



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

Ana Karolina Melo Oliveira Barros

**Avaliação da proteção de ovinos imunizados com formulação vacinal contra linfadenite
caseosa**

MOSSORÓ

2023

Ana Karolina Melo Oliveira Barros

Avaliação da proteção de ovinos imunizados com formulação vacinal contra linfadenite caseosa

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco silvestre
Brilhante Bezerra

MOSSORÓ
2023

© Todos os direitos estão reservados a 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. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

BB277 Barros, Ana Karolina Melo Oliveira.
a Avaliação da proteção de ovinos imunizados com
 formulação vacinal contra linfadenite caseosa /
 Ana Karolina Melo Oliveira Barros. - 2023.
 45 f. : il.

 Orientador: Francisco Silvestre Brilhante
 Bezerra.
 Monografia (graduação) - Universidade Federal
 Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
 2023.

 1. vacina. 2. linfadenite. 3. histopatologia.
 4. ovinos. 5. proteção. I. Bezerra, Francisco
 Silvestre Brilhante, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

CRB: 15/120

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.

Ana Karolina Melo Oliveira Barros

**Avaliação da proteção de ovinos imunizados com formulação vacinal contra linfadenite
caseosa**

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

Defendida em: 13 /10 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA
Data: 21/10/2023 10:15:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 BARBARA MONIQUE DE FREITAS VASCONCELOS
Data: 21/10/2023 22:11:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. M. Sc. Bárbara Monique de Freitas Vasconcelos (FACENE)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 MARIA JOANA NOGUEIRA DE MOURA
Data: 22/10/2023 07:55:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

M. Sc. Maria Joana Nogueira de Moura
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado forças para continuar e me guiado pelo meu caminho.

Agradeço a mim mesma, por ter conseguido chegar até o fim e se esforçado para alcançar os objetivos.

Agradeço a minha família, por sempre cuidarem de mim e por todo apoio que tive todos esses anos.

Agradeço a Dona Leila e a Daniela por sempre cuidarem de mim.

Agradeço ao professor Silvestre e por todos do LAVIA, por terem me acolhido e por cada ensinamento.

Agradeço a Ana Beatriz, por ter me passado o conhecimento necessário para eu conseguir realizar meu experimento, ter tido paciência, além de ter ficado até tarde em vários dias cansativos me ajudando, tornando tudo ainda mais leve.

Agradeço ao Chagas, por todos esses anos de companheirismo em trabalhos e na vida.

Agradeço a todos meus amigos, por terem aguentado meus surtos e por todas as conversas.

RESUMO

A maioria das vacinas recombinantes desenvolvidas contra a linfadenite caseosa, tem sido testada apenas em modelo murino sendo requeridos estudos nas espécies alvo. A proteína rCP40 apresentou-se promissora, induzindo taxas de proteção de até 100% e o BCG apresenta a capacidade de indução de proteção cruzada contra a LC. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a taxa de redução de lesões anatomopatológicas nos linfonodos e órgãos dos animais desafiados com *C. pseudotuberculosis*. Ovinos foram inoculados com solução salina 0,9% (controle, G1) ou rCP40 + *M. bovis* BCG *Pasteur* (G2) e desafiados com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. A necrópsia foi realizada doze semanas após o desafio para o diagnóstico de lesões macroscópicas e coleta de tecidos de linfonodos, baço, pulmões, fígado e rins para análise histopatológica. Para a mensuração das lesões foram atribuídos escores conforme a gravidade das lesões. Quanto às vísceras, apenas os pulmões apresentaram lesões histopatológicas compatíveis com pneumonia intersticial moderada e congestão no G1, estando os órgãos do G2 livre de lesões, o que gerou uma redução de 100 % das lesões. Quanto aos linfonodos, observou-se uma redução relativa de lesões de 41,67 % das lesões macroscópicas e de 31,25 % das lesões histológicas ($P < 0,05$). Em conclusão, a formulação vacinal testada foi capaz de promover uma redução no número de lesões induzidas por *C. pseudotuberculosis* em ovinos, com redução de 100 % das lesões pulmonares.

Palavras-chave: vacina; linfadenite; histopatologia; ovinos; proteção.

ABSTRACT

Most recombinant vaccines developed against caseous lymphadenitis, have been tested only in murine model being required studies in target species. The rCP40 protein was promising, inducing protection rates of up to 100% and BCG has the ability to induce cross protection against LC. Thus, this study aims to evaluate the rate of reduction of anatomopathological lesions in lymph nodes and organs of animals challenged with *C. pseudotuberculosis*. Sheep were inoculated with 0.9% saline (control, G1) or rCP40 + M. Bovis BCG Pasteur (G2) and challenged with the virulent strain MIC-6 of *C. pseudotuberculosis*. Necropsy was performed twelve weeks after the challenge for the diagnosis of macroscopic lesions and collection of tissues from lymph nodes, spleen, lungs, liver and kidneys for histopathological analysis. For the measurement of injuries were assigned scores according to the severity of injuries. As for the viscera, only the lungs presented histopathological lesions compatible with moderate interstitial pneumonia and congestion in G1, and the organs of G2 free of lesions, which generated a 100% reduction of lesions. As for lymph nodes, there was a relative reduction of lesions of 41.67% of macroscopic lesions and 31.25% of histological lesions ($P < 0.05$). In conclusion, the vaccine formulation tested was able to promote a reduction in the number of lesions induced by *C. pseudotuberculosis* in sheep, with a 100% reduction in lung lesions.

Keywords: vaccine; lymphadenitis; histopathology; sheep; protection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Abcesso encontrado no linfonodo parotídeo de um animal do G1 (controle).....	29
Figura 2	–	Cápsula de tecido conjuntivo fibroso de abscesso abscesso característico da linfadenite caseosa, HE x 100.....	32
Figura 3	–	Histologia dos linfonodos. A – Linfonodo normal; B – Linfonodo apresentando hiperplasia do tecido linfoide encontrado no linfonodo de um animal do G2 (rCP40 + BCG). Setas indicam os folículos aumentados. HE x 100.	33
Figura 4	–	À esquerda, baço de um animal do grupo G2 (rCP40 + BCG) apresentando um aumento considerável em relação ao baço de animal do mesmo grupo, à direita.....	33
Figura 5	–	Hiperplasia da polpa branca de baço do ovino do G2 (rCP40 + BCG). HE x 200.	34
Figura 6	–	Histologia do pulmão. A – Pulmão normal; B – Pulmão apresentando pneumonia intersticial moderada encontrada no pulmão de um ovino do G1 (solução salina). HE x 100.....	36

LISTA DE QUADRO

- Quadro 1 – Dados das lesões macroscópicas dos linfonodos dos animais dos grupos experimentais. "D" significa direito; "E" significa esquerdo. “*” significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Categorias dos escores: Categoria 0: Linfonodo normal ou ligeiramente aumentado - Escore (0/3); Categoria 1: Linfonodo aumentado - Escore (1/3); Categoria 2: Linfonodo aumentado e hemorrágico ou congestionado - Escore (2/3); Categoria 3: Linfonodo aumentado com necrose focal, abscessos ou caseação - Escore (3/3)..... 30
- Quadro 2 – Dados das lesões microscópicas dos linfonodos dos animais dos grupos experimentais. "D" significa direito; "E" significa esquerdo “*” significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Categorias dos escores: Categoria 0: Linfonodo normal - Escore (0/3); Categoria 1: Linfonodo com presença de hiperplasia linfóide folicular - Escore (1/3); Categoria 2: Linfonodo com presença de áreas hemorrágicas ou congestionadas - Escore (2/3); Categoria 3: Linfonodo com presença de abscesso capsulado, células necróticas e infiltrado - Escore (3/3).....31
- Quadro 3 – Dados das lesões microscópicas dos pulmões dos animais dos grupos experimentais. "D" significa direito; "E" significa esquerdo. Letras diferentes significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Categorias dos escores: Categoria 0: Pulmão normal - Escore (0/2); Categoria 1: Pneumonia intersticial moderada - Escore (1/2); Categoria 2: Pneumonia intersticial moderada e congestão - Escore (2/2)..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BHI	Brain Heart Infusion
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CMNR	Gêneros <i>Corynebacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> e <i>Rhodococcus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
G1	Grupo controle
G2	Grupo imunizado com <i>M. bovis</i> BCG <i>Pasteur</i> e rCP40
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Quilodalton
LC	Linfadenite caseosa
PCR	Polymerase Chain Reaction
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semiárido

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	Linfadenite caseosa	14
2.1.1	Epidemiologia e impacto econômico	14
2.1.2	Formas de infecção	14
2.1.3	Diagnóstico	15
2.1.4	Alterações histopatológicas na linfadenite caseosa.	16
2.1.5	Tratamento	16
2.1.6	Controle e medidas profiláticas.....	17
2.2	CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS	17
2.2.1	Classificação	17
2.2.2	Patogenicidade	18
2.2.3	Fatores de virulência	18
2.3	CP40 RECOMBINANTE	19
2.4	BCG- PASTEUR	20
3.	HIPÓTESES	22
4.	JUSTIFICATIVA	23
5.	OBJETIVOS	24
5.1	Objetivo geral	24
5.2	Objetivos específicos	24
6.	MATERIAL E MÉTODOS	25
6.1	Cultivo da C. pseudotuberculosis, M. bovis BCG e E. coli	25
6.2	Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante CP40	25
6.3	Aspectos éticos e animais experimentais	25
6.4	Imunização dos animais e desafio	26

6.5	Necropsia e avaliação histopatológica das amostras coletadas	26
6.6	Avaliação da taxa de redução de lesões.....	27
6.7	Análise estatística	28
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença crônica, de distribuição global, que acomete ovinos e caprinos, onde seu agente etiológico é a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria gram-positiva, não formadora de esporos, intracelular facultativa e capaz de permanecer viável no ambiente por longos períodos (Quinn *et al.*, 2011; Domínguez *et al.*, 2022). A LC pode se apresentar de forma superficial ou visceral em animais infectados, com o aparecimento de abscessos com aspecto caseoso, apresentando infiltração de fagócitos que contém a bactéria em seu centro, progredindo de maneira a debilitar o animal (Williamson, 2001).

A LC está presente em todos os países com grandes criações de ovinos (Pepin e Paton, 2010) e causa grandes prejuízos econômicos na indústria, devido a condenações de carcaças e diminuição na produção, bem como por não existir um tratamento eficaz contra a doença, visto que a antibioticoterapia é ineficaz e não existem vacinas capazes de proporcionar uma imunização completa dos rebanhos (Guimarães *et al.*, 2011), sendo a única forma de manejo, a separação de animais doentes do rebanho. Nesse contexto, torna-se necessário a busca por medidas que ajudem a diminuir o aparecimento da LC nos rebanhos, sendo a imunização a melhor alternativa.

Algumas das principais abordagens para um candidato vacinal contra a LC têm sido os estudos com fatores de virulência. Dentre os principais estudos, a proteína CP40, uma endoglicosidase de 40kDa que está ligada à hidrólise da ligação glicosídica dentro das cadeias de glicanos, tem demonstrado um grande potencial como alvo para vacinas de subunidade recombinante. Diferentes formulações contendo a proteína recombinante CP40 conseguiram fornecer níveis de proteção satisfatórios contra a LC (Droppa-Almeida *et al.*, 2016, 2021), assim demonstrando o potencial protetor da proteína. Contudo, por se tratar de uma vacina de subunidade, é necessário um complemento para que consiga ativar o sistema imune de forma consistente.

Uma vacina que apresenta excelentes propriedades adjuvantes é o BCG, uma cepa vacinal atenuada de *Mycobacterium bovis* utilizada para imunização contra tuberculose e que apresenta proteção heteróloga contra diversas doenças. Além disso, as bactérias do gênero *Mycobacterium* apresentam diversas similaridades com as bactérias do gênero *Corynebacterium* (MCvey; Kennedy; Chengappa, 2016; Covian *et al.*, 2019) o que poderia conferir uma imunização cruzada e ajudar a elevar a imunogenicidade de vacinas recombinantes de subunidade contra a *Corynebacterium*. Alguns estudos utilizando o BCG

em formulações vacinais contra a LC tem demonstrado grande potencial, apresentando bons níveis de proteção contra lesões e indução da resposta imune celular e humoral dos animais vacinados (Selim *et al.*, 2010; Ebeid *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2018; Eshra, 2018).

Diante disso, o objetivo deste trabalho é avaliar a taxa de redução das lesões encontradas em linfonodos e órgãos e descrever os achados de animais vacinados e não-vacinados com a formulação vacinal contendo o *M. bovis* BCG *Pasteur* e a proteína recombinante CP40 de *C. pseudotuberculosis* e desafiados com a cepa virulenta de MIC-6.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Linfadenite caseosa

A Linfadenite Caseosa (LC), conhecida popularmente como “mal do carço”, é uma doença crônica e debilitante, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que afeta principalmente ovinos e caprinos (Sá *et al.*, 2018).

A LC se caracteriza pelo aparecimento de abscessos nos linfonodos e em órgãos de animais infectados, distinguindo-se em duas formas clínicas: interna e externa. Na primeira, os abscessos encontram-se no tecido subcutâneo, alojando-se em linfonodos superficiais, sendo assim, de fácil percepção. Já na segunda forma, os abscessos se encontram em linfonodos internos e órgãos, tais como pulmões, fígado, rins e baço (Abdullah *et al.*, 2017), sendo esta forma mais difícil de ser diagnosticada por não apresentar aspectos clínicos visíveis, e sendo detectada apenas após a morte do animal. Os abscessos, quando maduros, podem se romper facilmente e vazam o material com aspecto caseoso e esverdeado ou esbranquiçado (Williamson, 2001).

2.1.1 Epidemiologia e impacto econômico

A doença está presente em regiões com criações consideráveis de caprinos e ovinos, com distribuição global com relatos na América, Europa, Ásia, África e Oceania (Guimarães *et al.*, 2011). No Brasil, a LC encontra-se disseminada, principalmente na região Nordeste, sendo que, em caprinos, tem uma prevalência de 20,3%, e, em ovinos, 31,2%, sendo os estados do Rio Grande do Norte e Piauí os que mais apresentam rebanhos infectados (Embrapa, 2017).

A LC raramente causa a morte dos animais, porém promove diversas perdas econômicas. A presença de um único abscesso externo pode desvalorizar a pele em até 40% (Figueiredo; Shelton; Pant, 1982), as carcaças são imediatamente condenadas e há redução na produtividade de lã, leite e carne, sendo que as principais consequências da LC. Além de perdas de produção, e a sobrecarga dos custos veterinários com medicamentos corroboram para os prejuízos econômicos na cadeia produtiva de ovinos e caprinos.

2.1.2 Formas de infecção

Animais com sinais clínicos da doença liberam a bactéria no ambiente por secreções nasais, fezes ou a partir de abscessos drenados espontaneamente, enquanto animais sem sinais clínicos podem liberar o patógeno a partir do trato respiratório (O'reilly *et al.*, 2008). A *C.*

pseudotuberculosis pode permanecer viável no ambiente por longos períodos. A bactéria já foi isolada após 5 meses em ambiente que continha o pus de abscessos rompidos, sendo a concentração viável para a bactéria de 10^6 a 10^7 por grama de pus, além disso, o patógeno consegue se manter viável por longos períodos (Guimarães *et al.*, 2011).

A transmissão ocorre por contato das feridas do animal com o pus ou com materiais contaminados utilizados em procedimentos como castração e marcação de orelha (Dorella *et al.*, 2006). Algumas espécies de insetos podem ter a capacidade de transmitir a doença, pois a bactéria já foi isolada de estômago de moscas e fezes de mosquitos, além de poder estar relacionada com a infecção em equinos, por se ter uma alta frequência da doença na espécie em períodos com uma maior população de moscas (Guimarães *et al.*, 2011).

2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da doença pode ser feito de maneira visual, com a presença de abscesso, porém pode ser confundida com outras doenças que também apresentam abscesso em linfonodos, como as doenças oportunistas causadas por *Arcanobacterium pyogenes* e *Pasteurella multocida* (Derksen *et al.*, 2000; Dorella *et al.*, 2006). O diagnóstico definitivo ocorre por isolamento e identificação da *C. pseudotuberculosis* a partir da biópsia ou necrópsia da secreção dos abscessos.

Quando o animal não apresenta sintomas, o diagnóstico pode ser feito a partir de testes sorológicos existentes. Alguns testes utilizados são aglutinação indireta, hemo-aglutinação ou teste de inibição de anti-hemolisina e teste de inibição da hemólise sinérgica (Zaki, 1968; Knight, 1978). O imunoensaio ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é bastante utilizado para detecção do patógeno, sendo o principal para detectar respostas imunes contra o *C. pseudotuberculosis* (Maki *et al.*, 1985; Chirino-Zarraga *et al.*, 2009).

Além disso, existem também testes que vão promover uma reação dérmica, onde se detecta uma resposta mediada por células, como o teste de pele em caprinos feito por Alves e Olander (1999) e o teste utilizando a linfadenina, uma proteína hidrossolúvel usada como alérgeno, por Langenegger *et al.* (1987).

Por existirem primers específicos para amplificação do DNA, a PCR pode ser utilizada para diagnóstico da *C. pseudotuberculosis* a partir do conteúdo purulento dos abscessos, esse método é mais rápido e mais específico que outros métodos convencionais (Çetinkaya, 2002).

O diagnóstico de abscesso interno é difícil de ser realizado, assim, realizam-se os diagnósticos de abscesso pulmonares ou de outros órgãos pela radiografia ou ultrassonografia (Mcvey; Kennedy; Chengappa, 2016). Na radiografia do tórax é possível observar as massas

formadas no parênquima pulmonar e linfonodos, porém ainda é necessário a confirmação através da cultura de lavado traqueal (Pugh, 2004).

2.1.4 Alterações histopatológicas na linfadenite caseosa.

Os linfonodos afetados na forma externa são os linfonodos submandibular, pré-escapular, parotídeo, retrofaríngeo, pré-femoral e poplíteo, sendo os dois primeiros os mais frequentemente acometidos (Sá *et al.*, 2018). Na forma interna, os linfonodos acometidos são os mesentéricos e mediastínicos.

Em ovinos, os abscessos formados pela doença apresentam uma aparência laminada, semelhante a uma configuração de anéis de cebola, quando observados em cortes transversais. O centro é ocupado por bactérias em proliferação e fagócitos, sendo sua periferia composta por camadas de tecido fibroso e de material caseoso (Williamson, 2001). Já em caprinos, os abscessos apresentam uma aparência mais uniforme e consistência pastosa (Brown *et al.*, 1987).

As alterações histopatológicas causadas pelas bactérias em linfonodos de caprinos foram descritas por Jesse *et al.* (2020). Neste trabalho, alterações como hemorragias, congestão, edema, necrose, degeneração e infiltração de células inflamatórias foram encontradas nos linfonodos popliteal, parotídeos, mandibular, mesentérico, pré-escapular, pré-femoral e supra-mamário.

No estudo de Odhah *et al.* (2019), as cabras que foram inoculadas com *C. pseudotuberculosis* apresentaram alterações histopatológicas em diversos órgãos. No pulmão, a bactéria causou alterações como hemorragias, degeneração, infiltração celular inflamatória grave, edema pulmonar e bronquiolite. No fígado, as alterações foram necrose e degeneração dos hepatócitos. Os rins apresentaram hemorragia em capilares glomerulares, infiltração celular inflamatória moderada. O baço exibiu necrose e infiltrado celular inflamatório moderado na polpa branca e na polpa vermelha teve congestão vascular extensa severa.

2.1.5 Tratamento

O tratamento da LC ocorre pela drenagem cirúrgica dos abscessos visíveis, seguido de uma cauterização química por iodo a 10%, durante 10 dias, contudo, esse procedimento pode ocasionar a problemática de contaminação do ambiente com o pus (Dorella *et al.*, 2006), além disso, também não pode ser feita quando o animal apresenta a forma clínica interna, visto que não se consegue ter o acesso aos linfonodos internos e órgãos.

Outro tratamento é a antibioticoterapia, porém é ineficiente, mesmo que a *C. pseudotuberculosis* seja sensível a diversos antibióticos como, por exemplo a penicilina, ampicilina, kanamicina e eritromicina (Gallardo *et al.*, 2019). Isso porque a bactéria apresenta cápsula fibrosa espessa nos granulomas, o que impede o acesso dos antibióticos ao patógeno, tornando assim a terapia ineficaz. No entanto, pode-se fazer uma terapia antimicrobiana sistêmica para se diminuir os riscos de reincidência de abscesso externos e para tratar abscessos internos (Mcvey; Kennedy; Chengappa, 2016).

2.1.6 Controle e medidas profiláticas

O controle da LC ocorre pelo afastamento de animais infectados ou abates de forma a evitar o contato entre doentes e sadios, além de ter rígidas medidas sanitárias, como desinfecção das instalações e de materiais. Outra forma eficaz de controle são as vacinas, que são conhecidas como as medidas profiláticas mais eficientes, porém, no mercado, ainda não existe uma vacina contra LC que seja efetiva e duradoura. As vacinas comercializadas contra a LC apresentam uma proteção parcial, por ainda ter o aparecimento de abscessos. Além disso, a eficiência para ovinos e caprinos é diferente (Ribeiro *et al.*, 2014).

Os modelos de vacinas desenvolvidas ou em desenvolvimento contra a LC são produzidas de toxóides, viva atenuada, subunidade recombinantes e vacinas de DNA (Eggleton *et al.*, 1991; Droppa-Almeida, 2016; Costa *et al.*, 2011, Meyer *et al.*, 2002).

2.2 CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS

2.2.1 Classificação

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria pequena (comprimento de 0,5 micrometros a mais de 3.0 micrômetros), pleomorfa que se apresenta na forma de bacilo, cocos ou clavas, gram-positiva, fermentativa, imóvel e anaeróbia facultativa e intracelular facultativa (Quinn *et al.*, 2011). É um patógeno que infecta ovinos, caprinos, equídeos, humanos, sendo também encontrado em outras espécies como porcos, búfalos e camelos (Oliveira *et al.*, 2014; Terab *et al.*, 2021, Trost *et al.*, 2010).

Essa bactéria apresenta proximidade com bactérias do gênero *Mycobacterium*, *Nocardi*, *Rhodococcus*, formando assim o grupo CMNR, por apresentarem semelhanças como altas quantidades de guaninas e citocinas além de uma parede celular constituída por peptidoglicanos, arabinoglicanos e ácidos micólicos (Mcvey; Kennedy; Chengappa, 2016).

Este patógeno apresenta duas cepas: *C. pseudotuberculosis* ovis, que acomete pequenos ovinos e caprinos, e a *C. pseudotuberculosis* equi, que acomete equinos e bovinos. Além disso, diferente da primeira cepa, a segunda é capaz de reduzir nitrato (Oliveira et al., 2014).

2.2.2 Patogenicidade

A bactéria se dissemina pelo conteúdo presente nos linfonodos rompidos e por secreções nasais e orais. Após entrar no hospedeiro por meio de feridas ou mucosas orais, nasais ou oculares, inicialmente, a *C. pseudotuberculosis* entra nos macrófagos, por meio da fagocitose, se multiplicando dentro dessas células, podendo utilizá-los para sobreviver e crescer ou então evadir todo o sistema imune do hospedeiro a partir do rompimento e morte celular das células infectadas (Guimarães et al., 2011). A bactéria passa então a se disseminar em linfonodos superficiais, pela via linfática, e depois se dissemina em linfonodos torácicos e pulmões.

2.2.3 Fatores de virulência

Microrganismos patógenos produzem moléculas para aumentar a habilidade de invasão de hospedeiros e causar uma doença, essas moléculas são chamadas de fatores de virulência, que podem ser moléculas secretadas, como toxinas e enzimas, ou estruturas de superfície celular, como glicoproteínas e lipopolissacarídeos (Leitão, 2020).

Assim, o isolamento e sequenciamento de diversas linhagens da *C. pseudotuberculosis* permitiu que se compreendesse os mecanismos usados por esse patógeno para invasão de hospedeiros, permitindo também com que aumentasse possíveis alvos para novos tratamentos e prevenção. Um deles foi o sequenciamento do genoma da cepa FR41 isolada de uma garota de 12 anos por Trost et al. (2010), este experimento permitiu associar diversos genes envolvidos com os mecanismos de virulência.

Alguns dos fatores de virulência conhecidos da *C. pseudotuberculosis* são a PLD, CP40, neuraminidase H, óxido nítrico redutase, superóxido dismutase e adesinas spaC (Trost et al., 2010; Corrêa et al., 2018).

A PLD é o principal fator de virulência da *C. pseudotuberculosis*, sendo a primeira a ser descoberta e estudada para uma possível vacina contra a LC. A proteína é uma exotoxina que realiza a hidrólise de esfingomielinas de membranas das células hospedeiras, o que possivelmente contribui para sua disseminação (Mcvey; Kennedy; Chengappa, 2016).

Neuraminidase H está presente na superfície bacteriana e contribui para o conhecimento de ácidos siálicos expostos na superfície das células hospedeiras (Kim et al., 2011). A enzima óxido nítrico redutase está envolvida na detoxificação de óxido nítrico e está envolvida na persistência do patógeno dentro de macrófagos (Luthra; Malik; Ramachandran, 2008). A superóxido dismutase converte ânions superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Marchler-Bauer *et al.*, 2007). A spaC é uma proteína de adesão da *pili* da *C. pseudotuberculosis* (Santana-Jorge *et al.*, 2016) e auxilia no contato do hospedeiro com a bactéria.

Outro fator de virulência importante é a CP40, uma endoglicosidase que está envolvida na hidrólise de ligações dentro das cadeias de glicano. Essa proteína tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de vacinas recombinantes por ter se mostrado capaz de induzir uma resposta imune forte e de proteção contra lesões em animais vacinados contra a linfadenite caseosa (Droppa-Almeida *et al.*, 2016, 2018).

2.3 CP40 RECOMBINANTE

Identificada em 1994, por Walker *et al.* (1994), a proteína de 40kDa encontrada no sobrenadante da cultura, foi classificada como uma serina-protease, uma família de proteases responsáveis por diversos fatores fisiológicos, como a coagulação sanguínea e ativação da resposta imune (Neurath, 1989). No relato de Walker, os animais vacinados com essa protease apresentaram anticorpos contra o antígeno da CP40 assim como proteção e diminuição das lesões em pulmões, com uma proteção de 82% das lesões.

Apesar de ter sido classificada inicialmente como uma serina protease, o estudo de Shadnezhad *et al.* (2016), realizou um alinhamento filogenético a partir da sequência de aminoácidos da CP40, obtendo o agrupamento da proteína como uma endoglicosidase, enzima que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica dentro das cadeias de glicanos, por apresentar semelhanças como um domínio putativo da família glicosídeo hidrolase 18, diferindo apenas de 1 aminoácido com a endoglicosidase EndoS. A atividade da glicosidase foi confirmada ao incubá-la com IgG de alguns animais, o que constatou que a CP40 consegue hidrolisar glicanos de IgG, de forma total em IgG de humanos e equinos e de maneira parcial em ovino.

Droppa-Almeida *et al.* (2018) aplicaram ferramentas da bioinformática para analisar propriedades vacinais da proteína, verificando que ela possuía um perfil não alergênico, por

não apresentar sítios de ligação a IgE. Além disso, apresentava um perfil antigênico e interação com o receptor TRL2, que desempenha função importante na ativação da resposta imune.

A proteína CP40 recombinante teve a adição de um resíduo de histidina endoglicosidase, o que lhe confere algumas vantagens em relação a proteína nativa, como maior facilidade na purificação e isolamento da molécula, assim como a obtenção dela em maior quantidade. Mesmo com essa mudança, as características imunogênicas e bioativas permanecem iguais à proteína original (Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

A imunização de camundongos utilizando a rCP40 com os adjuvantes saponinas e o Adjuvante Completo de Freund realizada por Droppa-Almeida *et al.* (2016) promoveu significativas quantidades de anticorpos com estímulo Th1 e Th2 contra o antígeno da proteína, assim como uma proteção de 100% contra lesões.

Droppa-Almeida *et al.* (2021), testaram, em modelo murino, peptídeos derivados da CP40, obtendo uma proteção variando de 10 a 40%. Enquanto Barral *et al.* (2022) testaram a fusão das proteínas recombinantes da CP40 e da PLD juntamente com uma proteína de ligação a maltose e a saponina como o adjuvante, obtiveram uma proteção parcial contra lesões nos órgãos e uma sobrevivência de 57,14% após o desafio com a cepa, enquanto o grupo de animais testados apenas com rCP40 e rPLD obtiveram 42,86%.

Nesse sentido, a proteína rCP40 tem grande potencial imunogênico para uma vacina contra a LC, porém ela por si só não é suficiente para ativar a resposta imune de maneira eficiente, necessitando de um adjuvante para o aumento da imunogenicidade, por tratar-se de uma proteína recombinante purificada.

2.4 *M. bovis* BCG Pasteur

BCG é uma vacina atenuada contra *Mycobacterium bovis*, sendo a única e mais eficaz contra esse agente. Essa vacina, além de proteger contra tuberculose, também tem a propriedade de fazer uma proteção cruzada inespecífica contra outros patógenos e pode ser usada como um vetor de expressão para antígenos recombinantes (Covian *et al.*, 2019). Essa proteção cruzada é ligada à influência de “imunidade treinada”, que é quando o sistema imune inato desencadeia respostas mais eficientes quando em contato com um patógeno pela segunda vez (Netea; Quintin; Van Der Meer, 2011), isso porque a BCG consegue induzir mudanças epigenéticas no sistema imune, o que pode aumentar ou inibir respostas quando o

indivíduo for exposto a outros patógenos não relacionados (Netea e Van Der Meer, 2017). Além disso, os componentes da BCG conseguem envolver receptores Toll-like TLR2, TLR4 e TLR8 (Heldwein *et al.*, 2003; Dowling *et al.*, 2017), por isso sua característica “autoadjuvante”.

Além disso, o uso do BCG associado a vacinas recombinantes tem sido bastante promissor, visto que é de baixo custo e consegue ativar a resposta imune inata e adaptativa, assim como também ativa a resposta imune Th1 (Dockrell; Smith, 2017). O objetivo de um adjuvante é aumentar a resposta imune de uma vacina, de maneira que essa resposta seja duradoura. As vacinas de subunidade geralmente precisam de adjuvantes para serem eficazes, o que aumenta a amplitude e durabilidade da resposta alcançável, visto que sozinhas, essas vacinas não ativam o sistema imune eficientemente. (Petrovisky; Aguilar, 2004; Pasquale *et al.*, 2015).

Em estudos feitos com BCG em combinação com a PLD mutante recombinante, a proteção contra a doença chegou a 66% (Selim *et al.*, 2010). Em outro estudo utilizando a BCG antes da vacinação de ovinos com toxóide da PLD e o adjuvante Montanide ISA 206, observou-se que o seu uso pode ajudar a melhorar os níveis da resposta imune contra o patógeno (Ebeid *et al.*, 2011). Além de aumentar os níveis da imunidade contra a doença, o uso da BCG também pode otimizar o desempenho da produção dos rebanhos em ovinos e caprinos, como o aumento na produção de leite (Osman *et al.*, 2016).

Em um trabalho desenvolvido utilizando a BCG recombinante como vetor para a proteína PLD, observou-se que se teve uma sobrevivência de 77% dos camundongos desafiados, enquanto esse vetor em conjunto com a PLD recombinante alcançou sobrevivência de 88% (Leal *et al.*, 2018). Assim demonstrando que o uso da *M. bovis* BCG *Pasteur* pode auxiliar formulações vacinais contra LC.

3. HIPÓTESES

Ovinos vacinados com a formulação contendo *M. bovis* BCG *pasteur* e a proteína recombinante CP40 apresentam um número significativamente menor de lesões histológicas e macroscópicas em diferentes órgãos internos e linfonodos em relação aos ovinos não-vacinados, após a realização do desafio com cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, MIC-6.

4. JUSTIFICATIVA

A vacinação é o melhor método existente de profilaxia contra doenças e, devido à falta de uma vacina que seja eficiente contra o aparecimento de lesões causadas pela linfadenite caseosa, é necessário a procura de formulações vacinais que possam proteger animais contra o patógeno. A proteína recombinante CP40 tem demonstrado um grande potencial para induzir respostas imunes e proteção contra lesões características da linfadenite caseosa, assim como, o BCG também tem sido um ótimo candidato pelas similaridades filogenéticas com o *C. pseudotuberculosis* e suas propriedades adjuvantes. Para averiguar a eficiência de uma vacina, se faz necessário o uso de técnicas de histopatologia, visto que investigação histopatológica é importante para observar se a vacina é capaz de proteger animais vacinados contra o aparecimento das lesões. Desse modo, é importante investigar o potencial protetor da formulação vacinal contendo rCP40 associada ao BCG contra a formação de abscessos causados pela *C. pseudotuberculosis*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Descrever os achados anatomopatológicos de linfonodos e órgãos de ovinos vacinados e não-vacinados com a formulação vacinal contendo o *M. bovis* BCG *pasteur* e a proteína recombinante CP40 de *C. pseudotuberculosis*, após desafio com a cepa virulenta de MIC-6.

5.2 Objetivos específicos

- Produzir a formulação vacinal contendo a proteína rCP40 e *M. bovis* BCG *pasteur*;
- Imunizar os ovinos com a formulação vacinal contendo rCP40 e *M. bovis* BCG *pasteur*;
- Desafiar os animais com a cepa MIC-6 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*;
- Analisar histologicamente amostras dos linfonodos e órgãos dos ovinos;
- Descrever e analisar as alterações morfológicas encontradas em ovinos vacinados e não-vacinados após desafio.

6. MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Vacinologia e Imunologia Aplicada (LAVIA), que faz parte do grupo de laboratórios do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), localizado no prédio Biomédicas I do CCBS, no Campus Leste da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA).

6.1 Cultivo da *C. pseudotuberculosis*, *M. bovis* BCG e *E. coli*

A cepa de *C. pseudotuberculosis* (MIC6) foi cultivada em meio *Brain Heart Infusion Broth* (caldo BHI) ou BHI-Ágar a 37 °C por 48 h em shaker orbital a 130 rpm ou estufa bacteriológica a 37 °C por aproximadamente 16 h. *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur foi cultivada em meio 7H9 suplementado (Leal *et al.*, 2018), em estufa bacteriológica a 37 °C, durante 96 h. O cultivo da cepa de *E. coli* transformada foi feito em meio Luria-Bertani (LB) líquido ou LB-ágar acrescido de ampicilina (na concentração de 50 mg/mL e proporção antibiótico:meio de 1:1000) em shaker orbital a 130 rpm ou estufa bacteriológica a 37 °C por aproximadamente 16h.

6.2 Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante CP40

O gene CP40 foi previamente clonado no vetor pAE (Ramos *et al.*, 2004) e caracterizado, resultando no plasmídeo recombinante pAE/cp40. Esse plasmídeo foi inserido no vetor de expressão *E. coli* BL21 Star e a indução foi realizada com 1mM de IPTG. A confirmação da expressão foi feita através de Western Blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6X-His conjugado com peroxidase (Sigma).

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel em coluna de sepharose (HisTrap). A pureza da mesma foi determinada através de SDS-PAGE e a concentração proteica pelo kit BCA (Pierce).

6.3 Aspectos éticos e animais experimentais

Foram utilizados 12 ovinos nativos, machos, entre 4 e 6 meses de idade, provenientes de rebanhos sem LC clínica, previamente submetidos à uma pesquisa de IgG específica para *C. pseudotuberculosis* através de ELISA indireto com o sobrenadante de cultivo da cepa MIC 6, e somente os animais não reagentes no ELISA foram incluídos no experimento. Os animais passaram por vermifugação com Albendazol e foram mantidos em quarentena por 30 dias nos piquetes para ruminantes do Núcleo de Ensino e Pesquisa em Pequenos Ruminantes (NEPPER) da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) antes do início do

experimento. A observação clínica dos animais foi realizada durante esse período. Os ovinos foram alimentados com feno, concentrado, suplementação mineral e água *ab libitum*.

Todos os procedimentos experimentais realizados com os animais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>). Esse projeto foi aprovado na Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFERSA sob parecer número 014/2022.

6.4 Imunização dos animais e desafio

Os ovinos foram divididos em 2 grupos: grupo controle (G1) e grupo 2 (G2), cada um com 6 animais. O G1 recebeu uma dose de 1 mL solução salina a 0,9% e o G2 foi imunizado com 200 µg/dose de rCP40 (Rodrigues *et al.*, 2021), e 10⁶ UFC de *M. bovis* BCG Pasteur em um volume final de 1 mL (González-Sánchez *et al.*, 2018). A imunização deu-se por via subcutânea com 2 doses de vacina intervaladas por 21 dias. Trinta dias após a última imunização, todos os animais foram desafiados utilizando 1 mL contendo 10⁵ UFC da cepa virulenta MIC6 de *C. pseudotuberculosis*.

6.5 Necropsia e avaliação histopatológica das amostras coletadas

Doze semanas após o desafio, os animais foram eutanasiados, através do aprofundamento do plano anestésico com propofol, e necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária da UFERSA, e então submetidos a um completo exame anatomopatológico. Os principais órgãos que podem ser acometidas pela LC (como pulmões, fígado, rins e baço), os linfonodos superficiais e os internos foram examinados em busca de granulomas e amostras de cada órgão foram colhidas para a realização de exames bacteriológicos e preparo de lâminas histológicas. Os tecidos foram coletados em frascos estéreis e fixados com MDF, e após 48h, embebidos em álcool 70%.

Para o processamento histológico, os tecidos passaram por uma desidratação por banhos de 45 minutos em concentrações crescentes de álcool (80%, 90%, e 100%), sendo o último banho, metade álcool 100% e metade xilol. Após essa etapa, foi feita a diafanização, onde os tecidos passaram por 2 banhos de 15 minutos de xilol. Por fim, os tecidos passaram por inclusão em parafina, onde foi feito 3 banhos de parafina por 45 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram embebidos em parafina para a confecção de blocos.

Para preparação das lâminas histológicas, os blocos confeccionados passaram por cortes entre 3 e 5 µm, por um micrótomo, e então corados, com hematoxilina-eosina.

Microscopicamente, as amostras foram analisadas quanto à presença de bactérias, necrose e/ou infiltrados inflamatórios.

6.6 Avaliação da taxa de redução de lesões

Para calcular a taxa de redução de lesões foram adotados scores baseados na extensão da lesão de cada achado avaliado (linfonodos pré-escapular, parotídeo, mesentérico e poplíteo e os órgãos rins, pulmões, fígado e baço).

Escore	Características morfológicas que serão adotadas como critérios conforme escore para os linfonodos	
	Dados macroscópicos	Dados microscópicos
0/3	linfonodos normais ou um pouco aumentados	linfonodos normais
1/3	linfonodos aumentados	linfonodos com hiperplasia folicular do tecido linfoide
2/3	linfonodos aumentados com hemorragia ou congestão	linfonodos com áreas com hemorragia ou congestão
3/3	linfonodos aumentados com necrose ou abscessos	linfonodos com necrose ou abscessos ou infiltrados de células inflamatórias
Escore	Características microscópicas que serão adotadas como critérios conforme escore para os pulmões	
0/2	pulmões normais	
1/2	pulmões com pneumonia intersticial moderada	
2/2	pulmões com pneumonia intersticial moderada e congestão	

Para o cálculo de escores da pontuação máxima de cada grupo de linfonodo, foi feito da seguinte forma:

- Pontuação máxima para cada linfonodo = 03
- Pontuação máxima para cada animal = $7 \times 3 = 21$
- Pontuação máxima para cada grupo = $6 \times 21 = 126$

6.7 Análise estatística

Para análise estatística, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software, San Diego, CA), onde os dados foram transformados em escores e analisados primeiramente quanto a sua normalidade, onde constatou-se que os dados eram anormais e não paramétricos. Logo, foi aplicado o teste de Mann-Whitney, sendo valor de $p < 0,05$ para diferença estatística significativa.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A LC está presente nos países com grandes criações de ovinos e caprinos (Pepin e Paton, 2010), e é associada à formação de piogranulomas que desenvolvem-se em abscessos (Valli e Parry, 1993; Baird e Fontaine, 2008), que podem desenvolver-se nos linfonodos superficiais, caracterizando a forma clínica superficial ou externa da doença, como também desenvolver-se nas vísceras e linfonodos internos, caracterizando a forma clínica visceral ou interna (Dorella *et al.*, 2006). No presente estudo, apenas os linfonodos apresentaram abscessos característicos da LC, como mostra a Figura 1, onde o linfonodo apresenta um material caseoso de coloração amarelo-esverdeado envolto em cápsula fibrosa, sendo compatível com a descrição das lesões dos granulomas por diversos autores (Williamson, 2001; Al-Gaabary *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012). Os abscessos mais externos, quando maduros, podem romper-se liberando o material purulento e a bactéria, tornando-se uma fonte de contaminação para o ambiente e para outros animais não infectados (Guimarães *et al.*, 2011).

Figura 1 - Abscesso encontrado no linfonodo parotídeo de um animal do G1 (controle).



Fonte: Autoria própria.

Além do aparecimento de abscessos, as lesões devido à infecção com a *C. pseudotuberculosis* também variam entre hemorragia, necrose, infiltração de células e congestão (Jesse *et al.*, 2020). O exame anatomopatológico permitiu encontrar as alterações nos linfonodos dos grupos, como mostra os Quadros 1 e 2.

Quadro 1 - Dados das lesões macroscópicas dos linfonodos dos animais dos grupos experimentais. "D" significa direito; "E" significa esquerdo. “*” significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Categorias dos escores: Categoria 0: Linfonodo normal ou ligeiramente aumentado - Escore (0/3); Categoria 1: Linfonodo aumentado - Escore (1/3); Categoria 2: Linfonodo aumentado e hemorrágico ou congestionado - Escore (2/3); Categoria 3: Linfonodo aumentado com necrose focal, abscessos ou caseação - Escore (3/3).

Lesões nos linfonodos											
Grupo de ovinos	Animal	Pré-escapular		Parotídeo		Poplíteo		Mes entérico	Escore total de cada grupo	% de lesões induzidas *	Lesões Relativamente Reduzidas (%)
		D	E	D	E	D	E				
G1 (solução salina)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	+ (1/3)	36/126	28,6	41,67
	A2	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)			
	A3	++ (2/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A4	++ (2/3)	+ (1/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A5	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A6	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)			
G2 (rCP40 + BCG)	A1	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	21/126	16,6*	
	A2	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	+ (1/3)			
	A3	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A4	++ (2/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)			
	A5	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)			
	A6	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			

Fonte: Autoria própria.

Quadro 2 - Dados das lesões microscópicas dos linfonodos dos animais dos grupos experimentais. "D" significa direito; "E" significa esquerdo "*" significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Categorias dos escores: Categoria 0: Linfonodo normal - Escore (0/3); Categoria 1: Linfonodo com presença de hiperplasia linfóide folicular - Escore (1/3); Categoria 2: Linfonodo com presença de áreas hemorrágicas ou congestionadas - Escore (2/3); Categoria 3: Linfonodo com presença de abscesso capsulado, células necróticas e infiltrado - Escore (3/3).

Lesões nos linfonodos											
Grupo de ovinos	Animal	Pré-escapular		Parotídeo		Poplíteo		Mes enté rico	Escore total de cada grupo	% de lesões induzidas *	Lesões Relativamente Reduzidas (%)
		D	E	D	E	D	E				
G1 (solução salina)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	32/126	25,4	31,25
	A2	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)			
	A3	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A4	++ (2/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A5	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A6	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)			
G2 (rCP40 + BCG)	A1	++ (2/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)	22/126	17,5*	
	A2	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)			
	A3	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	+ (1/3)			
	A4	++ (2/3)	+ (1/3)	+ (1/3)	- (0/3)	+ (1/3)	- (0/3)	++ (2/3)			
	A5	- (0/3)	+++ (3/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	+++ (3/3)	+ (1/3)			
	A6	+ (1/3)	- (0/3)	+ (1/3)	- (0/3)	+ (1/3)	- (0/3)	- (0/3)			

Fonte: Autoria própria.

No grupo controle, o linfonodo pré-escapular, seguido do parotídeo foram os linfonodos que mais apresentaram lesões, resultado semelhante a Souza *et al.* (2011) e Smith e Sherman (1994). As lesões desses dois linfonodos juntos correspondem a 78% das lesões encontradas no grupo controle e 58% das lesões no grupo vacinado. Por meio dos escores,

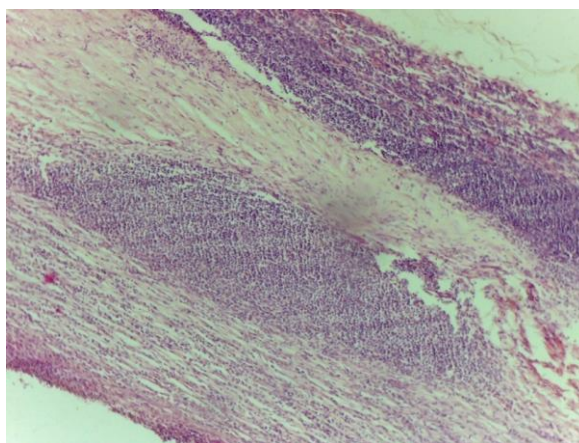
feitos a partir da gravidade das lesões, foi possível organizar as lesões em categorias e calcular a taxa de indução das lesões.

Em relação às lesões macroscópicas dos linfonodos, o grupo vacinado obteve um índice de 0,166 contra 0,286 do grupo controle. Na análise geral dos linfonodos, observou-se um índice de indução de lesões de 0,175 para o grupo vacinado com a formulação rCP40 + *M. bovis* BCG *Pasteur* contra 0,254 do grupo controle. Esses dados representam uma redução relativa de lesões ($P < 0,05$) de 41,67 % das lesões macroscópicas e de 31,25 % das lesões histológicas. A diferença estatística foi comprovada através do teste de Mann-Whitney.

Na análise macroscópica dos linfonodos, as alterações encontradas no G1, foram hiperplasias, coloração alterada, hemorragias, necroses e abscessos, enquanto no G2, as principais alterações encontradas foram a hiperplasia linfoide folicular, alterações na coloração, e um linfonodo apresentando um abscesso. Essas alterações presentes no grupo controle são características da LC e são encontradas por diferentes autores (Selim *et al.*, 2010; Mahmood *et al.*, 2015; Jesse *et al.*, 2020).

Na análise microscópica, no grupo controle, foram encontradas alterações como hemorragia, congestão, necrose, além da confirmação da formação do abscesso. A verificação do abscesso foi possível a partir da visualização da cápsula e do material constituído por neutrófilos, restos celulares degenerados, fibrina e presença de material amorfo eosinofílico, envoltos pela cápsula (Figura 2).

Figura 2 - Cápsula de tecido conjuntivo fibroso de abscesso característico da linfadenite caseosa, HE x 100.

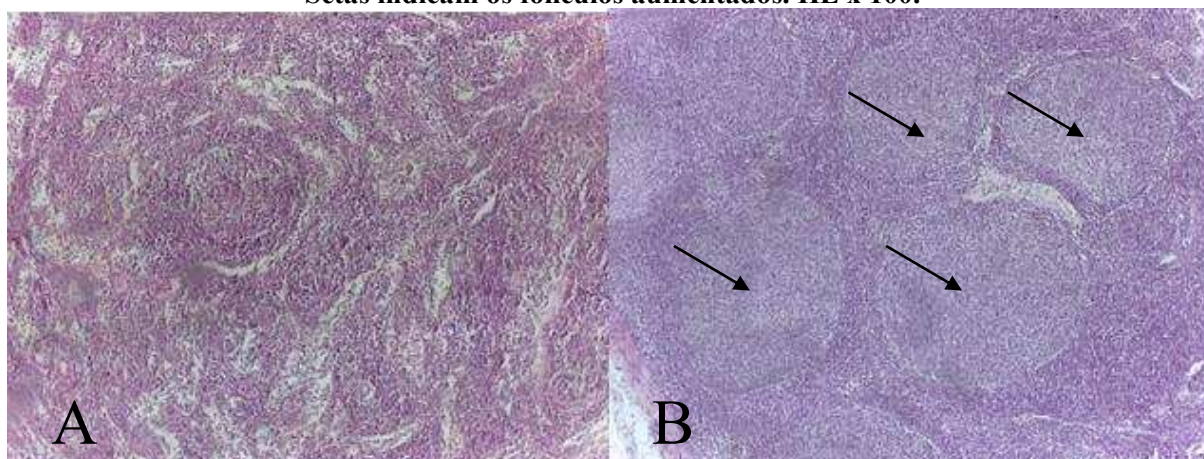


Fonte: Autoria própria.

A principal alteração encontrada no grupo vacinado foi a hiperplasia do tecido linfoide (Figura 3), evidenciada pelo aumento do número e tamanho dos folículos linfoides, além da presença de centro germinativo proeminente. Esse aumento dos folículos pode estar

relacionado com a estimulação antigênica desses linfonodos, visto que essa alteração é uma resposta comum após um estímulo antigênico inicial e é causada quando algum estímulo envolve a ativação de respostas imunes humorais (Fry e Gavin, 2013; Kumar; Aster; Abbas, 2016).

Figura 3 – Histologia dos linfonodos. A – linfonodo normal; B – Linfonodo apresentando hiperplasia do tecido linfoide encontrado no linfonodo de um animal do G2 (rCP40 + BCG). Setas indicam os folículos aumentados. HE x 100.



Fonte: Autoria própria.

Quanto ao exame anatomopatológico dos órgãos, não se observou nenhuma lesão macroscópica em nenhum dos grupos, por isso, a análise estatística macroscópica não foi realizada nos órgãos. A única alteração encontrada foi em um baço de um animal do grupo vacinado, onde foi possível observar um aumento do órgão quando comparado ao baço dos outros animais, como observado na Figura 4.

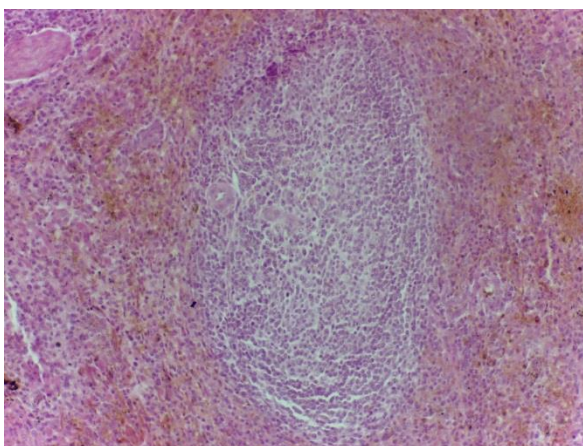
Figura 4 - À esquerda, baço de um animal do grupo G2 (rCP40 + BCG) apresentando um aumento considerável em relação ao baço de animal do mesmo grupo, à direita.



Fonte: Autoria própria.

Na análise histológica desse órgão, foi observado que alguns animais do G2 apresentaram o baço com hiperplasia da polpa branca, como mostra a Figura 5, evidenciada pelo aumento do tamanho dos centros germinativos e aumento da densidade das células do centro germinativo, o que poderia estar ligada à estimulação do sistema imune visto que este órgão é importante para a resposta imune do indivíduo e produção de anticorpos (Leung *et al.*, 1972). A polpa branca apresenta células importantes para indução das respostas imunes adaptativas (Male *et al.*, 2014). Assim, o aumento desses folículos pode estar relacionado ao aumento dessas células e consequente produção de anticorpos contra a LC.

Figura 5 - Hiperplasia da polpa branca de baço do ovino do G2 (rCP40 + BCG). HE x 200.



Fonte: Autoria própria.

Já para os achados microscópicos dos órgãos, o único órgão que apresentou alguma alteração foram os pulmões do grupo controle, sendo as principais alterações pulmonares a pneumonia intersticial moderada e a congestão vascular que apareceram em 66% dos animais do grupo vacinado com solução salina, como mostra o Quadro 3.

Quadro 3 - Dados das lesões microscópicas dos pulmões dos animais dos grupos experimentais. "D" significa direito; "E" significa esquerdo. Letras diferentes significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Categorias dos escores: Categoria 0: Pulmão normal - Escore (0/2); Categoria 1: Pneumonia intersticial moderada - Escore (1/2); Categoria 2: Pneumonia intersticial moderada e congestão - Escore (2/2).

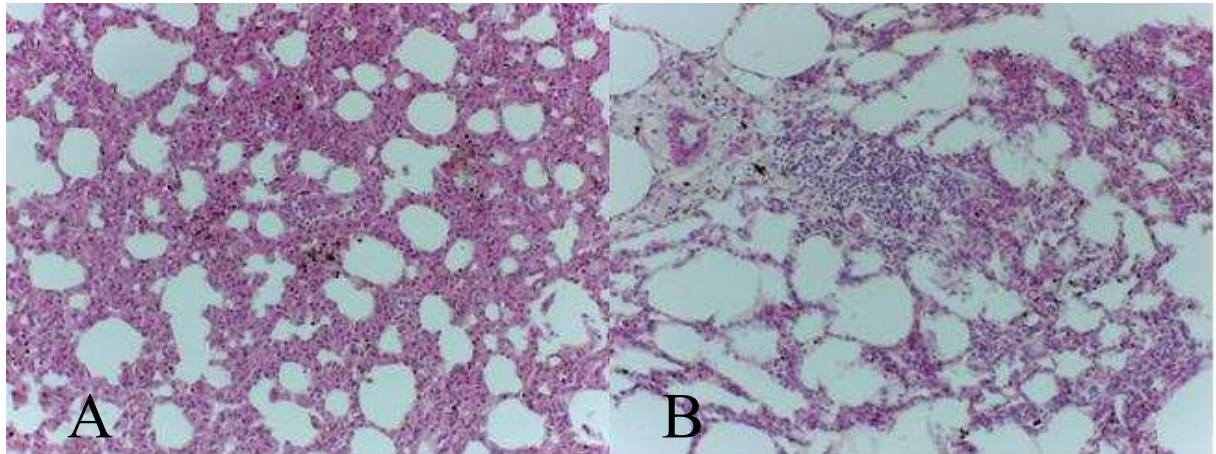
Grupo de ovinos	Animal	Pulmões		Escore total de cada grupo	% de lesões induzidas *	Lesões Relativamente Reduzidas (%)
		D	E			
G1 (solução salina)	A1	+	+	12/24	50%	0 (a)
		(1/2)	(1/2)			
	A2	+	+			
		(1/2)	(1/2)			
	A3	++	++			
		(2/2)	(2/2)			
	A4	++	++			
		(2/2)	(2/2)			
	A5	-	-			
		(0/2)	(0/2)			
	A6	-	-			
		(0/2)	(0/2)			
G2 (rCP40 + BCG)	A1	-	-	0/24	0%	100 (b)
		(0/2)	(0/2)			
	A2	-	-			
		(0/2)	(0/2)			
	A3	-	-			
		(0/2)	(0/2)			
	A4	-	-			
		(0/2)	(0/2)			
	A5	-	-			
		(0/2)	(0/2)			
	A6	-	-			
		(0/2)	(0/2)			

Fonte: Autoria própria

Na Figura 6, é possível verificar microscopicamente a pneumonia encontrada, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório misto, constituído de macrófagos, linfócitos, plasmócitos nos septos interalveolares, parede dos alvéolos e bronquíolos.

Dentro das vísceras, os pulmões são os órgãos mais frequentemente afetados em animais infectados pela *C. pseudotuberculosis* (Baird e Fontaine, 2008), sendo a pneumonia e congestão vascular as lesões que são encontradas após a infecção (Singh *et al.*, 2017).

Figura 6 – Histologia do pulmão. A – Pulmão normal; B – Pulmão apresentando pneumonia intersticial moderada encontrada no pulmão de um ovino do G1 (solução salina). HE x 100.



Fonte: Autoria própria.

Assim, foi possível observar uma redução significativa de 100 % das lesões histopatológicas pulmonares, denotando que a formulação vacinal exerce uma proteção contra lesões nos pulmões. A proteção desse órgão é importante porque animais que apresentam lesões pulmonares são considerados fontes de nova infecção para animais não infectados (Windsor, 2011).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que a formulação rCP40 + *M. bovis* BCG *Pasteur* conseguiu reduzir lesões anatomopatológicas em relação ao grupo controle em nível macroscópico e microscópico nos pulmões e linfonodos. Apesar da redução significativa, a vacinação não conseguiu impedir a formação de lesões, indicando uma proteção parcial, o que pode estar relacionado a uma indução insuficiente da resposta imune. Estudos futuros para a caracterização das respostas imunes humoral e celular devem ser realizados na tentativa de explicar melhor tais resultados. E assim, trazer perspectivas que possam abrir caminhos diferentes de imunomodulação e potencialização da resposta induzida por esta vacina experimental.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, J. F. F.; et al. Clinical case of caseous lymphadenitis in a goat: case management. **Malaysian Journal of Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 31-35, 2017.
- ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. John. Skin test of goats vaccinated and infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1313-1318, 1999.
- ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R. Controle da Linfadenite Caseosa pela aplicação de solução de formol no abscesso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.25, n.3, p.130-132, 2003.
- AL-GAABARY, Magdy H. et al. Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. **Small Ruminant Research**, v. 94, n. 1-3, p. 117-124, 2010.
- 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, 2007.
- BARRAL, T. D.; KALIL, M. A.; MARIUTTI, R. B.; et al. Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 106 , p. 8035–8051, 2022.
- BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES, S. F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil, **Canadian of Journal Veterinary Research**, v. 51, p. 46–49, 1987.
- BROWN, C. C.; OLANDER, H. J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. **Veterinary Bulletin** , v. 57, n. 1, 1987.
- ÇETINKAYA, B.; et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary of Microbiology**, v. 88, p. 75-83, 2002.
- CHIRINO-ZÁRRAGA, C. et al. Diagnosis of caseous lymphadenitis by ELISA in naturally infected goats from Venezuela. **Journal of Small Ruminant Research**, v.87, n.1, p.92-95, 2009.
- CORRÊA, J. I.; et al. In vivo and in vitro expression of five genes involved in *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

COSTA, M. P.; et al. 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. 1-10, 2011.

COVIÁN, C.; et al. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2806, 2019.

DERCKSEN, D.P.; et al. A comparison of four serological test for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary of Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 167-175, 2000

DE SÁ, M. C. A.; et al. Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: Revisão. **Pubvet**, v. 12, p. 133, 2018.

DOCKRELL, H. M.; SMITH, S. G. What have we learnt about BCG vaccination in the last 20 years? *Front Immunol*. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1134, 2017.

DORELLA, F.A.; et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary. Research**, v. 37, n. 2, p. 201–218, mar. 2006.

DOWLING, D. J.; et al. Toll-like receptor 8 agonist nanoparticles mimic immunomodulating effects of the live BCG vaccine and enhance neonatal innate and adaptive immune responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 5, p. 1339-1350, 2017.

DROPPA-ALMEIDA, D.; et al. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, n. 8, p. 1091-1096, 2016.

DROPPA-ALMEIDA; FRANCESCHI; PADILHA. Immune-Informatic Analysis and Design of Peptide Vaccine From Multi-epitopes Against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 12, p. 117793221875533, 2018.

DROPPA-ALMEIDA, D.; et al. Peptide vaccines designed with the aid of immunoinformatic against Caseous Lymphadenitis promotes humoral and cellular response induction in mice. **Plos one**, v. 16, n. 11, p. e0256864, 2021.

EBEID, M. H.; et al. Trials of preparation and evaluation of *corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines in sheep. **Benha Veterinary Medical Journal**, V. 22, n. 2, p. 104-117, 2011.

EGGLETON, D. G.; et al. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian veterinary journal**, v. 68, n. 10, p. 317-319, 1991.

EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. Linfadenite Caseosa (LC). Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/zoossanitario-linfadenite>. Acesso em: 13.fev.2023.

ESHRA, M. A.; et al. A Trial for Vaccination of Sheep against Caseous Lymphadenitis Using Oil Adjuvant Bacterin Enhanced by *Bacillus Calmette-Guerin* Vaccine. **Alexandria Journal for Veterinary Sciences**, v. 57, n. 1, 2018.

FIGUEIREDO, E. A. P.; SHELTON, M.; PANT, K. P. Goats skins. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, Tucson. Proceedings Scottsdale: Dairy Goat Journal, v.3, p. 488-490, 1982.

FRY, M. M.; MCGAVIN, M. D. Medula óssea, células sanguíneas e sistema linfático. **Bases da Patologia Veterinária. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier**, p. 802-803, 2009.

GALLARDO, A. A.; et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis: evaluación de la sensibilidad antibiótica in vitro. **Revista argentina de microbiología**, v. 51, n. 4, p. 334-338, 2019.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. **Effect of adjuvant and antigen dose**. Plos ONE. 13 (3): e0193118, 2018.

GUIMARÃES, A. S.; et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **HIOAB J**, v. 2, n. 11, 2011.

HELDWEIN, K. A.; et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, n. 2, p. 277-286, 2003.

JESSE, F. F. A.; et al. Responses of female reproductive hormones and histopathology in the reproductive organs and associated lymph nodes of Boer does challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic corynomycolic acid extract. **Microbial pathogenesis**, v. 139, p. 103852, 2020.

KIM, S. et al. Features and applications of bacterial sialidases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, p. 1-15, 2011.

KNIGHT, H. D. A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **The Cornell Veterinarian**, v. 68, n. 2, p. 220-237, 1978.

KUMAR, Jyoti et al. Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in Sirohi goats of Rajasthan, India. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 1319-1322, 2012.

KUMAR, Vinay; ASTER, Jon C.; ABBAS, Abul K.. Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças. 9 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021, 1421 p.

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; COSTA, S. G. Alérgeno para o Diagnóstico da Linfadenite Caseosa em Caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, p. 27-32. 1987

LEAL, K. S.; et al. Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. **Vaccine**, v. 36, n. 25, p. 3578-3583, 2018.

LEITÃO, J. H.; Microbial virulence factors. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 15, p. 5320, 2020.

LUTHRA, A.; MALIK, S. S.; RAMACHANDRAN, R. Cloning, purification and comparative structural analysis of two hypothetical proteins from *Mycobacterium tuberculosis* found in the human granuloma during persistence and highly up-regulated under carbon-starvation conditions. **Protein expression and purification**, v. 62, n. 1, p. 64-74, 2008.

MAHMOOD, Z. K. et al. Clinio-Pathological Changes in Goats Challenged with *Corynebacterium Pseudotuberculosis* and its Exotoxin (PLD). **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, 10(3), 112-132. 2015.

MAKI, L. R.; et al. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep, using an enzyme-linked immunosorbent assay. **American journal of veterinary research**, v. 46, n. 1, p. 212-214, 1985.

MARCHLER-BAUER, A.; et al. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_1, p. D237-D240, 2007.

MEYER, R.; et al. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.

MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. Microbiologia veterinaria . 3ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koong. 2016.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. Corynebacterium pseudotuberculosis infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. **Australian Veterinary Journal**, n. 50, p. 537-542, 1974

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P.; MCQUADE, N. C. The control of caseous lymphadenitis in sheep by vaccination [Corynebacterium pseudotuberculosis]. In: **Proceedings of the Australian Veterinary Association (Australia)**. Australian Veterinary Association, 1977.

NETEA, M. G.; VAN DER MEER, J. W. Trained immunity: an ancient way of remembering. **Cell Host & Microbe** v. 21, n. 3, p. 297-300, 2017

NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J.W. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 5, p. 355-361, 2011

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 7, p. 268-271, 1989.

ODHAH, M. N.; et al. Clinico-pathological responses and PCR detection of Corynebacterium pseudotuberculosis and its immunogenic mycolic acid extract in the vital organs of goats. **Microbial pathogenesis**, v. 135, p. 103628, 2019.

O'REILLY, K. M.; et al. Parameter estimation and simulations of a mathematical model of Corynebacterium pseudotuberculosis transmission in sheep. **Preventive veterinary medicine**, v. 83, n. 3-4, p. 242-259, 2008.

OLIVEIRA, M.; et al. First report of Corynebacterium pseudotuberculosis from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (Sus scrofa domesticus). **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2014.

OSMAN, A. O.; et al. Studies on relation between pseudotuberculosis and productive performance of sheep and goats. **Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences**, v. 11, n. 3, p. 76-87, 2016.

DI PASQUALE, A.; et al. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. **Vaccines**, v. 3, n. 2, p. 320-343, 2015.

PÉPIN M., PATON M. Linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. *Doenças Infecciosas e Parasitárias da Pecuária*. 1ª edição. Lavoisier; Paris, França: 2010.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunology and cell biology**, v. 82, n. 5, p. 488-496, 2004.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2004, p.141.

QUINN, P. J.; et al. **Veterinary microbiology and microbial disease**. Wolfe, USA.: John Wiley & Sons., 2011

RIBEIRO, D.; et al. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary research**, v. 45, p. 1-6, 2014.

RODRIGUES; F. et al. Evaluation of the expression and immunogenicity of four versions of recombinant *Clostridium perfringens* beta toxin designed by bioinformatics tools. **Anaerobe**. 69. p. 102326, 2021

SANTANA-JORGE, K. T. O.; et al. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microbial cell factories**, v. 15, p. 1-13, 2016.

SELIM, S. A.; GHONEIM, M. E.; MOHAMED, K. F. Vaccinal efficacy of genetically inactivated phospholipase D against caseous lymphadenitis in small ruminants. **Int J Microbiol Res**, v. 1, n. 3, p. 129-136, 2010.

SINGH, Rahul et al. Spontaneously occurring lung lesions in sheep and goats. **Indian Journal of Veterinary Pathology** : 18- 24, 2017.

SHADNEZHAD, A.; NAEGELI, A.; COLLIN, M. CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -N-acetylglucosaminidase. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, 2016.

SOUZA, M. de F. et al. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 224-230, 2011.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. Subcutaneous swellings. In: *Goat Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, p.46-49, 1994.

TERAB, A. M. A.; et al. Pathology, bacteriology and molecular studies on caseous lymphadenitis in *Camelus dromedarius* in the Emirate of Abu Dhabi, UAE, 2015-2020. **Plos one**, v. 16, n. 6, p. e0252893, 2021.

TROST, E.; et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. **BMC genomics**, v. 11, p. 1-17, 2010.

VON HEIJNE, G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. **European journal of biochemistry**, v. 133, n. 1, p. 17-21, 1983.

VON HEIJNE, G. Signal sequences: the limits of variation. **Journal of molecular biology**, v. 184, n. 1, p. 99-105, 1985.

WALKER, J.; et al. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and immunity**, v. 62, n. 6, p. 2562-2567, 1994.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359-371, 2001.

WILSON, M. J.; BRANDON, M. R.; WALKER, John. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and immunity**, v. 63, n. 1, p. 206-211, 1995.

ZAKI, M. M. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. **Research in Veterinary Science**, v. 9, n. 6, p. 489-493, 1968.