### 4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esse projeto foi aprovado pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da UFRB e está registrado sob o número 23007016893/2013-73.

Dentro desse projeto foi realizado um subprojeto voltado para o bem estar animal, como forma de evitar o estresse por excesso de força na contenção física para coleta de sangue e outras atividades, evitando traumas e possíveis acidentes, tendo

como objetivo também demonstrar aos funcionários do local, a forma mais adequada de manejar os caprinos.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise Estatística dos dados considerou Medidas Repetidas nos tempos, segundo um arranjo fatorial com a finalidade de melhor modelar o tempo (medidas repetidas). Foram utilizadas modelos Lineares Mistos, considerando o fator principal as doses, como efeito fixo, e os diferentes tempos como efeito aleatório. O modelo considerado no desenho experimental é descrito a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + \lambda_i + \tau_j + \lambda\tau_{i(j)} + \varepsilon_{ijk}, \text{ onde:}$$

Os índices do modelo referem-se aos:  $i$ -diluições das doses vacinais;  $j$ -tempos avaliados para as  $k$ -repetições.

$\tau_j$  - representa o efeito associado ao  $j$ -ésimo tempo

$\lambda_i$  - representa o efeito associado ao  $i$ -ésimo tempo de repetição da medida

$\lambda\tau_{i(j)}$  - representa o efeito aleatório do  $i$ -ésima diluição dentro do  $j$ -ésimo tempo para a  $n$ -ésima unidade experimental

$\varepsilon_{ijk}$  - representa o vetor de erros aleatórios associados ao modelo

A comparação múltipla das médias foi implementada pelo método de Tukey HSD considerando um nível de significância:  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Os animais foram examinados clinicamente quanto à presença de reações no local da inoculação ao longo do experimento, todavia não foram observadas lesões em nenhum dos grupos estudados, comprovando a inocuidade do produto.

Os grupos vacinados e revacinados com as doses  $1 \times 10^6$  UFC e  $1 \times 10^7$  UFC, foram acompanhados através do teste ELISA Indireto ao longo de 364 dias mediante valores de D.O. (Densidade Óptica), utilizando 0,248 como ponto de corte.

Os resultados a seguir, demonstrados nas Figuras 1; 2; 3; 4 e 5, expõem a média da cinética da produção de anticorpos nos grupos, durante o experimento, de acordo com os valores de D.O.

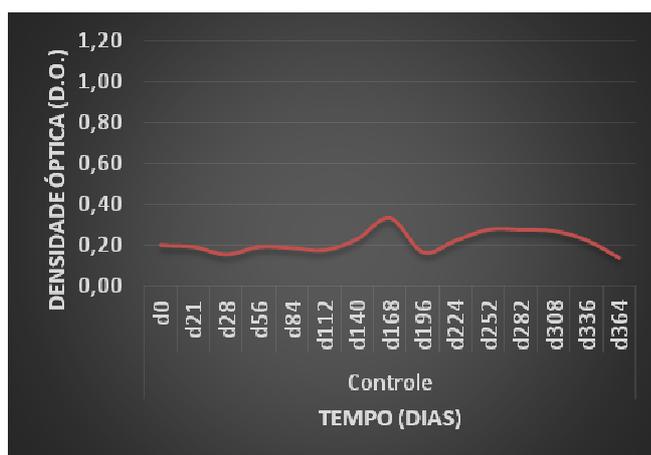


Figura 1 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA a partir de amostras de soros do animais do grupo controle.

O grupo controle apresentado na Figura 1, comportou-se como esperado, demonstrando valores de D.O. baixo, quando comparados aos grupos imunizados, apresentados nas figuras (2; 3; 4 e 5). No entanto, observou-se uma pequena variação na produção de anticorpos, com aumento discreto a partir dos 140 dias. Porém, essa variação deve-se provavelmente ao contato destes animais com outros animais da propriedade que não receberam a vacina, além do fato da área utilizada para o estudo ser considerada endêmica para a LC.

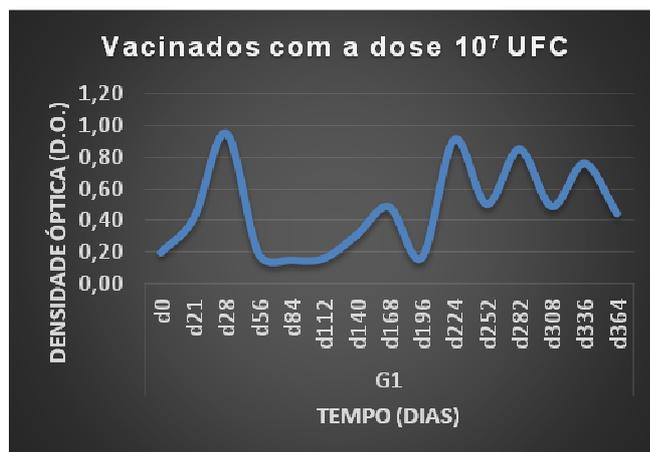


Figura 2 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA a partir de amostras de soros de animais vacinados com  $1 \times 10^7$  UFC da vacina atenuada liofilizada contra *C. pseudotuberculosis*.

Os caprinos vacinados com a dose  $10^7$  UFC ilustrados na Figura 2, iniciaram uma resposta humoral a partir de 21 dias, e tendo seu pico com 28 dias com valores de D.O. acima de 0,8 e um decréscimo nos níveis de anticorpos nos dias posteriores. Identificou-se um outro pico da resposta a partir de 196 dias, observando-se uma redução na produção de anticorpos no último ponto de coleta.

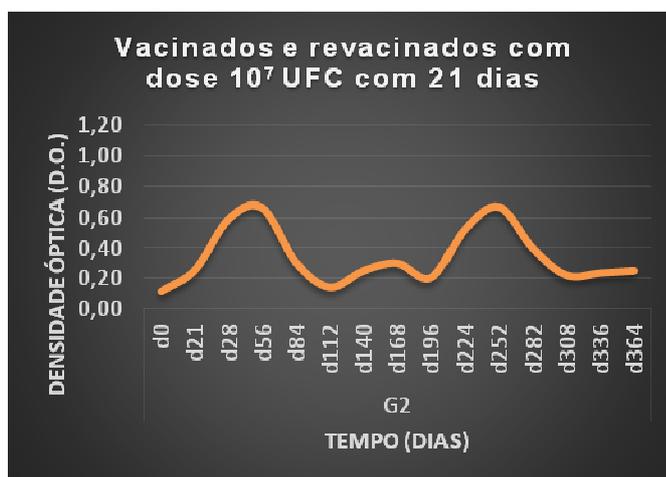


Figura 3 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA a partir de amostras de soros de animais vacinados e revacinados com a dose  $1 \times 10^7$  UFC da vacina atenuada liofilizada contra *C. pseudotuberculosis*.

A Figura 3 mostra a produção de anticorpos dos animais do G2, inoculados com  $10^7$  UFC da vacina liofilizada e revacinados com 21 dias. Notou-se do dia 0 até 56 dias

uma curva ascendente com valores de D.O. acima de 0,6 e apresentando um declínio nos títulos de anticorpos nos dias seguintes. Aproximadamente com 224 dias foi observado um aumento notável na produção de anticorpos, atingindo o pico da resposta a partir de 252 dias, com valores de D.O. acima de 0,6. Observando-se nos períodos subsequentes um decréscimo nos títulos de anticorpos até o último ponto de coleta.

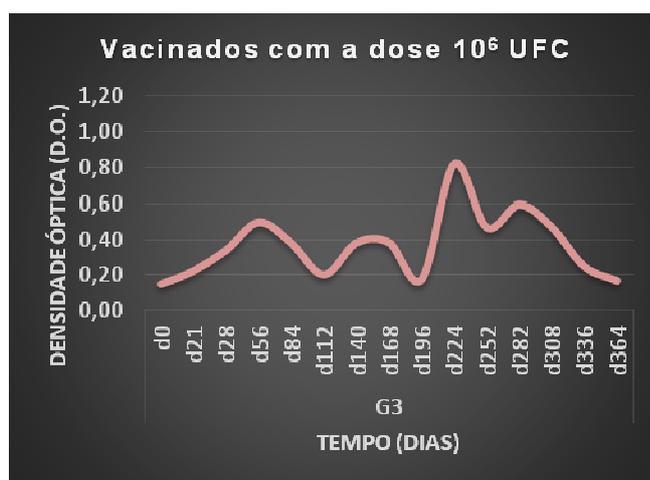


Figura 4 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA a partir de amostras de soros de animais vacinados com  $1 \times 10^6$  UFC da vacina atenuada liofilizada contra *C. pseudotuberculosis*.

Verificou-se, na figura 4, G3, valores de D.O. abaixo de 0,6 até 196 dias do experimento, onde foi verificado um elevação da produção de anticorpos, atingindo o pico com 224 dias e valores de D.O. acima de 0,8. Identificando uma redução notável da resposta humoral a partir de 336 dias até o último dia de coleta.



Figura 5 – Valores de D.O. mensurados pelo teste ELISA a partir de amostras de soros de caprinos vacinados e revacinados com 21 dias com  $1 \times 10^6$  UFC da vacina atenuada liofilizada contra *C. pseudotuberculosis*.

Os dados das amostras dos caprinos do G4, estão apresentados na Figura 5 e demonstram que a resposta humoral iniciou com aproximadamente 21 dias e atingiu o pico com valores expressivos de D.O. acima de 1 com 28 dias. No entanto, tiveram uma queda nos títulos de anticorpos nos dias posteriores, oscilando abaixo de 0,6 até 196 dias, no qual foi registrado um aumento na produção de anticorpos com um novo pico acima de 0,8 a partir de 224 dias e ao redor de 308 dias foi identificado redução da resposta até o ultimo dia do experimento.

Os grupos experimentais apresentaram uma resposta humoral ao longo do estudo, com oscilações detectáveis através dos títulos de anticorpos pelo teste ELISA indireto, essa situação indica que a cepa 1002 liofilizada foi capaz de induzir uma resposta imunológica.

Apesar dos valores de D.O. terem variado no decorrer do experimento, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as doses testadas e tempo de revacinação entre os grupos. Portanto, pode-se inferir que a dose  $10^6$  UFC é mais indicada na imunização de caprinos, evitando-se uma carga maior de imunógeno para estímulo da resposta humoral, de acordo com o protocolo seguido no experimento.

Ademais, o resultado satisfatório de qualquer vacina está relacionado ao uso correto da mesma, às condições de preparo e conservação, como também ao empenho do proprietário de seguir fielmente a protocolo de vacinação do seu rebanho.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi conduzido para avaliar o aspecto da resposta imune humoral de cabras vacinadas com a cepa 1002 atenuada liofilizada contra a LC.

Em um estudo realizado por Ribeiro et al. (1991), usando a mesma linhagem de *C. pseudotuberculosis* (1002) deste trabalho, só que em fase líquida, com cinco doses diferentes da vacina inoculadas em caprinos, os autores observaram um aumento das concentrações de anticorpos quando comparada ao grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados no presente experimento, visto que os grupos imunizados obtiveram produções de anticorpos superiores ao grupo controle, praticamente, ao longo de todo experimento.

Meyer (2002), em seu experimento com a cepa atenuada viva liofilizada (1002), usou diferentes esquemas de vacinação, reforços e doses ( $10^7$  a  $10^{11}$  UFC), para avaliação da resposta humoral em caprinos e concluiu que o preparo liofilizado aparentemente promoveu a produção de anticorpos específicos em doses iguais ou maiores que  $10^9$  UFC ao longo de quatorze meses do experimento. Resultados diferentes foram mostrados no presente estudo, sendo que doses menores foram capazes de induzir a resposta humoral. Assim como nos achados de Ribeiro et al. (1991), com a vacina líquida, que obtiveram valores de D.O. mais alto, com doses menores,  $10^4$  UFC.

Meyer (2003) cita no seu trabalho, que obteve valores máximos de D.O. abaixo de 0,4, usando a mesma cepa deste trabalho. Por outro lado, Pacheco et al. (2011), menciona que resultados similares já foram encontrados na literatura, sugerindo que a resposta pouco intensa da linhagem é devido à atenuação da mesma.

Vale et al. (2016) utilizaram a cepa T1 atenuada da *C. pseudotuberculosis*, em camundongos com doses crescentes ( $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  UFC) e eutanasiaram esses animais após 120 dias de inoculação. Apesar de elevados aumentos de IgG ao longo de vários pontos do experimento, detectados pelo teste ELISA, não foram observadas diferenças estatísticas e qualquer evidências de lesões, mesmo utilizando uma dosagem maior. Assim como no presente trabalho, as doses  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  UFC também não promoveram resultados com diferenças

estatísticas e nem a presença de abscessos no local de vacinação ou em qualquer linfonodo superficial, detectável ao exame clínico. Lesões também não foram observadas por Moura-Costa et al. (2008), que usaram a estirpe T1 ( $10^7$  UFC). Entretanto, vale ressaltar que tanto a linhagem bacteriana como as concentrações foram diferentes. Ademais, Almeida et al. (2016) acrescentaram que a cepa T1 e 1002 da *C. pseudotuberculosis* são consideradas naturalmente de baixa virulência.

Hoelzle et al. (2013) demonstraram que há diferenças na resposta imune de cada espécie a diferentes antígenos de *C. pseudotuberculosis*, que variam de acordo com os isolados de ovinos ou caprinos. Abordando também a variação da resposta que pode oscilar dentro da própria espécie, como neste trabalho que foram utilizados caprinos SRD com diferentes padrões fenotípicos. Essa afirmação vai de encontro ao citado por Meyer et al. (2002), que utilizaram caprinos de ambos os sexos, de três a dezoito meses de idade SRD, concluindo que a variação na cinética da produção de anticorpos dos animais em relação a imunização, deve-se às diferenças entre eles dentro de cada grupo.

Neste trabalho, foi utilizado como antígeno o sobrenadante ou o secretado da cultura da *C. pseudotuberculosis*, linhagem 1002 que para Cerqueira (2006), contém estruturas antigênicas responsáveis pelo reconhecimento e ativação do componente humoral. Afirmação esta reforçada por Vale et al. (2016), que frisa que os antígenos secretados demonstram mais eficácia que os somáticos.

Paule et al. (2003), utilizando soros de caprinos naturalmente infectados e analisados através da técnica de *Western blotting*, detectaram uma proteína de 31,5KDa, a qual é reconhecida por anticorpos do soro de animais infectados e imunizados. Autores como Santana-Jorge et al. (2016) abordaram que a proteína 31,5KDa é caracterizada como a exotoxina PLD e tem sido considerada o maior fator de virulência produzido por *C. pseudotuberculosis*. Vale et al. (2003) ressalta que essa proteína é fracamente reconhecida com 30 dias após a imunização, e o seu reconhecimento vai se tornando mais intenso com o tempo. Provavelmente, esse seria um dos fatores da resposta baixa inicial na produção de anticorpos que obtivemos em alguns grupos estudados.

Embora a imunidade humoral tenha grande importância na proteção dos caprinos (FONTAINE, 2006) a natureza intracelular facultativa da bactéria exige uma resposta imune celular no mecanismo imunológico da defesa.

Para Meyer et al. (2002), um fator que deve ser levado em consideração em relação a resposta vacinal, é o catabolismo protéico natural de anticorpos está relacionado com o declínio dos níveis de anticorpos, o qual reinicia com outras estimulações. No entanto, em função da variação dos grupos na resposta ao antígeno BHI, considerando-se aqueles que, em seu grupo, por diversos motivos, não foram capazes de produzir uma resposta duradoura, recomenda-se uma revacinação anual dos animais para adequada proteção do rebanho. Uma vez que a LC é uma doença crônica, Santos et al. (2016), o sucesso da utilização da vacina não pode ser avaliado somente durante um ano, mas em extensos períodos de tempos de utilização.

Vale et al. (2003) ressaltam que os anticorpos produzidos contra *C. pseudotuberculosis* pelos animais imunizados mudaram o padrão de reconhecimento antigênico, ao longo de doze meses de imunização, com a vacina viva 1002 liofilizada, sugerindo a necessidade de acompanhamento para avaliação da resposta do animal, ao antígeno, após doze meses.

Pode-se ressaltar que os experimentos realizados com a cepa 1002 e com seus antígenos secretados para confecção de vacinas, na forma líquida ou liofilizada, já demonstraram em estudos anteriores, como o de Meyer et al. (2002) certo grau de proteção em caprinos.

## 7 CONCLUSÕES

A vacina atenuada liofilizada, com a cepa 1002, induziu a produção de anticorpos nos animais imunizados.

Na resposta imune humoral, foram observadas oscilações na produção de anticorpos ao longo do tempo de imunização dos grupos.

Sugere-se que a dose  $10^6$  UFC seja a mais indicada que a  $10^7$  UFC por não ter apresentado diferença estatística entre as doses testadas e tempo de revacinação entre os grupos, minimizando assim, a carga de imunógeno no animal para indução da resposta humoral no protocolo utilizado.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica**: funções e distúrbios do sistema imunológico, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 23-43, 2007.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Estratégias para o desenvolvimento de vacinas**. In: Imunologia Celular e Molecular. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 361-362, 2011.
- ADZA RINA M. N.; ZAMRI-SAAD M.; JESSE F. F. A.; SAHAREE A. A.; HARON A. W.; SHAHIRUDIN S. Clinical and pathological changes in goats inoculated *Corynebacterium pseudotuberculosis* by intradermal, intranasal and oral routes. **Journal of Veterinary Research**, v. 17, n. 2, p. 73-81, 2013.
- ALI, A.; SOARES, S. C.; BARBOSA, E.; SANTOS, A. R.; BARH, D.; BAKHTIAR, S. M.; HASSAN, S. S.; USSERY, D. W.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Microbial comparative genomics: an overview of tools and insights into the genus *Corynebacterium*. **Journal of Bacteriology and Parasitology**, v. 4, p. 1-16, 2013.
- ALMEIDA, S.; TIWARI, S.; MARIANO, D.; SOUZA, F.; JAMAL, S. B.; COIMBRA, N.; CASTRO SOARES, S. The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.
- ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. J. Uso de uma vacina toxoide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica**, v. 20, n. 2, p. 74-77, 1998.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: recomendações e medidas profiláticas. **Agropecuária Catarinense**, v. 13, n. 1, p. 12-14, 2000.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; COX, M.; ANDRIOLI, A.; NETO, H. M. A.; SILVA, A. M. C. Epididimite - Orquite causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 26, n. 1, 2004.
- ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite Caseosa: o estado da arte. Sobral: **EMBRAPA Caprinos e ovinos**, Documentos, 2007.
- ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, RAYMUNDO, R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Embrapa Caprinos**. Documentos, 2007.
- ALVES, J. T. C.; VERAS, A. A. O.; CAVALCANTE, A. L. Q.; DE SÁ, P. H. C. G.; DIAS, L. M.; GUIMARÃES, L. C.; MORAIS, E.; SILVA, A. G. M, AZEVEDO, V. R, R. T. J.; SILVA, A.; CARNEIRO, A. R. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain PA01, isolated from sheep in Pará, Brazil. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1, e01664-15, 2016.

ANDRADE, J. S. L.; AZEVEDO, S. S.; TELES, J. A. A.; HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, E. O. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 116-120, 2012.

AYELE, W. Y.; NEIL, S. D.; ZINSSTAG, J.; WEISS, M. G.; PAVLIK, I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, n. 8, p. 924-937, 2004.

BABIUK, L. A.; BABIUK, S. L.; LOEHR, B. I.; VAN DRUNNEN LITTEL-VAN DEN HUR. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, n. 1-2, p. 1-23, 2000.

BASTOS, B. L.; PORTELA, R. W. D.; DORELLA, F. A.; RIBEIRO, D.; SEYFFERT, N.; CASTRO, T. L. P.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S. O.; MEYER, AZEVEDO, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunologia Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Journal of Clinical and Cellular Immunology**, 2012, S4:005.

BASTOS, B.; LOUREIRO, D.; RAYNAL, J. T.; GUEDES, M. T.; COSTA VALE, V. L.; MOURA-COSTA, L. F.; GUIMARÃES, J. E.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R. W.; MEYER, R. Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression of caseous lymphadenitis in sheep. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 254, 2013.

BEZERRA, A. C.; PANDORFI, H.; GAMA, R. M.; CARVALHO, F. F. R.; GUISELIN, C. Desenvolvimento de um modelo de rastreabilidade para caprinos e ovinos de corte. **Revista Engenharia Agrícola**, v. 37, n. 5, 2017.

CAMARGO, E. V.; BARBOZA, C. S.; KREWER, C.; VARGAS, A. P. C.; CECIM, M.; LEAL, M. L. R. Isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no sêmen de um carneiro na região central do Rio Grande do Sul. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 1, p. 139-142, 2010.

CARDOSO, E. M. Imunoglobulinas. In: AROSA, F.; CARDOSO, E. M, PACHECO, F. C. 2. ed. **Fundamentos de Imunologia**. Lisboa: Lidel, p.195-218, 2012.

CARMINATI, R. **Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos**, 2005, 82 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; MOURA COSTA, L. F.; PAULE, B. J. A.; VALE, V. L.; REGIS, L.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SHAER, R.; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 2, n. 1, p. 88-93, 2003.

CARVALHO, D. M.; CASTRO, T. L. P.; SANTOS, C. S.; CARVALHO, R. D.; BASTOS, B.; BAGANO, P.; MEYER, R.; AZEVEDO, V.; PACHECO, L. G. C. Expressão diferencial de reguladores transcricionais da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, durante contato com fatores do hospedeiro. **Diálogos & Ciência**, n. 33, p. 35-38, 2013.

CERQUEIRA, R. B. **Avaliação da resposta humoral de caprinos infectados com duas linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através de diferentes testes elisa indiretos**, 2006, 85 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia.

CETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE, B. T.; VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n.1, p.75-83, 2002.

COSTA, M. P.; MCCULLOCH, J. A.; ALMEIDA, S. S.; DORELLA, F. A.; FONSECA, C.; T., OLIVEIRA, D. M.; PORTELA, R. W. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 1, 2011.

CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALEIRÓN, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small Ruminant Research**, v. 65, n. 1-2, p. 170-175, 2006.

DOMINGUES, P. F. Linfadenite Caseosa. **Associação Paulista de Criadores de Ovinos**. Disponível em: <http://www.aspaco.org.br/racas.php?id=418>. Acesso em: 25 Mar 2017.

DORELLA, F. A.; GALA-GARCIA, A.; PINTO, A. C.; SARROUH, B.; ANTUNES, C. A.; RIBEIRO, D.; EL-AOUAR, R. A. Progression of 'OMICS' methodologies for understanding the pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the Brazilian experience. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 6, n. 7, p. 1-7, 2013.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. A. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.

DORNELES, E. M.; SANTANA, J. A.; RIBEIRO, D.; DORELLA, F. A.; GUIMARÃES A. S.; MOAWED, M.S.; SELIN, S. A.; GARALDI, A. L.; MIYOSHI, A.; RIBEIRO, M. G.; GOUVEIA, A. M.; AZEVEDO, V. HEINEMAMM, M. B.; LAGE, A. P. Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates. **PLoS One**, v. 9, n. 6, 2014.

DROPPA-ALMEIDA, D.; VIVAS, W. L.; SILVA, K. K. O.; REZENDE, A. F.; SIMIONATTO, S.; MEYER, R.; PADILHA, F. F. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, n. 8, p. 1091-1096, 2016.

DUNO, A. D.; ZÁRRAGA, J.; CHIRINO-ZÁRRAGA, C. I.; PORTILLO, L. L. C. Caracterização epidemiológica da linfadenite caseosa em caprinos rebanhos na Península Paraguana, Venezuela. **Revista Medicina Veterinária**, n. 31, 2016.

FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite Caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle, **Documentos on line 113**, Embrapa Caprinos e Ovinos, 2014, 71p.

FONTAINE, MICHAEL C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, n. 33, p. 5986-5996, 2006.

S. M. FORTUNE, A. SOLACHE, A. JAEGER, P. J. HILL, J.T. BELISLE, B.R. BLOOM, E. J. RUBIN, J. D. Ernst *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. **The Journal Immunology**, v. 172, n. 10, p. 6272-6280, 2004.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, Production live animals. 2015. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/Q>>. Acesso em: 11 Jun 2017.

Fundação Instituto, Brasileiro de Geografia e Estatística. Tabela 3939 - **Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho em 31.12, segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação**. 2015. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 23 Dez 2017.

GARBE, J; COLLIN, M. Bacterial hydrolysis of host glycoproteins—powerful protein modification and efficient nutrient acquisition. **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 2, p. 121-131, 2012.

GORNIK, O.; PAVIĆ, T.; LAUC, G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins-implications on evolution and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1318-1326, 2012.

GOUVEIA, A. M. G.; SILVA, M. X.; GOUVEIA, G. C.; BRANDÃO, H. M.; MENDONÇA, L. C.; SÁ GUIMARAES, A. Aspectos zoonosológicos da ovinocultura no Sudeste do Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 277-284, 2015.

GUEDES, M. T.; SOUZA, B. C.; SOUSA, T. J.; LOUREIRO, D.; MOURA-COSTA, L. F.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 701-708, 2015.

GUIMARÃES, A.; CARMO, F. P.; HEINEMANN, M. B.; PORTELA, R. W. D.; MEYER, R.; LAGE, A. P.; SEYFFERT, N.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 1, p. 1, 2011.

HASSAN, N. A.; AL-HUMIANY, A. A.; BAHOBAIL, A. S.; MANSOUR, A. M. A. Bacteriological and pathological studies on caseous lymphadenitis in sheep in Saudi Arabia. **International Journal of Microbiological Research**, v. 2, p. 28-37, 2011.

HODGSON, A. L. M.; KRYWULT, J.; CORNER, L. A.; ROTHEL, J. S.; RADFORD, A. J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infection and immunity**, v. 60, n. 7, p. 2900-2905, 1992.

HOELZLE, L.E.; SCHERRER, T.; MUNTWYLER, J.; WITTENBRINK, M. M.; PHILIPP, W.; HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p. 359- 365, 2013.

JEBER, Z. K. H.; MOHDJIN, Z.; JESSE, F. F.; SAHAREE, A. A.; SABRI, J.; YUSOFF, R.; WAHID, H. Influence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on level of acute phase proteins in goats. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 48, 2016.

KABA, J.; KUTSCHKE, L.; GERLACH, G. F. Development of an elisa for the diagnosis of corynebacterium pseudotuberculosis infections in goats. **Veterinary Microbiology**, n. 78, p. 155-163, 2001.

WERNERY, U; KINNE, J. Caseous Lymphadenitis (Pseudotuberculosis) in Camelids: A Review. **Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v. 3, n. 1, p. 1022, 2016.

LACASTA, D.; FERRER, L. M.; RAMOS, J. J.; GONZÁLES, J. M.; ORTÍN, A.; FTHENAKIS, G. C. Vaccination schedules in small ruminant farms. **Veterinary microbiology**, v. 181, n. 1, p. 34-46, 2015.

LISTOS, P.; GRYZINSKA, M.; MARTYCHIEWICZ, M.; POINTING, S.; BARTON, A.; DYLEWSKA, M. Caseous Lymphadenitis in Sheep in the Falkland Islands. **Acta Veterinária**, v. 66, n. 3, p. 406- 412, 2016.

MAHMOOD, Z. K. H.; JESSE, F. F.; SAHAREE, A. A.; JASNI, S.; YUSOFF, R.; WAHID, H. Assessment of blood changes post-challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (phospholipase D): A comprehensive study in goat. **Veterinary World**, v. 8, n. 9, p. 1105, 2015.

MAHMOOD, Z. K.; JIN, Z. A. M.; JESSE, F. F.; SAHAREE, SABRI, J.; YUSOFF, R.; HARON, A. W. Relationship between the *Corynebacterium pseudotuberculosis*, phospholipase D inoculation and the fertility characteristics of crossbred Boer bucks. **Livestock Science**, v. 191, p. 12-21, 2016.

MELO, P. R.; CARVALHO, C. E. G.; ANDRADE, G. B.; SOARES, C. O.; ROSINHA, G. M. S. Caracterização de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* isoladas de ovinos e caprinos. **Revista de Educação continuada em Medicina Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 72-74, 2014.

MEYER R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA R. B.; VALE V.; VIEGAS S.; MARTINEZ T.; NASCIMENTO I.; SCHAEER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO M.; RÉGIS L.; PAULE B.; FREIRE S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Ciências Médica Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.

MEYER, R. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* e seu hospedeiro caprino: Aspectos da Prevalência, do Diagnóstico e da Vacinação**, 2003, 83 f. Tese- (Doutorado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MEYER, R.; REGIS, L. F.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAEER, R.; NASCIMENTO, I.; FREITE, S. M. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells, after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 15, n. 34, p. 249-254, 2005.

MIRA, C.; FATIMA, B. K.; FADHELA, S.; KADA, K.; YACINE, T. Epidemiological and Histopathological Studies on Caseous Lymphadenitis in Slaughtered Goats in Algeria. **Global Veterinária**, n. 16, v. 3, p. 1065- 1068, 2014.

MOTTA, R. G.; CREMASCO, A. C. M.; RIBEIRO, M. G. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 200-213, 2010.

MOURA-COSTA, L. F.; PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SHAER, R.; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C.; MATOS, D. P.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; MEYER, R. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2002.

MOURA-COSTA, L. F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the ethiological agent of the caseous lymphadenitis in goats. **Revista Ciências Médicas Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 105-115, 2002.

MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; VALE, V. L. C.; PAULE, B. J. A.; PORTELA, R. W.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 126, n. 1, p. 131-141, 2008.

MOUSSA, I. M.; ALI, M. S.; HESSAIN, A. M.; KABLI, S. A.; HEMEG, H. A.; SELIM, S. A. Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 6, p. 718-723, 2016.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28- 40, 2004.

MURO, L. F. F.; FERREIRA, F. L.; LANZI, G, P. A.; PEREIRA, R, E. P. Relação antígeno-anticorpo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.12, Periódicos Semestral, 2009.

NASSAR, A. F. C.; DANIEL, G. T.; RUIZ, R.; MIYASHIRO, S.; SCANNAPIECO, E. M.; NETO, J. S.; GREGORY, L. Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through microbiological culture and PCR in sheep samples. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1- 6, 2015.

OLIVEIRA XAVIER, A. R. E.; MOURA, FREITAS, A. A.; CARVALHO AZEVEDO, V. A.; BRANDI, I. V Genes 16S RNA ribossomal e pld como marcadores moleculares para identificação genotípica de amostras clínicas de *Corynebacterium* spp. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 23-29, 2016.

OLIVEIRA, D. M. Sequenciamento do Genoma do *Corynebacterium pseudotuberculosis* e as Implicações no Diagnóstico e Controle da Linfadenite Caseosa. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 5, n. 1, p. 18-27, 2013.

OLIVEIRA, S. J. **Guia bacteriológico prático**: microbiologia veterinária. 3 ed. Canoas: ULBRA, 2012. 260p.

OREIBY, A. F. Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. **Small Ruminant Research**, v. 123, p. 160–166, 2015.

OSHOPI, G. L.; ELANKUMARAN, R. A.; HECKERT, R. A. DNA vaccination in the avian. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 89, P. 1-12, 2002.

OTHMAN, A. M. I.; ABBA, Y.; JESSE, F. F. A.; IYYAASU, Y. M.; SAHAREE, A. A.; HARON, A. W.; LILA, M. A. M. Reproductive pathological changes associated with experimental subchronic *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in nonpregnant boer does. **Journal of Pathogens**, v. 2016, 2016.

OTHMAN, A. M.; JESSE, F. F. A.; ADAMU, L.; ABBA, Y.; ADZARINA, M. N.; SAHAREE, A. A.; WAHID, A. H.; ZAMRI-SAAD, M. Changes in serum progesterone and estrogen concentrations in non-pregnant boer does following experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of Veterinary Advances**, v. 4, n. 5, p. 524-528, 2014.

PACHECO, L. G. C.; SLADE, S. E.; SEYFFERT, N.; SANTOS, A. R.; CASTRO, T. L. P.; SILVA, W. M.; SANTOS, A. V.; SANTOS, S. G.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; PIMENTA, A. M. C.; MEYER, R.; SILVA, A.; SCRIVENS, J. H.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; DOWSON, C. G.; AZEVEDO, V. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 12, 2011.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C.; MEYER, R. Análise por SDS-PAGE e Western blot de antígenos somáticos e extracelulares de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 3, n. 1, 2004a.

PAULE, B. J. A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L. F.; CERQUEIRA, R. B.; CARMINATI, R.; REGIS, L. F.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Protein Expression and Purification**, v. 34, n. 2, p. 311-316, 2004b.

PAULE, B. J. A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; REGIS, L. F.; AZEVEDO, V.; NASCIMENTO, R.; SHAER, R.; GOES, A. M.; VALE, V. L. C. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of igg and interferon- $\gamma$  production, igg avidity and antigen recognition by western blotting. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 96, p. 129-139, 2003.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; SARKAR, D.; WALTER, M. R.; SHI, Y.; FISHER, P. B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 929-979, 2004.

PINHEIRO, R. R.; ELOY, A. M. X.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A.; SANTIAGO, L. B. Thoracic aortic aneurysm in a buck associated with caseous lymphadenitis. **Arquivo Brasileiro de medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 694- 698, 2013.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000.

PINTO, A. C.; GOMES DE SÁ, P. R. C.; RAMOS, R. T. J.; BARBOSA, S.; BARBOSA, H. P. M.; RIBEIRO, A. C.; SILVA, W. M.; ROCHA, F. S.; SANTANA, CASTRO, T. L. P.; MIYOSHI, A.; SCHENEIDER, M. P. C.; AZEVEDO, V. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 14, 2014.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 874-887, 2000.

RADUSKY, L. G.; HASSAN, S. S.; LANZOROTTI, E.; TIWARI, S.; JAMAL, S. B.; ALI, A.; FERREIRA, R. S.; BARH, D.; SILVA, A.; TURJANSKI, A. G.; AZEVEDO, V. A. C. An integrated structural proteomics approach along the druggable genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* species for putative druggable targets. **BMC Genomics**, v. 16, n. 5, p. S9, 2015.

REBOUÇAS, M. F.; PORTELA, R. W.; LIMA, D. D.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; VALE, V. L.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: Potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Salvador, v. 23, p. 213- 220, 2011.

REBOUÇAS, M. F.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; HANNA, S. A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Desenvolvimento de ELISA indireto para detectar anticorpos específicos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos utilizando o supernadante de cultura da cepa T1 como antígeno. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1296-1302, 2013.

RESENDE, B. C.; REBELATO, A. B.; D'AFONSECA, V.; SANTOS, A. R.; STUTZMAN, T.; AZEVEDO, V. A.; SANTOS, L. L.; MIYOSHI, A.; LOPES, D. O. DNA repair in *Corynebacterium* model. **Gene**, v.482, n.1-2, p.1-7, 2011.

REZENDE, A. F. S. Desenvolvimento de vacinas recombinantes e de teste de diagnósticos para controle da linfadenite caseosa, 2013, 94 f. Mestrado- (Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

RIBEIRO, D.; ROCHA, F. S.; LEITE, K. M. C.; SOARES, S. C.; SILVA, A.; PORTELA, R. W. D.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S. C.; AZEVEDO, V.; DORELLA, F. A. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium*

*pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 28, 2014.

RIBEIRO, M. G.; BELOTTA, A. F.; FERNANDES, M. C.; GUENA, R.; JÚNIOR, G. N.; LARA, G. H. B.; GIUFFRIDA, R.; ZAMPROGNA, T. O. Citologia aspirativa no diagnóstico da linfadenite em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 839- 843, 2011.

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

RIZZO, H.; CARVALHO, J. S.; JÚNIOR, N. S. S.; JESUS, T. K. S.; JÚNIOR, C. M. M. T.; REIS, D. D.; SILVA, T. R. Avaliação clínica de linfonodos superficiais de pequenos ruminantes criados no estado de Sergipe, Brasil. **Medicina Veterinária**, v. 11, n. 1, p. 18-28, 2017.

RODRIGUES, B. R; CRUZ COELHO, M. C. S; COELHO, M. I. S. Aspectos sanitários e de manejo em criações de caprinos leiteiros produzidos na comunidade de Caroa, Distrito de Rajada, Petrolina-PE. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 6, n. 2, 2016.

ROSLINDAWANI, M. N.; SYAFIQA, A. S.; JESSE, F. F. A.; EFFENDY, A. W.; ZAMRI-SAAD, M. Recombinant Caseous Lymphadenitis Vaccine with Palm Oil as Adjuvant Enhances the Humoral and Cell-Mediated Immune Responses in Rat Model. **Journal of Animal Health and Production**, v. 4, n. 1, p. 22-25, 2016

RUIZ, J. C.; D'AFONSECA, V.; SILVA, A.; ALI, A.; PINTO, A. C.; SANTOS, A. R.; ROCHA, A. A.; LOPES, D. O.; DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **PLoS One**, v. 18, n. 6, p. 4, 2011.

SANCHES, S. C. **Desenvolvimento e avaliação de uma Vacina de DNA contra *Corynebacterium pseudotuberculosis***, 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

SANTANA-JORGE, K. T. O.; SANTOS, T. M.; TARTAGLIA, N. R.; AGUIAR, E. L.; SOUZA, R. F. S.; MARIUTTI, R. J. E.; ARNI, R. K.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; AZEVEDO, V. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 83, 2016.

SANTAROSA, B. P.; DANTAS, G. N.; AMORIM, R. L.; CHIACCHIO, S. B.; OLIVEIRA, F.; AMORIM, R. M.; GONÇALVES, R. C. Meningoencefalite supurativa por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cabra com linfadenite caseosa: Relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, p. 537-542, 2014.

SANTIAGO, L B.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; SANTOS, V. W. S.; RODRIGUES, A. S.; LIMA, A. M. C.; OLIVEIRA, E. L.; ALBUQUERQUE, F. H. M. A. R. In vivo evaluation of antiseptics and disinfectants on control of Caseous

Lymphadenitis: clinical, haematological, serological and microbiological monitoring. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 273-280, 2013.

SANTOS, E. M. S.; SANTOS, H. O.; CANGUSSU, A. R.; COSTA, K. S.; DIAS, I. S. "Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with promising potential for caseous lymphadenitis vaccine development: a literature review." **Caderno de Ciências Agrárias**, n. 8. v. 2, p. 90-99, 2016.

SANTOS, G. R. A.; MENDONÇA, R. C.; SILVA, M. A.; QUEIROZ, L. O. Caracterização da caprinocultura na bacia leiteira sergipana. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, 2014.

SANTOS, T. C. P.; PEÑALFARO, C. E.; FIGUEIREDO, S. M. Aspectos sanitários e de manejo em criações de caprinos e ovinos na microrregião de Patos, região Semiárida da Paraíba. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 206 - 212, 2011.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, n. 1, p. 50-55 2010.

SHADNEZHAD, A.; NAEGELI, A.; COLLIN, M. CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo-b-Nacetylglucosamidase. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 261, 2016.

SILVA, J. W.; DROPPA-ALMEIDA, D.; VASCO AZEVEDO, S. B.; PORTELA, R. W.; MIYOSHI, A.; ROCHA, F. S.; DORELLA, F. A.; VIVAS, W. L.; PADILHA, F. F.; HERNÁNDEZ-MACEDO, M. L.; LIMA-VERDE, I. B. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 965, 2014.

SILVA, W. M.; DORELLA, F. A.; SOARES, S. C.; SOUZA, G. H.; CASTRO, T. L.; SEYFFERT, N.; FIGUEIREDO, H.; MIYOSHI, A.; LOIR, Y. L.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 55, 2017.

SILVA, I. C. S.; BRITO, D. R. B.; SOARES, E. D.; BRITO, A. V. M.; COELHO, A. P.; PINHEIRO, A. A. Caracterização zootécnica e econômica dos criadores de caprinos em área de assentamento rural no estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.

SJÖGREN, J; COLLIN, M. Bacterial glycosidases in pathogenesis and glycoengineering. **Future microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1039-1051, 2014.

SOUZA, F.M.; CARVALHO, A. Q.; JÚNIOR, F. G.; RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 3, p. 224-230, 2011.

SOARES, S. C.; SILVA, A.; TROST, E.; BLOM, J.; RAMOS, R.; CARNEIRO, A.; ALI, A.; SANTOS, A. R.; PINTO, A. C.; DINIZ, C.; BARBOSA, E. G. V.; DORELLA, F. A.;

ABURJAILE, F.; ROCHA, F. S.; NASCIMENTO, K. K. F.; GUIMARÃES, L. C.; ALMEIDA, S.; HASSAN, S. S.; BAKHTIAR, S. M.; PEREIRA, U. P.; ABREU, V. A. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar ovis and equi strains. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 53- 81, 2013.

SOLANET, J. J.; MALENA, R.; ESTEIN, S. M.; BELCHIOR, S. E.; PAOLICCHI. Desarrollo de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en carneros vacunados o infectados con *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 43, n. 1, p. 9-17, 2011.

SÓSTENES J.; ANDRADE, L.; AZEVEDO, S. S.; TELES, J. A. A.; HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, E.O. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p.116-120, 2012.

SOUZA, A. P.; VALE, V. L. C.; DA COSTA SILVA, M.; DE OLIVEIRA ARAÚJO, I. B.; TRINDADE, S. C.; DE MOURA-COSTA, L. F.; DE OLIVEIRA-NETO, M. G. MAPK involvement in cytokine production in response to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 230, 2014.

SOUZA, M. F.; CARVALHO A. Q.; GARINO JÚNIOR, F.; RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 224-230, 2011.

SPIER S. J.; LEUTENEGGER C. M.; CARROLL S. P.; LOYE, J. E, PUSTERLA J. B.; CARPENTER, T. E, MIHALYI, J.E.; MADIGAN, J. E Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 829-834, 2004.

STING, R.; WAGNER, B.; SARI-TURAN, A.; STERMANN, M.; REULE, M.; EICHNER, M.; AND BEYER, W. Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats in Baden-Wuerttemberg (Germany) and seroreactions on antigens used for newly developed enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). **Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 125, p. 67-75, 2012.

TATTINI, V.; PARRA, F. B.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M.; Effect of lyophilization on the structure and phase changes of PEGylated-bovine serum albumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, p. 124-134, 2005.

TZARD, I. R. **Imunologia veterinária**: uma introdução. São Paulo: Roca, São Paulo, 2002. 548 p.

TZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 7<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 4, 2014.

VALDIVIA, J. REAL, F.; ACOSTA, F.; ACOSTA, B.; DÉNIZ, S.; RAMOS-VIVAS, S.; J.; ELAAMRI, F.; PADILHA, D. Interaction of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with ovine cells *in vitro*. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 2, p. 318-323, 2015.

VALE, V. L. C. **Avaliação de aspectos da resposta imune de camundongos contra *C. pseudotuberculosis***, 2005. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

VALE, V. I. C.; SILVA, M. C.; SOUZA, A. P.; TRINDADE, S. C.; MOURA-COSTA, L. F.; SANTOS- LIMA, E. K. N.; NASCIMENTO, I. L. O.; CARDOSO, H. S. P.; MARQUES, E. J.; POULE, B. J. A.; NASCIMENTO, R. J. M. Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune response against a *C. pseudotuberculosis* strain. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 195, 2016.

VALE, V. L.; FREIRE, S. M.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, R.; MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2. n. 2 192- 200, 2003.

VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.122-124, 2010.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 17, n. 2, p. 359-71, 2001.

WINDSOR, P. A. Control of caseous lymphadenitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal**, v. 27, p. 193-202, 2011.

WINDSOR, P. A.; BUSH, R. D Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? **Small Ruminat Research**, v. 142, p. 6-10, 2016.

ZERBINATI, J.; GREVE, C. I.; LEAL, R. F.; AMORIN, L. M. P. V.; SILVA, D. L.; VIEGAS, S. R. A. A.; PEIXOTO, A. P. C.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B. Produção e padronização de um antígeno para um teste ELISA indireto no diagnóstico da linfadenite caseosa em soros caprinos. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 5, n. 3, p. 285- 293, 2007.

## ARTIGO 1

Artigo a ser enviado para a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, cujas orientações encontram-se disponíveis em:

<http://www.scielo.br/revistas/abmvz/pinstruc.htm>.

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAPRINOS INOCULADOS  
COM VACINA ATENUADA LIOFILIZADA CONTRA *Corynebacterium  
pseudotuberculosis***

[EVALUATION OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN INOCULATED GOATS WITH ATTENUED VACCINE LYOPHILIZED AGAINST  
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS]

S. C. Silva, A. K. S. Cavalcante, R. B. Cerqueira, A. C. O. Lima

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

**RESUMO**

Avaliou-se a indução de anticorpos utilizando a vacina atenuada liofilizada linhagem 1002, de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por meio do teste ELISA indireto com antígeno BHI. Cem caprinos de dois a três anos de idade foram divididos em 5 grupos (G1 a G5) de 20 animais cada. Os grupos 1 e 2 receberam a dose de  $10^7$  UFC no dia zero e com 21 dias o G2 recebeu reforço. Os grupos 3 e 4 receberam a dose de  $10^6$  UFC no dia zero e com 21 dias o G4 recebeu reforço. O grupo 5 foi considerado o controle. Os animais foram acompanhados sorologicamente e clinicamente ao longo do experimento. Os soros coletados dos caprinos foram analisados pela técnica do ELISA Indireto. Apesar dos valores de D.O. terem variado no decorrer do experimento, não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre as diferentes doses testadas e tempo de revacinação entre os grupos, no entanto, a vacina se mostrou eficaz na indução títulos de anticorpos detectáveis no estudo. Sugere-se que a dose  $10^6$  UFC é a mais indicada por não ter apresentado diferença estatística entre as doses testadas no experimento, minimizando a carga de imunógeno para indução da resposta humoral no protocolo utilizado.

Palavras-chave: Cabras, Elisa indireto, vacinação

**ABSTRACT**

The induction of antibodies using the freeze-dried attenuated strain 1002 strain of *C. pseudotuberculosis* was evaluated by indirect ELISA with BHI antigen. One hundred goats from two to three years old were divided into 5 groups (G1 to G5) of 20 animals each. Groups 1 and 2 received a dose of  $10^7$  CFU on day zero and at 21 days G2 received booster. Groups 3

and 4 received the dose of  $10^6$  CFU on day zero and at 21 days G4 received booster. Group 5 was considered the control. The animals were monitored serologically and clinically for 364 days. The samples collected from the goats were analyzed by the indirect ELISA technique. Although the O.D. values varied during the experiment, there was no statistical difference ( $p>0,05$ ) between the different doses tested and the time of revaccination between the groups. It is suggested that the dose  $10^6$  CFU is the most indicated because it didn't present statistical difference between the doses tested in the experiment, minimizing the immunogen load to induce the humoral response in the protocol used. Since the vaccine was shown to be effective in inducing antibody titers detectable in the study.

Keywords: ELISA indirect; goats, vaccination

## INTRODUÇÃO

No Brasil, o estado da Bahia ocupa o primeiro lugar em relação à pecuária de caprinos e ovinos e assim como em outros estados da região Nordeste, a criação de pequenos ruminantes estão concentradas na sua maior parte nas regiões de clima semi-áridos (IBGE, 2015). No entanto, as doenças que acometem esses animais trazem sérios problemas para o produtor em decorrência do seu importante papel Sócio econômico. A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa crônica de ocorrência mundial, foi detectada como um problema endêmico no Brasil, com prevalência clínica estimada em aproximadamente 30%, destacando-se numa importante área de produção do país, região Nordeste (Seyffert et al., 2010), a qual se destaca como grande produtora de caprino e ovino de corte (Bezerra et al., 2017).

Essa enfermidade leva à redução do ganho de peso, da eficiência reprodutiva, como também da produção de lã e leite, além da condenação de carcaças e desvalorização do couro, fatores esses que comprometem diretamente a redução no desempenho dos animais e a queda na produção. A vacinação é uma das ferramentas mais eficazes e versáteis para o combate das doenças infecciosas em humanos e animais (OSHOP; ELANKUMARAN et al., 2002).

A imunoprofilaxia certificada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é a vacina líquida 1002® ( $2 \times 10^6$  UFC), manipulada a partir de uma cepa atenuada de *C. pseudotuberculosis* que pode conferir 83,3% de imunoproteção em caprinos e ovinos (Dorella et al., 2009). No entanto, as vacinas atualmente comercializadas têm um curto prazo de

validade o que limita sua produção e comercialização, como também, não oferecem a proteção necessária contra a infecção ou não foram ainda suficientemente testadas em campo. Objetivou-se avaliar com esse estudo a indução de anticorpos utilizando a vacina atenuada liofilizada linhagem 1002, de *C. pseudotuberculosis* por meio do teste ELISA indireto com antígeno BHI.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) e está registrado sob o número 23007016893/2013-73 pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Foram utilizadas amostras de soro de 100 cabras criadas em sistema extensivo, com 2-3 anos de idade, (SRD) sem raça definida, sem sinais clínicos de doenças e sorologicamente negativas para a LC, provenientes da propriedade localizada no Município de Rafael Jambeiro, estado da Bahia.

As vacinas foram fornecidas pela Empresa Labovet Produtos Veterinários<sup>1</sup>. Os animais foram alocados em cinco grupos (n-20): Grupo 1 (vacinados no dia zero e reforçados com 21 dias com  $10^7$  UFC); Grupo 2 (vacinados no dia zero com  $10^7$  UFC); Grupo 3 (vacinados no dia zero e reforçados com 21 dias com  $10^6$  UFC); Grupo 4 (vacinados no dia zero com  $10^6$  UFC); Grupo 5 (controle, aplicação de placebo).

Esses animais foram inoculados com a vacina atenuada liofilizada, na via subcutânea e acompanhados sorologicamente e clinicamente ao longo de 364 dias. O acompanhamento sorológico dos animais foi realizado através do teste ELISA indireto, descrito por Carminati (2003) no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, descrito resumidamente a seguir.

O protocolo da produção do antígeno BHI utilizado foi descrito por Carminati (2003), para tanto se utilizou o sobrenadante da cultura de *C. pseudotuberculosis* (cepa 1002) cedida do ICS (Instituto de Ciências da Saúde) da Universidade Federal da Bahia.

As placas de poliestireno de fundo chato (Costar®) foram sensibilizadas com 100µl do antígeno BHI, diluído em 1:100 de tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6 e incubadas em câmara úmida a 4°C por aproximadamente 18 horas. Após duas lavagens com PBS contendo 0,1% de tween-20 (PBS-T-20), as placas foram bloqueadas com 200µl/poço de

---

<sup>1</sup> Feira de Santana- BA

PBS-T20 contendo 5% de leite desnatado, durante duas horas. A seguir, foram incubadas com 50µl/poço dos soros testes diluídos em 1: 100 de PBS-T-20 contendo 0,5% de BSA (soro fetal bovino) durante 1 hora. Após cinco lavagens em PBS-T-20, adicionou-se às placas, 50µl de imunoglobulinas de coelho anti-imunoglobulina IgG de caprino, conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich®), diluída em 1:10.000 de PBS-T-20.

Logo após foram incubadas a 37°C por 45 minutos e, em seguida, lavadas cinco vezes em PBS-T-20 e incubadas com 50µl poço da solução reveladora (10mL de tampão cítrico-fosfato pH 5,1 + 4mg de ortofenilenodiamina + 4µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 15 minutos, á temperatura ambiente, protegendo-se da luz. A reação foi freada com adição de 25µl do ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N. A leitura da densidade óptica foi realizada em Leitor de ELISA, usando-se filtro de 490nm de comprimento de luz.

O ponto de corte utilizado no experimento foi de 0,248, baseado no teste ELISA BHI para caprinos padronizado por Zerbinati et al. (2007). A análise Estatística dos dados considerou Medidas Repetidas nos tempos, segundo um arranjo fatorial com a finalidade de melhor modelar o tempo (medidas repetidas). Foram utilizadas modelos Lineares Mistos, considerando o fator principal, as doses, como efeito fixo, e os diferentes tempos como efeito aleatório. O modelo considerado no desenho experimental é descrito a seguir:

$$V_{ijk} = \mu + \lambda_i + \tau_j + \lambda\tau_i(j) + \epsilon_{ijk}$$

Onde:

Os índices do modelo referem-se aos:

$\mu$ - constante geral;  $\lambda_i$  - representa o efeito associado ao *l-ésimo* tempo de repetição da medida;  $\tau_j$  - representa o efeito associado ao *j-ésimo* tempo; *i*-diluições das doses vacinais; *j*- tempos avaliados para as *k-repetições*.  $\lambda\tau_i(j)$  - representa o efeito aleatório do *i-ésima* diluição dentro do *j-ésimo* tempo para a *n-ésima* unidade experimental;  $\epsilon_{ijk}$  - representa o vetor de erros aleatórios associados ao modelo.

A comparação múltipla das médias foi implementada pelo método de TukeyHSD considerando um nível de significância: (p< 0,05).

## RESULTADOS

Os animais foram examinados clinicamente quanto à presença de reações no local da inoculação ao longo do experimento, todavia não foram observadas lesões em nenhum dos grupos estudados comprovando a inocuidade do produto.

Os resultados a seguir, demonstrados nas Figs. 1 e 2, expõem a média da cinética da produção de anticorpos nos Grupos (1; 2; 3; 4 e 5) durante o experimento, de acordo com os valores de densidade óptica (D.O.).

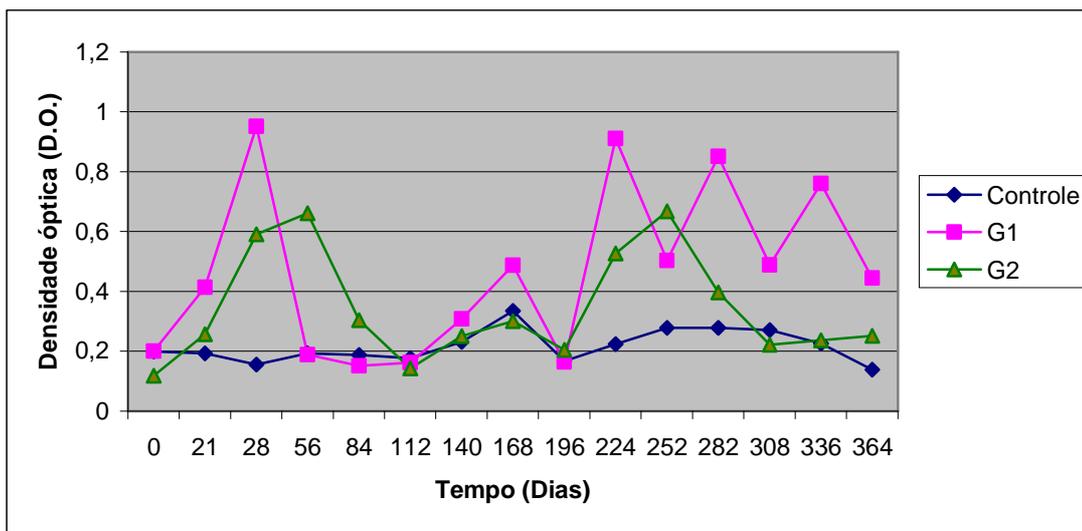


Figura 1. Representa a variação da resposta humoral pela média dos grupos ao longo do experimento. GC= grupo controle; G1= vacinados no dia zero com  $10^7$  UFC; G2= vacinados no dia zero e reforçados com 21 dias com  $10^7$  UFC respectivamente.

A Fig. 1 demonstra os caprinos vacinados e revacinados com a dose  $10^7$  UFC. O G1, vacinado no dia zero, iniciou uma resposta humoral a partir de 21 dias, tendo seu primeiro pico com 28 dias com valores de D.O. acima de 0,8 detectando-se um decréscimo nos títulos de anticorpos nos dias posteriores. Sendo que a partir de 196 dias foi observado um novo pico com D.O. acima de 0,8 e oscilando abaixo desse valor até último ponto de coleta. O G2, inoculado com  $10^7$  UFC da vacina liofilizada e revacinado com 21 dias iniciaram a resposta humoral com 28 dias com pico aos 56 dias e valores de D.O. acima de 0,6, apresentando um declínio nos títulos de anticorpos nos dias seguintes. Aproximadamente com 224 dias foi observado um aumento na produção de anticorpos, atingindo o pico a partir de 252 dias, com valores de D.O. acima de 0,6. Observando-se nos períodos subsequentes um decréscimo gradual nas concentrações de anticorpos até o último ponto de coleta.

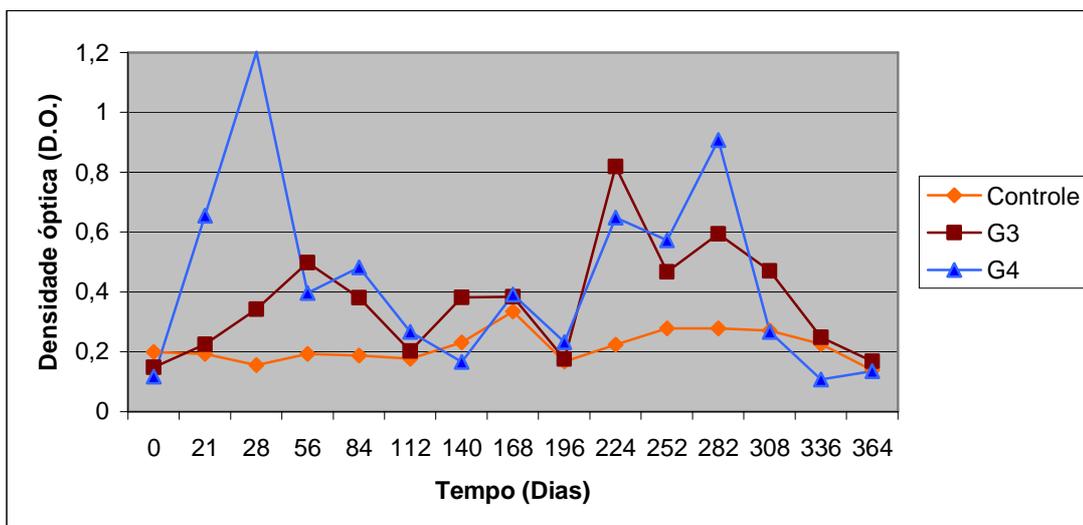


Figura 2. Representa a variação da resposta humoral pela média dos grupos ao longo do experimento. GC= grupo controle; G3= vacinados no dia zero com  $10^6$  UFC; G4= vacinados no dia zero e reforçados com 21 dias com  $10^6$  UFC respectivamente.

O grupo controle apresentado na Figura 1, comportou-se como esperado, demonstrando valores de D.O. baixo, quando comparados aos grupos imunizados, apresentados nas figuras (1 e 2). No entanto, observou-se uma pequena variação na produção de anticorpos, com aumento discreto a partir dos 140 dias. Porém, essa variação deve-se provavelmente ao contato destes animais não vacinados com animais que não receberam a vacina, além do fato da área utilizada para o estudo ser considerada endêmica para a LC.

A Fig. 2 representa os caprinos vacinados e revacinados com  $10^6$  UFC. Pode-se verificar no G3, vacinados no dia zero, valores de D.O. abaixo de 0,5 até 196 dias do experimento, onde foi verificado um elevação da produção de anticorpos, atingindo seu maior pico a partir de 224 dias com valores de D.O. acima de 0,8. Observando-se posteriormente uma redução notável da resposta humoral a partir de 336 dias até o último dia de coleta. O G4, vacinados e revacinados com 21 dias, iniciou a resposta com aproximadamente 21 dias atingindo o pico com valores expressivos de D.O. acima de 1 com 28 dias. No entanto, tiveram uma queda nos títulos de anticorpos nos dias posteriores, oscilando abaixo de 0,6 até 196 dias, período no qual foi registrado um aumento na produção de anticorpos com um novo pico acima de 0,8 com 224 dias e a partir de 308 dias foi identificado redução da resposta até o último dia do experimento.

Apesar dos valores de D.O. terem variado no decorrer do experimento, não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre as diferentes doses testadas e tempo de revacinação entre os grupos.

## DISCUSSÃO

Comparando-se os grupos experimentais ao grupo controle, apresentados na Fig. 1, é possível visualizar a estimulação antígeno-anticorpo detectável através dos valores de D.O, ou seja, o antígeno utilizado induziu uma resposta humoral que foi observada em vários momentos do experimento nos grupos vacinados. Estes resultados são semelhantes com os observados por Ribeiro et al. (1991), usando a mesma linhagem de *C. pseudotuberculosis* (1002) deste trabalho, só que em fase líquida, utilizando cinco doses vacinais diferentes e inoculadas em caprinos, observando-se um aumento dos níveis de anticorpos quando comparada ao grupo controle.

Meyer et al. (2002) realizaram um experimento com a cepa atenuada viva liofilizada (1002), utilizando diferentes esquemas de vacinação, reforços e doses ( $10^7$  a  $10^{11}$  UFC) para avaliação da resposta humoral em caprinos no período de quatorze meses e concluíram que o preparo liofilizado aparentemente promoveu a produção de anticorpos específicos em doses iguais ou maiores que  $10^9$  UFC. Resultados diferentes foram encontrados no presente estudo, sendo que doses menores foram capazes de induzir a resposta humoral detectável pelo teste ELISA.

Títulos de anticorpos baixos, utilizando a mesma cepa do presente experimento já foram encontrados na literatura, no entanto, Pacheco et al. (2011) sugerem que a resposta pouca intensa da linhagem é devido à atenuação da mesma, explicada pelo fato dessa cepa ser naturalmente de baixa virulência.

Entretanto, todos os grupos apresentaram produção de anticorpos com variações na intensidade da resposta, porém não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre as doses testadas e tempo de revacinação. Essa variação deve-se provavelmente as diferenças entre os animais dentro de cada grupo, visto que, no presente experimento foram utilizados caprinos SRD, fenotipicamente diferentes e criados em sistema extensivo (fundo de pasto), tendo em vista que fatores como estados nutricional e condições ambientais também podem interferir na resposta do imunógeno. Essa hipótese é reforçada por Hoelzle et al. (2013) que nos seus estudos, demonstraram que há diferenças na resposta imune de cada espécie a diferentes antígenos de *C. pseudotuberculosis*, na qual variam de acordo com os isolados de ovinos ou

caprinos. O mesmo ainda ressalta que a variação da resposta pode variar dentro da própria espécie, como também individualmente a uma mesma vacina.

Neste trabalho, foi utilizado como antígeno o sobrenadante da cultura da *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002, que para Vale et al. (2016), são mais eficazes que os somáticos. Paule et al. (2004) citaram que a proteína de 31,5KDa, conhecida como fosfolipase D, é reconhecida por soro caprino podendo estar presente tanto em antígenos somáticos como secretados. Vale et al. (2003) salientam que essa proteína é fracamente reconhecida com 30 dias após a imunização, e o seu reconhecimento vai se tornando mais intenso com o passar do tempo. Provavelmente, esse seria um dos fatores da resposta inicial baixa na produção de anticorpos que foram obtidos em alguns grupos estudados no presente experimento.

Para Meyer et al. (2002), um fator que deve ser levado em consideração em relação a resposta vacinal, é o catabolismo protéico natural de anticorpos está relacionado com o declínio dos títulos de anticorpos, o qual reinicia com outras estimulações. No entanto, em função da variação dos grupos na resposta ao antígeno BHI, considerando-se aqueles que, em seu grupo, por diversos motivos, não foram capazes de produzir uma resposta duradoura, recomenda-se revacinação anual dos animais para uma melhor proteção. Visto que, pelo fato da LC ser uma doença crônica, para Santos et al. (2016), o sucesso da utilização da vacina não pode ser avaliado somente durante um ano, mas em extensos períodos de tempos de utilização. Vale et al. (2003) reforçam que os anticorpos produzidos contra *C. pseudotuberculosis* pelos animais imunizados com a vacina viva 1002 liofilizada mudam o padrão de reconhecimento antigênico, ao longo de doze meses de imunização, sugerindo a necessidade de acompanhamento para avaliação da resposta do animal, ao antígeno, após doze meses.

## CONCLUSÕES

A vacina atenuada liofilizada, utilizando a cepa 1002 induziu a produção de anticorpos nos animais imunizados.

Na resposta imune humoral foi observado oscilações na produção de anticorpos ao longo do tempo de imunização nos grupos.

Sugere-se que a dose  $10^6$  UFC é mais indicada do que a  $10^7$  UFC, por não ter apresentado diferença estatística entre as doses e tempos de revacinação no experimento, minimizando a carga de imunógeno para indução da resposta humoral no protocolo utilizado.

## REFERÊNCIAS

- BEZERRA, A. C.; PANDORFI, H.; GAMA, R. M.; CARVALHO, F. F. R.; GUISELIN, C. Desenvolvimento de um modelo de rastreabilidade para caprinos e ovinos de corte. **Revista Engenharia Agrícola.**, v. 37, n. 5, 2017.
- CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; MOURA COSTA, L. F.; PAULE, B. J. A.; VALE, V. L.; REGIS, L.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SHAER, R.; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas.**, Salvador, v. 2, n. 1, p. 88-93, 2003.
- DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; SEYFFERT, N.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines.**, v. 8, n. 2, p. 205-213, 2009.
- DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. A. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research.**, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.
- HOELZLE, L.E.; SCHERRER, T.; MUNTWYLER, J.; WITTENBRINK, M. M.; PHILIPP, W.; HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology.**, v. 164, p. 359- 365, 2013.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tabela 3939 - **Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho em 31.12, segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação.** 2015. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acessado em: 15 de jul. 2017.
- MEYER R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA R. B.; VALE V.; VIEGAS S.; MARTINEZ T.; NASCIMENTO I.; SCHAEER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO M.; RÉGIS L.; PAULE B.; FREIRE S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Ciências Médica Biológicas.**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.

OSHOPI, G. L.; ELANKUMARAN, R. A.; HECKERT, R. A. DNA vaccination in the avian. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v. 89, p. 1-12, 2002.

PACHECO, L. G. C.; SLADE, S. E.; SEYFFERT, N.; SANTOS, A. R.; CASTRO, T. L. P.; SILVA, W. M.; SANTOS, A. V.; SANTOS, S. G.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; PIMENTA, A. M. C.; MEYER, R.; SILVA, A.; SCRIVENS, J. H.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; DOWSON, C. G.; AZEVEDO, V. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Microbiology.**, v. 11, n. 1, p. 12, 2011.

PAULE, B. J. A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L. F.; CERQUEIRA, R. B.; CARMINATI, R.; REGIS, L. F.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Protein expression and purification.**, v. 34, n. 2, p. 311-316, 2004.

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

SANTOS, E. M. S.; SANTOS, H. O.; CANGUSSU, A. R.; COSTA, K. S.; DIAS, I. S. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with promising potential for caseous lymphadenitis vaccine development: a literature review. **Caderno de Ciências Agrárias.**, v. 2, n. 8, p. 90-99, 2016.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science.**, v.88, n. 1, p. 50-55, 2010.

VALE, V. I. C.; SILVA, M. C.; SOUZA, A. P.; TRINDADE, S. C.; MOURA-COSTA, L. F.; SANTOS-LIMA, E. K. N.; NASCIMENTO, I. L. O.; CARDOSO, H. S. P.; MARQUES, E. J.; POULE, B. J. A.; NASCIMENTO, R. J. M. Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune response against a *C. pseudotuberculosis* strain. **BMC Veterinary Research.**, v. 12, n. 1, p. 195, 2016.

VALE, V. L.; FREIRE, S. M.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, R.; MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2. n. 2 192- 200, 2003.

ZERBINATI, J.; GREVE, C. I.; LEAL, R. F.; AMORIN, L. M. P. V.; SILVA, D. L.; VIEGAS, S. R. A. A.; PEIXOTO, A. P. C.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B. Produção e padronização de um antígeno para um teste ELISA indireto no diagnóstico da linfadenite caseosa em soros caprinos. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 5, n. 3, p. 285- 293, 2007.