



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

MÔNICA ELLEN DA COSTA SOARES

Padronização de ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico da Linfadenite Caseosa em caprinos

**Mossoró/RN
Junho de 2022**

MÔNICA ELLEN DA COSTA SOARES

Padronização de ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico da Linfadenite Caseosa em caprinos

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Francisco Silvestre Brilhante Bezerra, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2022

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas
da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S676p Soares, Mônica Ellen da Costa .
Padronização de ELISA indireto utilizando a
proteína rCP01850 de *Corynebacterium*
pseudotuberculosis para diagnóstico da Linfadenite
Caseosa em caprinos / Mônica Ellen da Costa
Soares. - 2022.
35 f. : il.

Orientador: Francisco Silvestre Brilhante
Bezerra.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2022.

1. Diagnóstico sorológico. 2. Fosfatase ácida
recombinante. 3. Pequenos ruminantes. I. Bezerra,
Francisco Silvestre Brilhante, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

MÔNICA ELLEN DA COSTA SOARES

Padronização de ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico da Linfadenite Caseosa em caprinos

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 10 / 06 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Francisco Silvestre Brilhante Bezerra, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente

Isadora Louise Alves da Costa Ribeiro Quintans, Profa. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Aline Lidianne Batista, Profa. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

*Este trabalho é dedicado à Maria Soares,
Maria Luísa, João Faustino, Francisco Soares
e Claudino Soares (In Memoriam).*

Também a Luiz “Celipe”, Marina, Egleyde e Paulo.

AGRADECIMENTOS

À força criadora, por ter me guiado até aqui.

A minha família, por ser a base de tudo, sempre me cuidar e incentivar em tudo o que faço, sem vocês eu não seria quem sou hoje.

A Graziane, por não ter me deixado desistir, parte da minha força vem de você, obrigada por sempre estar aqui por mim.

Ao professor Silvestre, por tudo o que me ensinou, sem seu incentivo eu não teria concluído este processo, se hoje este trabalho está finalizado é por que tive a honra de trabalhar com você. Sou infinitamente grata.

A Lenise, Thiago, Nicholas e Janpson, por terem tornado os infinitos dias de experimentos mais leves.

A Maria e Vivian, minhas companheiras de jornada, que mesmo à distância sempre se fizeram presentes, foi incrível apesar de todas as dificuldades, por que eu tive vocês.

A Barbara, Glenda e Juliana, por sempre me acolherem nos momentos difíceis.

Por último, a Pedro, por me estimular a ser melhor todos os dias, mesmo que seja só pra ser melhor que você.

Às pessoas que olham para as estrelas e
desejam...
Às estrelas que ouvem e aos sonhos que são
atendidos.”

Sarah J. Maas

RESUMO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença que atinge principalmente rebanhos de caprinos e ovinos. Em sua forma visceral o diagnóstico clínico é impossibilitado, tendo como alternativa o diagnóstico sorológico. O uso de proteínas recombinantes para diagnosticar a linfadenite caseosa vem crescendo nos últimos anos, e a proteína rCP01850 já apresentou resultados promissores no diagnóstico de LC em ovinos por ELISA indireto. Deste modo, considerando as diferenças entre as respostas imunológicas de caprinos e ovinos, o presente trabalho tem por objetivo realizar a padronização de um ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850 para caprinos. Para tanto, a proteína rCP01850 foi expressa de forma heteróloga em *Escherichia coli* utilizando o plasmídeo pAE/cp01850 previamente construído. A proteína foi purificada utilizando cromatografia de afinidade ao níquel e quantificada utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA). A identidade da proteína recombinante foi comprovada por *western blot* (WB) com anticorpo monoclonal anti-6x-his-tag. Para a padronização foi utilizado o método *checkerboard titration*, onde um pool de soros negativos e um pool de soros positivos foram utilizados. Um total de 70 soros caprinos, sendo 35 provenientes de animais com LC e 35 de animais negativos, oriundos de áreas negativas, foram utilizados para a avaliação do desempenho do teste padronizado. Como resultado da expressão da proteína recombinante testada, obtivemos um rendimento de 5,3 mg/L da proteína rCP01850 que apresentou aproximadamente 33,5 kDa no WB. O ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850 para caprinos apresentou sensibilidade de 94,3%, especificidade de 100%, e acurácia de 99,7%, quando o ponto de corte foi 0,10425. Conclui-se que a proteína rCP01850 pode ser utilizada com grande precisão para o diagnóstico de LC em caprinos.

Palavras-chave: Diagnóstico sorológico, fosfatase ácida recombinante, pequenos ruminantes.

ABSTRACT

Caseous lymphadenitis (CL) is a disease that mainly affects goat herds. Clinical diagnosis of LC visceral form it is not possible, with serological diagnosis being an alternative method. The use of recombinant proteins for the diagnosis of caseous adenopathy has been widespread in the recent years, and the protein rCP01850 has already shown promising results when used in an indirect ELISA for the diagnosis of CL in sheep. Therefore, considering the differences between the immune responses of goats and sheep, the present work aims to standardize of indirect Elisa method, using the protein rCP0850 for caprine. Therefore, the rCP01850 protein was expressed heterologously in *Escherichia coli* using the previously constructed plasmid pAE/cp01850. The protein was purified using nickel affinity chromatography and quantified using bicinchoninic acid (BCA). The identity of the recombinant protein was confirmed by western blot (WB) using anti-6x-his-tag monoclonal antibody. The method *checkerboard titration* was used for the standardization of XXX, where an antibody pool method and a used positive serum method were used. A total of 70 goat sera samples were used to evaluate the performance of standardized indirect ELISA, being 35 negative and 35 positive for CL. As a result of expression of the tested recombinant protein, we obtained a yield of 5.3 mg/L of the rCP01850 protein which showed approximately 33.5 kDa in WB. The indirect ELISA using an rCP01850 protein for goats showed a sensitivity of 94.3%, specificity of 100% and accuracy of 99.7%, when the cut-off point was 0.10425. We conclude that the rCP01850 protein can be used with great precision for the diagnosis of CL in goats.

Keywords: Serological diagnosis, recombinant acid phosphatase, small ruminants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Método <i>checkerboard titration</i> em placa de 96 poços. Nas colunas foram testadas as diferentes concentrações da proteína rCP01850, e nas linhas as diferentes concentrações de soro caprino. A concentração de anticorpo foi fixada em 1:10.000.....	33
Figura 2	–	Método <i>checkerboard titration</i> em placa de 96 poços. A concentração da proteína rCP01850 foi fixada em 2µg/mL, e foram testadas diferentes concentrações do soro caprino nas colunas, seguindo o padrão de branco, positivo e negativo para cada concentração, e nas linhas diferentes concentrações do anticorpo conjugado.....	33
Figura 3	–	SDS-PAGE 12% contendo as eluições da proteína rCP01850 após purificação. (1) Akta Wash 100%. (2) Akta Elution 10%. (3) Akta Elution 20%. (4) Akta Elution 30%. (5) Akta Elution 40%. (6) Akta Elution 50%. (7) Akta Elution 60%. (8) Akta Elution 100%. (9) Lixo da purificação da rCP01850. (10) Marcador marcador pré-corado PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher).	35
Figura 4	–	Western Blot da proteína rCP01850 de <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizando o anticorpo monoclonal Anti-His6-Peroxidase (Roche). A proteína recombinante apresentou peso molecular de 33,5 kDa. Poço 1: marcador pré-corado PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher). Poço 2: proteína rCP01850.....	35
Figura 5	–	Distribuição dos soros com relação ao ponto de corte.....	36
Figura 6	–	Curva ROC do ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
DO	Densidade Ótica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
LB	Luria Bertani
LC	Linfadenite Caseosa
PLD	Fosfolipase D
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Linfadenite Caseosa.....	15
2.1.1 O agente etiológico.....	16
2.1.2 Transmissão.....	16
2.1.3 Diagnóstico clínico e microbiológico.....	16
2.1.4 Diagnóstico sorológico.....	17
2.1.4.1 Uso da proteína recombinante rCP01850.....	18
2.1.5. Resposta imunológica ao <i>C. pseudotuberculosis</i> e sua relação com o imunodiagnóstico.....	19
3. OBJETIVOS DA PESQUISA.....	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Aspectos éticos.....	22
4.2. Coleta dos soros caprinos.....	22
4.3. Expressão e purificação da proteína recombinante rCP01850.....	22
4.4. Western Blot para a confirmação da identidade da proteína rCP01850.....	24
4.5. Padronização do ELISA indireto utilizando a rCP01850.....	24
4.6. Avaliação do desempenho do ELISA indireto utilizando rCP01850 frente aos soros caprinos.....	26
4.7. Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a caprinocultura é uma prática amplamente difundida, que remonta aos tempos da ocupação portuguesa, se fazendo presente nas cinco grandes regiões do país, mas principalmente no Nordeste, que conta com mais de 90% dos rebanhos nacionais (Farias *et al.*, 2019). A criação de caprinos é parte muito importante do agronegócio, principalmente em localidades onde há grande presença de pequenos produtores, que, embora contenham um número significativo de animais, ainda possuem uma baixa produção devido a algumas vulnerabilidades e problemas de saúde que prejudicam a cadeia de produção (Barnabé *et al.*, 2020).

Uma das principais doenças que atingem os rebanhos caprinos é a Linfadenite Caseosa (LC), que tem como agente etiológico a bactéria aeróbica, pleomórfica, gram-positiva e intracelular facultativa *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Guimarães *et al.*, 2011). *C. pseudotuberculosis* já teve sua sensibilidade à antibióticos *in vitro* demonstrada. No entanto, a bactéria resiste obstinadamente ao uso de antibióticos *in vivo* (Maron, 2017), devido sua capacidade de produzir biofilmes, tornando ineficaz o tratamento para a doença uma vez que o animal já esteja infectado.

A LC é uma doença crônica, subclínica, e que causa diversos prejuízos econômicos devido à sua alta incidência nos rebanhos. A detecção da LC é dificultada quando se apresenta em sua forma visceral, e afeta os linfonodos ou até mesmo os órgãos internos, dificultando o diagnóstico com o animal em vida, tornando possível a identificação da doença apenas após o abate (Barnabé *et al.*, 2020). O padrão-ouro para a identificação da doença é o isolamento do agente etiológico a partir dos linfonodos afetados, mas esta técnica está limitada aos casos clínicos (que afetam linfonodos superficiais), sendo ineficaz para os casos onde as lesões afetam os linfonodos e órgãos internos além de ser pouco prática e demorada (Barral *et al.*, 2019). Com isso, se faz necessário que o diagnóstico desta doença ocorra de forma mais acessível, como por meio de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), um método mais econômico e facilmente aplicável na rotina laboratorial (Silva *et al.*, 2019).

Embora sejam capazes de detectar quando os animais estão apresentando a forma interna da doença, muitos ELISA não possuem sensibilidade e especificidade satisfatórias, o que pode ocasionar na não-detecção de animais que estejam positivos para a LC na forma visceral, e assim contribuir para a continuação da disseminação da doença dentro do rebanho (Barral *et al.*, 2019).

A utilização de proteínas recombinantes como antígenos no ELISA tem se mostrado uma alternativa promissora na realização do diagnóstico de linfadenite caseosa, pois por utilizar antígenos purificados, espera-se que haja uma alta especificidade e significativa sensibilidade (Silva *et al.*, 2019).

Dentre as proteínas recombinantes que podem ser promissoras para o diagnóstico da LC, Rezende *et al.*, (2016) apontou a rCP01850 como uma das principais proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis*, sendo um alvo em potencial para os ensaios de detecção da doença, tanto em ovinos, como apresentado em seu trabalho, quanto em caprinos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Linfadenite Caseosa

Apesar de estar presente por toda a região, a caprinocultura praticada no Nordeste do Brasil enfrenta desafios em seu manejo sanitário, que dificultam a manutenção dos rebanhos e diminuem a produtividade dos animais. Dentre as doenças que podem acometer os caprinos, a principal é a linfadenite caseosa (LC) (Cruz, 2019). A LC é uma doença que apresenta presença cosmopolita, caracterizada pelo aparecimento de granulomas contendo material caseoso, nos linfonodos superficiais e internos (Corrêa, 2018) que gera prejuízos devido à alta incidência nos rebanhos e morbidade dos animais acometidos, comprometendo as funções orgânicas e gerando prejuízos para o pequeno produtor, pois impacta no ganho de peso do animal, na produção de leite, fazendo com que a comercialização destes produtos seja diminuída (Farias *et al.*, 2019).

A LC pode se apresentar na forma externa, afetando os linfonodos superficiais, e na forma interna, afetando linfonodos internos e alguns órgãos, as duas formas podem ocorrer simultaneamente ou separadamente (Oreiby, 2015). A entrada da bactéria no organismo do animal resulta em uma infecção piogênica que acarreta na hipertrofia dos linfonodos afetados, podendo estar acompanhado de abscessos no exterior desses linfonodos (Barnabé *et al.*, 2019).

Em caprinos, o mais comum é a forma externa da LC, onde os linfonodos mais atingidos são os pré-parotídeos e os pré-escapulares, e devido ao aumento de volume que ocorre com a formação do granuloma (Sá *et al.*, 2019), se torna mais fácil de visualizar a hipertrofia desses linfonodos, e assim identificar a doença. Já nos casos de LC visceral, os sinais são menos visíveis, pois os linfonodos afetados não são facilmente acessados, podendo ser detectado sua hipertrofia apenas após o abate (Windsor, 2014). Nestes casos, pode afetar não somente os linfonodos como também os órgãos internos, principalmente os pulmões (Sá *et al.*, 2019).

Os animais acometidos por esta forma de LC podem ainda apresentar sintomas como perda de peso progressiva, distúrbios respiratórios e timpanismo ruminal crônico, além de impactar na produção de carne, leite, e acarretar na perda econômica devido à condenação das carcaças dos animais abatidos, pela presença da infecção (Al-Gaabary *et al.*, 2009).

2.1.1 O agente etiológico

A LC tem como agente etiológico o bacilo Gram negativo, pleomórfico (Gerelli, 2018), intracelular facultativo, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, cuja morfologia se apresenta na forma de cocobacilo, com cerca de 0,5-0,6 µm de largura, e 1-3 µm de comprimento (Guimarães *et al.*, 2011). *C. pseudotuberculosis* possui capacidade fermentativa e é responsável pela formação do abscesso granulomatoso característico da doença (Marques, 2019), se apresentando em duas variantes, biovar Ovis, que atinge ovinos e caprinos, e biovar Equi, (Guimarães *et al.*, 2011).

Seu cultivo é favorecido quando em meio BHI (sigla do inglês *Brain Heart Infusion*) suplementado com triptona, onde se apresenta com coloração branco-amarelada, já em meio ágar-sangue, forma colônias convexas, de cor branco-acinzentada (Rodríguez-Domínguez, 2020). Além de causar linfadenite caseosa em pequenos ruminantes, a *C. pseudotuberculosis* biovar Equi é responsável pela linfangite ulcerativa em bovinos e equinos (Barral, *et al.*, 2019).

2.1.2 Transmissão

A transmissão da doença entre os animais ocorre principalmente pela pele, machucada ou não, e por via oral, seguido pelo trato respiratório, e pelo alimentar (Kaba, 2011), pode também ocorrer através de briga entre os animais, ou até mesmo durante o processo de marcação dos animais, utilizando os mesmos instrumentos sem higienização adequada (Gerelli, 2018). Ocorre também quando são inseridos novos animais no rebanho, que podem estar apresentando a forma subclínica da doença, e disseminar a doença para os animais saudáveis (Corrêa, 2018).

O agente etiológico da LC, que está presente em grande quantidade nos abscessos formados nos linfonodos (Marques, 2019), é liberado no ambiente uma vez que o abscesso é rompido, promovendo a disseminação da doença por um longo período de tempo, pois já foi relatado que a *C. pseudotuberculosis* é capaz de sobreviver no solo por até 8 meses (Gerelli, 2018).

2.1.3 Diagnóstico clínico e microbiológico

Com a alta prevalência dentro do rebanho, um grande número de animais pode desenvolver sintomas clínicos e apresentar hipertrofia nos linfonodos externos (Oreiby, 2015). Com isso se torna mais fácil a identificação visual da doença, o que possibilita a realização de

um diagnóstico microbiológico, que é o padrão ouro para o diagnóstico da LC, com o isolamento do patógeno a partir dos abscessos (Barnabé, 2019). No entanto, este formato de diagnóstico não é possível em todos os casos, pois a linfadenite caseosa se apresenta também na forma visceral, e neste caso, por atingir linfonodos e órgãos internos, onde a sua detecção não é tão simples (Al-Gaabary, 2009).

Em suma, a detecção da LC nos casos onde se apresenta na forma visceral, acontece após abate, quando a carcaça é aberta e é possível localizar os linfonodos hipertrofiados e os órgãos que apresentam a lesão purulenta, causando perda econômica para o produtor, pois estas carcaças são parcial ou totalmente condenadas (Barnabé, 2019).

O diagnóstico microbiológico, apesar de ser o padrão ouro, não é sempre eficaz. O isolamento e identificação das bactérias a partir dos abscessos não é possível sempre, em alguns casos, as bactérias presentes nas lesões podem não ser viáveis para isolamento e cultura *in vitro* (Guimarães *et al.*, 2011).

2.1.4 Diagnóstico sorológico

Para o controle da transmissão da doença dentro do rebanho, é necessário identificar os animais infectados e retirá-los do convívio com os demais animais (Windsor, 2011). Para efetuar tal identificação com mais precisão, a análise sorológica dos rebanhos pode ser uma opção eficaz, pois permite a detecção de anticorpos anti-*C. pseudotuberculosis* tanto nos casos clínicos, onde é possível ter acesso aos abscessos, quanto nos casos subclínicos, onde só é possível acessar os abscessos após o abate dos animais (Oreiby, 2015).

No diagnóstico sorológico, não se detecta diretamente o patógeno causador da doença, ou seus componentes, mas sim os anticorpos produzidos pelo animal em reação à infecção, e assim detectar indiretamente a presença do patógeno (Faccioli-Martins, 2014). Assim, alguns testes sorológicos vem sendo desenvolvidos para detectar a LC em animais assintomáticos, como o teste de aglutinação de soro, imuno-difusão em gel, inibição da hemólise (Rezende *et al.*, 2016) e testes de ELISA, utilizando diversas preparações antigênicas de *C. pseudotuberculosis* (Rebouças *et al.*, 2013) ou diferentes proteínas recombinantes como a rPLD, rCP40 e rCP09720 (Barral, *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019).

Inicialmente, os testes de ELISA para diagnóstico de LC utilizavam como antígeno um preparado de parede celular de *C. pseudotuberculosis* ou exotoxina derivada do sobrenadante do cultivo como antígeno. A sensibilidade do teste era considerada boa, mas a especificidade era relativamente baixa, o que gerava resultados falso-positivos, podendo comprometer o

programa de controle da doença por indicar para o sacrifício animais saudáveis do rebanho (Baird and Fontaine, 2007).

Para aumentar a sensibilidade e especificidade do teste, se faz necessário a utilização de antígenos mais reativos. O antígeno imunodominante, e exotoxina majoritariamente produzida pela *C. pseudotuberculosis* é a fosfolipase D (PLD) (Silva *et al.*, 2019). Essa enzima é a responsável pela hidrólise da esfingomielina, o que acarreta no enfraquecimento da membrana celular do hospedeiro e aumenta sua permeabilidade, favorecendo assim o processo infeccioso (Silva *et al.*, 2019). Diversos imunoenaios já utilizaram a PLD como antígeno, um ELISA utilizando a rPLD como antígeno apresentou uma sensibilidade de 86,3% e especificidade de 82,1% (Menzies *et al.* 1994), Silva *et al.* (2019) obteve especificidade de 90% e sensibilidade de 92% no ELISA indireto para detecção da LC em ovinos. Já o ensaio realizado por Barral *et al.* (2019) apresentou especificidade de 98,7% e sensibilidade de 91%, com acurácia de 96,5%, também para ovinos.

A resposta imunológica difere em caprinos e ovinos devido à diferenças cruciais entre as cepas de *C. pseudotuberculosis* que infecta cada um, Hoelzle *et al.*, (2013) identificou que existe diferença entre as proteínas detectadas a partir da cepa isolada de caprinos e a cepa isolada de ovinos, tendo detectado ao menos cinco proteínas a partir da cepa isolada de ovelhas que não foram detectadas em caprinos.

Alguns formatos do teste ELISA usam proteínas recombinantes para o diagnóstico de LC, o que pode conceder níveis altos de especificidade ao teste, associado com valores de sensibilidade significantes devido ao uso de apenas um antígeno purificado (Rezende *et al.*, 2016). Buscar tais antígenos que sejam mais específicos ao teste, envolve a utilização de ferramentas biotecnológicas tais como sequenciamento de nova geração e análises utilizando ferramentas da bioinformática, que podem acarretar na identificação de novos antígenos cruciais no desenvolvimento de novas vacinas e testes diagnósticos (Barral *et al.*, 2019). O desempenho e a aplicabilidade de tais testes sorológicos dependem diretamente da seleção de um antígeno imunodominante que seja reconhecido na maioria dos hospedeiros infectados pela *C. pseudotuberculosis* (Oreiby, 2015).

2.1.4.1 Uso da proteína recombinante rCP01850

A proteína recombinante rCP01850 é uma fosfatase ácida, contendo 410 aminoácidos e peso molecular aproximado de 33,5kDa, codificada pelo gene cp1002_RS01850 (anteriormente cp1002_0369) (Santos *et al.*, 2012), foi produzida *in vitro* pela primeira vez na UFPel utilizando

a tecnologia do DNA recombinante, tendo sido produzida em *Escherichia coli*, utilizando o vetor de clonagem pAE (Ramos *et al.*, 2004). Essa fosfatase ácida recombinante foi utilizada em vacinas de subunidade para linfadenite caseosa, tendo sua patente depositada em 21/07/2016, utilizando própolis vermelha brasileira, ou saponina como adjuvante na composição (Número de depósito da patente no INPI: BR 102016016891-0 A2).

Essa proteína foi utilizada ainda na detecção de LC caseosa em ovinos, tendo papel fundamental nesse processo como alvo antigênico, no trabalho realizado por Rezende (2016). Neste experimento, um total de 60 amostras de soro foi utilizado, sendo 40 amostras negativas, retiradas de ovelhas localizadas em áreas não endêmicas, que foram incluídos no experimento apenas com a comprovação do resultado negativo no ELISA realizado, e 20 amostras positivas, retiradas de animais que apresentavam sintomas de LC, que foram incluídos apenas aqueles dos quais foi possível isolar a *C. pseudotuberculosis* a partir das lesões, e apresentaram resultado positivo no ELISA (Rezende *et al.*, 2016).

Como resultado, foram obtidas especificidade de 92,5%, e sensibilidade de 90%, o que se considera excelentes níveis, e que abre as portas para o uso desta proteína para o diagnóstico sorológico de LC em ovelhas. Silva (2019) também utilizou a proteína rCP01850 em um ELISA indireto para detecção de linfadenite caseosa em ovinos, mas em associação com a rPLD, e obteve uma sensibilidade de 92,5% e especificidade de 72% (Silva *et al.*, 2019).

2.1.5. Resposta imunológica ao *C. pseudotuberculosis* e sua relação com o imunodiagnóstico

É importante ressaltar que a LC age de forma diferente em ovinos e caprinos, justamente pela diferença entre os sistemas imunológicos destas duas espécies (Hoelzle *et al.*, 2013). Os testes ELISA não são igualmente aplicados a caprinos e ovinos devido à resposta sorológica de cada espécie a diferentes antígenos da *C. pseudotuberculosis*, pois há variação nos antígenos que a bactéria apresenta de acordo com a espécie que é infectada (Hoelzle *et al.*, 2013).

Por exemplo, o ELISA mais comumente utilizado, que tem PLD como único antígeno, não é capaz de identificar todos os animais infectados, sobretudo se for utilizado para diagnosticar ovelhas no estágio subclínico da doença, o que pode explicar o sucesso prévio de certas técnicas de ELISA em diagnosticar e erradicar LC em cabras de forma muito mais eficaz do que em ovelhas (Oreiby, 2015).

Devido a isso, se faz necessário que sejam testadas diferentes antígenos de *C. pseudotuberculosis* para detecção sorológica da LC, ou até mesmo utilizar esses antígenos em associação, de forma a desenvolver testes mais precisos e específicos (Silva, *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS DA PESQUISA

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e padronizar um ELISA indireto utilizando a proteína recombinante rCP01850 de *C. pseudotuberculosis* para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos

3.2. Objetivos Específicos

- Expressar a proteína rCP01850 de forma heteróloga
- Padronizar o método de ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850 para caprinos;
- Avaliar o desempenho do ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850 para o diagnóstico de LC em caprinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos envolvendo animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob o número de protocolo 23091.007402/2018-65. Os procedimentos foram realizados de acordo com o estabelecido pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2. Coleta dos soros caprinos

A coleta de sangue dos caprinos foi realizada por meio de punção da veia jugular, com assepsia prévia, as amostras foram acondicionadas em tubos identificados, e refrigeradas em caixas isotérmicas para transporte até o Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Doenças Infecto-Parasitárias (LABIP) para extração do soro por centrifugação, e acondicionamento em freezer a -20°C.

Foi utilizado um total de 70 soros para o experimento, sendo 35 caracterizados como positivos e 35 como negativos. O grupo controle negativo, consistiu de caprinos de até 1 ano de idade sem sinais de LC e provenientes de propriedades com histórico de controle adequado da doença. Foi realizado ainda um ELISA indireto utilizando antígenos secretados da cepa 1002 de *C. pseudotuberculosis* de acordo com metodologia previamente descrita (Seyffert et al., 2010), com 98,5% de especificidade e 93,5% de sensibilidade para confirmação do status de soronegativo. Os animais que faziam parte do grupo controle positivo apresentavam lesões externas características de LC, e se efetuou a confirmação de *C. pseudotuberculosis* através de caracterização microbiológica.

4.3. Expressão e purificação da proteína recombinante rCP01850

A proteína foi expressa utilizando a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star utilizando-se do plasmídeo recombinante pAE/CP01850, previamente construído pelo grupo do Laboratório de Biotecnologia Infecto-parasitária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), a transformação das bactérias foi realizada através de choque térmico. Resumidamente, em um eppendorf de 1,5 mL, foi colocado 100µL de CaCl₂, as bactérias a serem transformadas e 3µL do plasmídeo pAE/CP01850. O eppendorf foi levado ao gelo durante 15 minutos e então foi colocado em

banho-maria a 42°C durante 40 segundos, e em seguida colocado novamente no gelo por 2 minutos.

Após o processo de transformação por choque térmico, foi adicionado 500µL de meio LB (Luria Bertani) líquido, e o cultivo foi submetido à agitação durante 2h, em temperatura de 37°C. Subsequentemente, foi plaqueado 100µL do cultivo bacteriano em meio LB sólido com ampicilina (100 µg/mL), que foi utilizada aqui por ser o marcador de seleção das colônias transformadas.

Em seguida o eppendorf foi levado à centrífuga, a 7.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso no líquido residual restante no eppendorf e plaqueado. Ambas as placas foram deixadas em estufa aquecida a 37°C por 16h, para o crescimento das colônias transformadas.

Uma vez que as colônias transformadas cresceram, foi preparado o pré-inóculo para a expressão em larga escala, em um tubo do tipo Falcon de 50 mL, foi adicionado 7 mL de meio LB, com ampicilina, e uma colônia foi selecionada da placa e transferida para o Falcon, o cultivo foi colocado sob agitação durante 16h, novamente a 37°C. Passadas as 16h, 5 mL do pré-inóculo foram utilizados para o cultivo em larga escala.

Para tanto, foram preparados 5 erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio LB líquido e ampicilina, a cada um foi adicionado 1 mL do pré-inóculo, e foram levados a shaker orbital durante 3h, o crescimento das colônias foi medido 2h após o início do tempo, e quando a densidade ótica (DO) dos cultivos atingiu a faixa entre 0,6 e 0,8, a indução da expressão foi realizada, adicionando 100µL de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG), e retornou para a agitação durante 3h, a 37°C.

Finalizado a indução, o cultivo foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado durante 15 minutos a 7.000 rpm, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet congelado até posterior tratamento. Para isso, o conteúdo de cada Falcon foi ressuspenso em 5 mL de tampão PBS 1x gelado, e transferido para dois Falcons (totalizando 50 mL). A cada Falcon foi adicionado lisozima, na proporção 1:1000, e em seguida o conteúdo foi submetido à 15 ciclos de sonicação, cada um com duração de 15 segundos e com intervalo de 15 segundos entre os ciclos.

Após a sonicação, o conteúdo foi submetido à agitação em câmara fria durante 30 minutos, e então foi centrifugado novamente a 7.000 rpm por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em 30 mL de Akta Wash com ureia (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 5 mM, Uréia 8 M), para solubilização das proteínas, e então foi colocado em câmara fria sob agitação, durante 16h. Os falcons foram

submetidos à centrifugação durante 1h e 30 min, a 10.000 rpm e 4°C, e então o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 mm, para seguir com a purificação, a solução filtrada contendo a rCP01850 foi purificada em coluna de níquel Histrap™ (GE Healthcare). A pureza foi determinada através da realização de um gel de SDS-PAGE a 12% das frações obtidas na purificação. As frações contendo proteína recombinantes foram dialisadas em tubos SnakeSkin™ 10.000 MWCO (Thermo Scientific). A concentração das proteínas obtidas foi determinada utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific)

4.4. Western Blot para a confirmação da identidade da proteína rCP01850

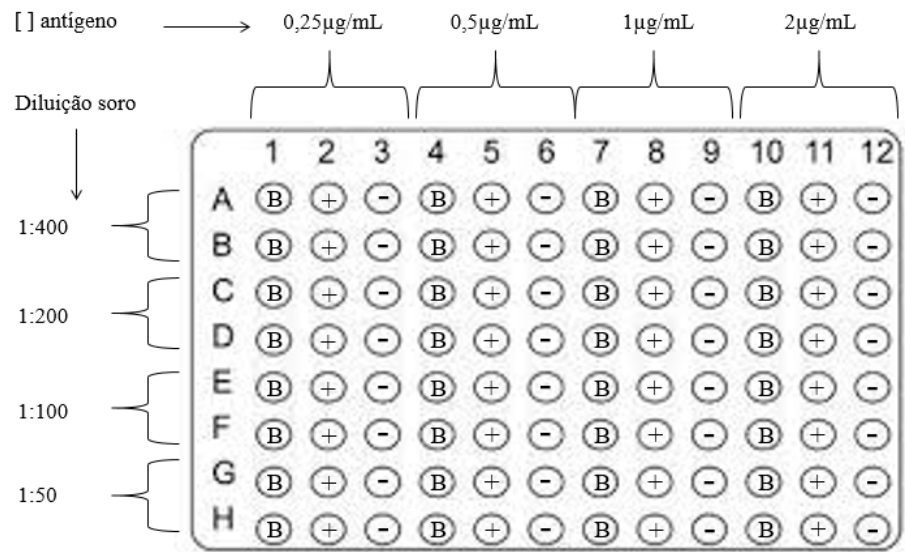
Para determinar a identidade da proteína rCP01850, foi realizado um Western Blot. A proteína foi misturada com tampão de corrida [Tris/HCl 100mM, pH 6,8; 2-mercaptoetanol 100mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, e glicerol 20%], aquecido a 95°C durante 10 minutos para digestão das proteínas, e submetido à eletroforese em SDS-PAGE 12%. Após corrida, as proteínas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose usando o Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad), a 18V por 1h, usando o tampão Bjerrum Schafer-Nielsen (Tris 48mM, glicina 39mM, 20% de metanol e pH 9,2).

A membrana foi bloqueada com PBS + 5% de caseína durante 1h, a 37°C, então foi lavada três vezes com PBS-T 0,05% durante 5 minutos, e incubada por 1h com o anticorpo monoclonal Anti-His6-Peroxidase (Roche), diluído na proporção de 1:4.000 em PBS-T, a 37°C. As bandas reativas foram visualizadas usando 3,3'-diaminobenzidina e H₂O₂.

4.5. Padronização do ELISA indireto utilizando a rCP01850

Para selecionar as melhores concentrações da proteína recombinante, dos soros, e do anticorpo conjugado, foi utilizando o método *checkerboard titration*, que consiste em, primeiramente, testar diferentes diluições da proteína com diferentes diluições de soro, mantendo a concentração de anticorpo conjugado fixa, para definir qual seria a melhor diluição do antígeno a ser utilizado. Para a padronização foi utilizado um pool de 3 soros comprovadamente positivos e 3 soros comprovadamente negativos conforme descrito no item 4.2. Foram utilizadas, para a proteína, as concentrações de 0,25, 0,50, 1 e 2µg/mL, em tampão carbonato-bicarbonato, e o soro foi utilizado nas diluições de 1:400, 1:200, 1:200 e 1:50 em PBS-T + 1% de caseína (Figura 1).

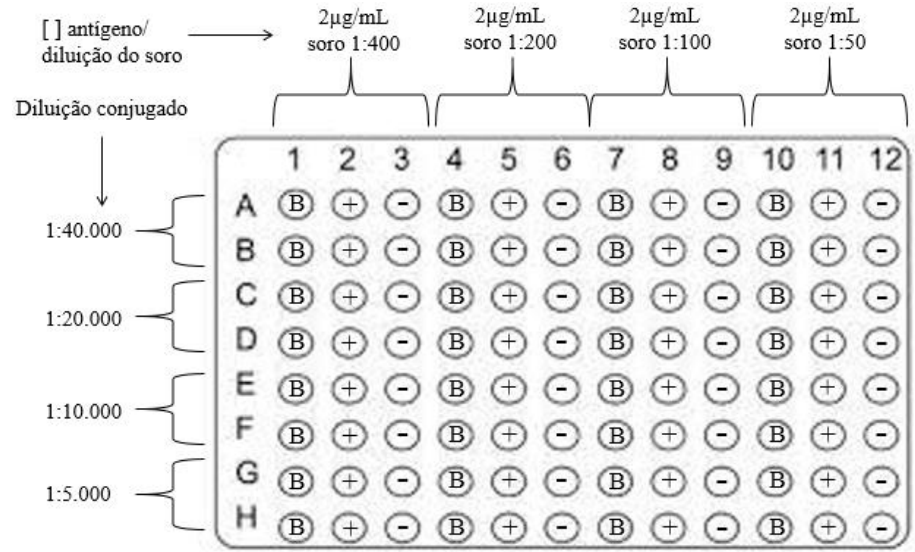
Figura 1: **método checkerboard titration em placa de 96 poços**. Nas colunas foram testadas as diferentes concentrações da proteína rCP01850, e nas linhas as diferentes concentrações de soro caprino. A concentração de anticorpo foi fixada em 1:10.000.



Fonte: autoria própria

Com a definição da concentração ótima da proteína, é testado diferentes concentrações do soro com diferentes concentrações do anticorpo, para então verificar a melhor concentração de soro e de anticorpo conjugado, para o anticorpo, foram utilizadas as concentrações de 1:40.000, 1:20.000, 1:10.000 e 1:5.000, conforme Figura 2.

Figura 2: **método checkerboard titration em placa de 96 poços**. A concentração da proteína rCP01850 foi fixada em 2µg/mL, e foram testadas diferentes concentrações do soro caprino nas colunas, seguindo o padrão de branco, positivo e negativo para cada concentração, e nas linhas diferentes concentrações do anticorpo conjugado.



Fonte: autoria própria

4.6. Avaliação do desempenho do ELISA indireto utilizando rCP01850 frente aos soros caprinos

Os 70 soros coletados foram testados frente a metodologia do ELISA indireto com rCP01850 padronizada conforme descrito no tópico 4.5. Em resumo, em placas de poliestireno de 96 poços, foi realizada a sensibilização dos poços utilizando 100µL por poço da proteína recombinante rCP01850, na concentração de 2 µL/mL, diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, e incubado a 4°C durante 16h. A placa então foi lavada três vezes com PBS-T (0,05%), e foi utilizado PBS-T com 5% de caseína durante 2h a 37°C, para a realização do bloqueio. A placa foi novamente lavada três vezes com PBS-T (0,05%), e então foi aplicado as amostras de soro na diluição de 1:50, em duplicata, cada placa contando com um controle positivo, um controle negativo e um branco, e incubado por 1h a 37°C. Então, após mais três lavagens, foi adicionado o conjugado IgG anti-cabra marcado com peroxidase, na diluição de 1:5000, e incubado durante 45 minutos a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada cinco vezes, e foi aplicada a solução de revelação contendo tampão citrato-fosfato pH 4,0, OPD e peróxido de hidrogênio, e deixado à temperatura ambiente e em local escuro por 15 minutos. As reações foram paradas com solução de ácido sulfúrico à 5%, e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

4.7. Análise estatística

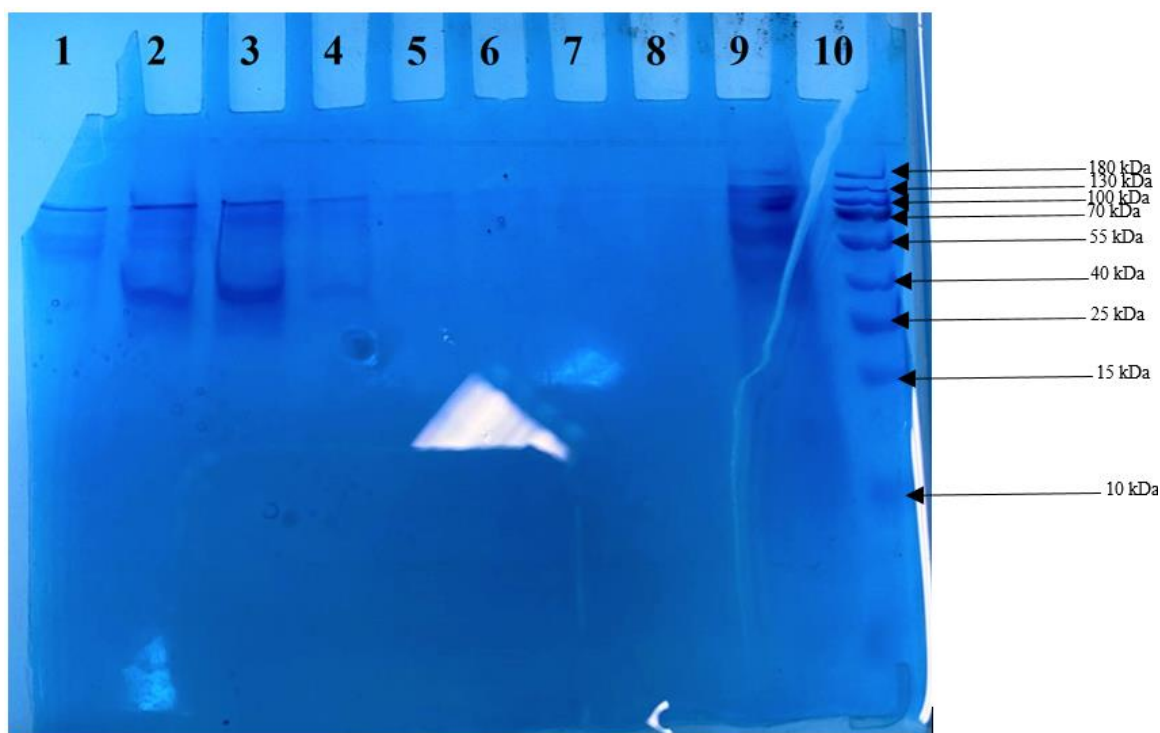
Os resultados das absorbâncias do ELISA foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, e a partir deste resultado, foi gerada uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) usando o software SPSS v. 12.0 (IBM), para o estabelecimento do ponto de corte e determinação dos valores de especificidade, sensibilidade. A área sob a curva foi utilizada para determinar a acurácia do ensaio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão da proteína rCP01850 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* rendeu o total de 5,3 mg/L. O rendimento da proteína foi suficiente não apenas para este estudo, mas também para pesquisas futuras que serão realizadas por nossa equipe. O rendimento final apresentou valor parecido com o obtido por Rezende *et al.*, (2016), que foi de 6mg/L, mas foi inferior ao rendimento obtido por Silva *et al.*, (2019), de 11mg/L.

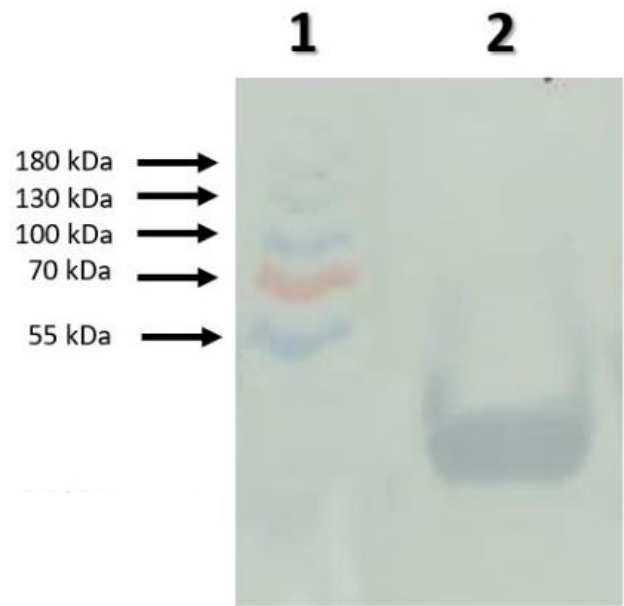
Após a purificação, observou-se que a proteína rCP01850 foi liberada nas frações 2, 3 e 4 (*Akta Elution* 10, 20 e 30%), respectivamente (Figura 3). A identidade da proteína rCP01850 foi confirmada através de *Western Blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-his-6x. Uma banda com aproximadamente 33,5 kDa foi reconhecida (Figura 4).

Figura 3 – SDS-PAGE 12% contendo as eluições da proteína rCP01850 após purificação. (1) *Akta Wash* 100%. (2) *Akta Elution* 10%. (3) *Akta Elution* 20%. (4) *Akta Elution* 30%. (5) *Akta Elution* 40%. (6) *Akta Elution* 50%. (7) *Akta Elution* 60%. (8) *Akta Elution* 100%. (9) Flow through da purificação da rCP01850. (10) Marcador marcador pré-corado PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher).



Fonte: equipe LAVIA-UFERSA.

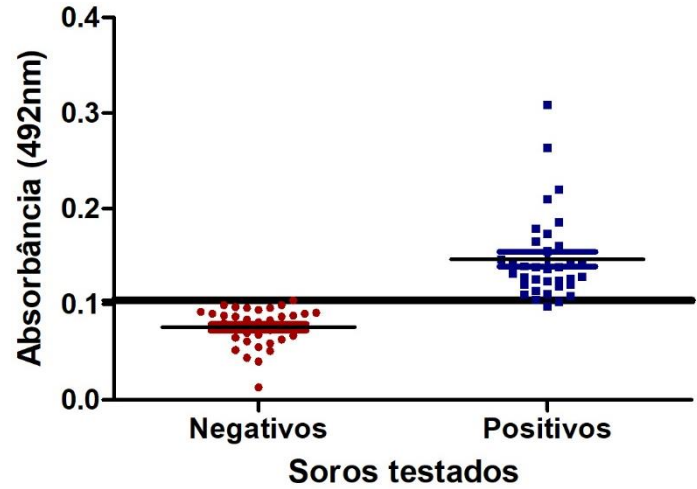
Figura 4 – *Western Blot* da proteína rCP01850 de *C. pseudotuberculosis* utilizando o anticorpo monoclonal Anti-His6-Peroxidase (Roche). A proteína recombinante apresentou peso molecular de 33,5 kDa. Poço 1: marcador pré-corado PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher). Poço 2: proteína rCP01850.



Fonte: equipe LAVIA-UFERSA

Após a análise dos resultados do ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850 como antígeno aplicado às 70 amostras de soro caprinos, foi plotada uma curva ROC no programa SPSS, conforme pode ser visualizado na Figura 4. Através das análises, observou-se um valor de sensibilidade e especificidade de 94,3%, e 100%, quando o ponto de corte foi 0,10425. A distribuição dos soros positivos e negativos com relação ao ponto de corte pode ser visualizado na figura 5.

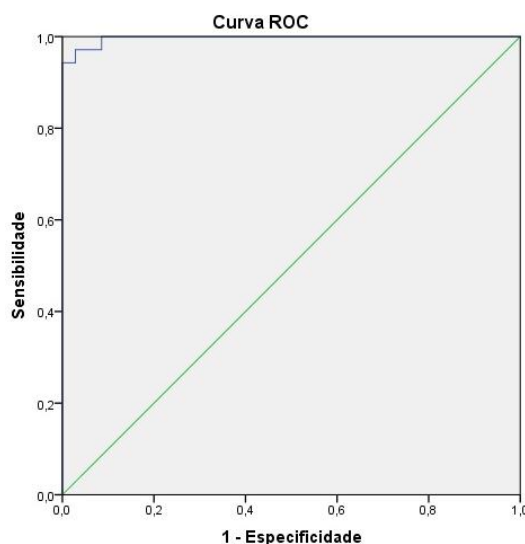
Figura 5 – Distribuição dos soros com relação ao ponto de corte.



Fonte: autoria própria

A área sob a curva representa a acurácia ou performance global do teste, pois leva em consideração todos os valores de sensibilidade e especificidade para cada valor da variável do teste. No presente estudo, a área sob a curva foi de 0,997, o que se reflete em uma acurácia de 99,7% (Figura 6).

Figura 6 - Curva ROC do ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850



Fonte: SPSS.

A LC está presente em todo o mundo, e geralmente segue a distribuição dos rebanhos ovinos e caprinos, sendo subnotificada em diversas regiões. A disseminação desta doença pelo mundo provavelmente ocorreu devido à compra e venda de animais infectados que não apresentavam sintomas da doença (Guimarães, *et al.*, 2011).

No entanto, é necessário entender que só será possível controlar a LC quando existir um teste diagnóstico capaz de identificar todos os casos e estágios de infecção, que seja efetivo para a identificação de animais acometidos pela LC, mesmo que não apresentem sintomas aparentes, mas continuam sendo fonte de infecção para os animais saudáveis (Silva *et al.*, 2019) para tanto, é necessário a contínua pesquisa e desenvolvimento de testes mais precisos.

Rezende *et al.*, (2016) identificou a rCP01850 como um alvo promissor para a avaliação soroepidemiológica da linfadenite caseosa, por apresentar excelente sensibilidade e especificidade, como demonstrado no presente trabalho. De acordo com o trabalho de Silva *et al.*, (2019), o resultado obtido com a rCP01850 sozinha, é bastante promissor, no entanto, existe a possibilidade de que assim como o resultado obtido no diagnóstico aplicado a ovinos, a combinação da rCP01850 com a rPLD seja ainda mais eficiente para desenvolver ensaios mais sensíveis no diagnóstico da LC em caprinos.

Diferentes ensaios utilizando proteínas recombinantes já foram desenvolvidos, Barral *et al.* (2019) testou as proteínas recombinantes PLD, CP40, PknG, DtxR e Grx, como antígenos para a detecção da LC, tendo diferentes resultados de sensibilidade e especificidade para cada uma das proteínas, sendo a PLD e CP40 as mais promissoras. A associação de diferentes proteínas recombinantes para o diagnóstico sorológico pode aumentar a precisão dos ensaios, pois várias proteínas são reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro infectado.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão da proteína rCP01850 apresentou um rendimento satisfatório e também observou-se que a proteína apresentou tamanho conforme esperado. O ELISA indireto utilizando a rCP01850 de *C. pseudotuberculosis* aqui padronizado apresentou um desempenho bastante promissor, com elevada acurácia global, para ser utilizado no diagnóstico da LC em rebanhos caprinos, sendo uma alternativa na identificação de animais positivos para a doença.

REFERÊNCIAS

AL-GAABARY, M. H.; OSMAN, S. A.; OREIBY, A. F. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1-3, p. 116–121, nov. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448809002156>>. Acesso em abril de 2022.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, nov. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17826790/>. Acesso em maio de 2022.

BARNABÉ, N. N. da C. et al. Assessment of Caseous lymphadenitis in goats in a slaughterhouse in the Brazilian semi-arid region and estimates of economic losses due to carcass condemnation. **Embrapa.br**, 2020. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1125069>>. Acesso em março de 2022

BARRAL, T. D. et al. A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1313–1323, 9 jul. 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/334326193_A_panel_of_recombinant_proteins_for_the_serodiagnosis_of_caseous_lymphadenitis_in_goats_and_sheep>. Acesso em março de 2022.

CORREIA, J. I. et al. Expression of six possible virulence factors of *C. pseudotuberculosis* in murine macrophage. **PUBVET**, v. 12, n. 12, 2017. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193055066>>. Acesso em maio de 2022.

CRUZ, G. et al. **ASPECTOS SANITÁRIOS NA PRODUÇÃO DE CAPRINOS E OVINOS DE PRODUTORES FAMILIARES NO SEMIÁRIDO PARAIBANO**. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR2019I00007>>. Acesso em maio de 2022.

DOMÍNGUEZ, M. C. R. **Obtención y caracterización de las proteínas recombinantes PLD y CP40, factores de virulencia de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* con potencial inmunogénico**. 2020. 163 p. Tese (Mestrado em Ciências Agropecuárias e Recursos Naturais) – Universidad Autónoma Del Estado De México, Toluca, 2020. Disponível em: <<https://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/110109>>. Acesso em maio de 2022.

FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; Linfadenite Caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle. **Embrapa Caprinos e Ovinos**. Sobral, CE. Junho de 2014. Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/117061/1/CNPC-2014-Linfadenite.pdf>>. Acesso em 02 de julho de 2019.

FARIAS, A. E. M. et al. Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 4, p. 745–752, 12 nov. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30421374/>>. Acesso em abril de 2022.

GERELLI, A. et al. **ESTUDO RETROSPECTIVO DE CASOS DE LINFADENITE CASEOSA DIAGNOSTICADOS PELO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA...** Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/332514935_ESTUDO_RETROSPECTIVO_DE_CASOS_DE_LINFADENITE_CASEOSA_DIAGNOSTICADOS_PELO_LABORATORIO_DE_PATOLOGIA_VETERINARIA_NO_PERIODO_DE_2012_A_2017>. Acesso em maio de 2022.

GUIMARÃES, A. et al. Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. **HIOAB Journal**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/285967469_Caseous_lymphadenitis_Epidemiology_diagnosis_and_control>. Acesso em: 1 de junho 2022.

HOELZLE, L. E. et al. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 359–365, jun. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113513001594?via%3Dihub>>. Acesso em 1 de junho de 2022.

KABA, J. et al. Evaluation of the risk factors influencing the spread of caseous lymphadenitis in goat herds. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 2, 1 jan. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21721407/>>. Acesso em abril de 2022.

MARON, D. **Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* a múltiplos fármacos**. 2017. 41 p. Trabalho de conclusão de curso (Pós-graduação em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017. Disponível em: <

<https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ICBB->

BDAS4S/1/resistencia_do_mycobacterium_tuberculosis_a_mltiplos_frmacos_.pdf>.

Acesso em abril de 2020.

MARQUES, A. S. et al. Identificação in silico de potenciais alvos antigênicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **PUBVET**, v. 13, p. 153-, 2019. Disponível em: < [MENZIES, P. I. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Small Ruminant Research**, v. 13, n. 2, p. 193–198, mar. 1994. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0921448894900965>>. Acesso em maio de 2022.](https://www.pubvet.com.br/artigo/6097/identificaccedilatildeo-in-silico-de-potenciais-alvos-antigecircnicos-de-corynebacterium-pseudotuberculosis#:~:text=Identifica%C3%A7%C3%A3o%20in%20silico%20de%20potenciais%20alvos%20antig%C3%AAnicos%20de%20Corynebacterium%20pseudotuberculosis,-Andressa%20Souza%20Marques&text=Corynebacterium%20pseudotuberculosis%20%C3%A9%20uma%20bact%C3%A9ria,ruminantes%20como%20caprinos%20e%20ovinos.> . Acesso em abril de 2022.</p>
</div>
<div data-bbox=)

OREIBY, A. F. Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 160–166, jan. 2015. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448814003381>>. Acesso em maio de 2022.

RAMOS, C. R. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1103–1109, ago. 2004.

REBOUÇAS, M. F. et al. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], 2013.v. 33, n. 11, p. 1296–1302;

REZENDE, A. DE F. S. et al. In silico identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 521–529, 1 jun. 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27071381/>>. Acesso em 02 de junho de 2022.

SÁ, M. da C. A. De et al. Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: Revisão. **Pubvet**, [s. l.], 2018.v. 12, n. 11, p. 1–13. Nov de 2018. Disponível em: <<https://www.pubvet.com.br/artigo/5252/linfadenite-caseosa-em-caprinos-e-ovinos-revisatildeo>> Acesso em junho de 2022.

SANTOS, R. N. et al. Aspectos epidemiológicos da criação de caprinos leiteiros em comunidades rurais dos municípios de Petrolina e Santa Maria da Boa Vista, PE. **Embrapa.br**, 3 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1092299/aspectos-epidemiologicos-da-criacao-de-caprinos-leiteiros-em-comunidades-rurais-dos-municipios-de-petrolina-e-santa-maria-da-boa-vista-pe>>. Acesso em abril de 2022.

SANTOS, A. R. et al. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. **BMC Genomics**, v. 13, n. S5, out. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23095951/>>.

SILVA, M. T. DE O. et al. Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. **Vaccine**, v. 36, n. 1, p. 74–83, jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29174312/>. Acesso em março de 2022.

SILVA, M. T. DE O. et al. The combination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rPLD, rCP01850 and rCP09720 for improved detection of caseous lymphadenitis in sheep by ELISA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 1759–1765, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31724936/>>. Acesso em março de 2022.

WINDSOR, P. A. Control of Caseous Lymphadenitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 193–202, mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21215903/>>. Acesso em junho de 2022.

WINDSOR, P. Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, p. 11, mar. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7337174/>>. Acesso em junho de 2022.