



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

CARLOS DANIEL SEQUEIRA ESPINOZA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SEGURANÇA EM UMA VACINA RECOMBINANTE
CONTRA A LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS**

MOSSORÓ

2023

CARLOS DANIEL SEQUEIRA ESPINOZA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SEGURANÇA EM UMA VACINA RECOMBINANTE
CONTRA A LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade e Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista

Coorientador: 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 tomar-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.

S479a Sequeira Espinoza , Carlos Daniel .
Avaliação dos níveis de segurança em uma vacina
recombinante contra a linfadenite caseosa em
ovinos / Carlos Daniel Sequeira Espinoza . -
2023.
66 f. : il.

Orientador: Jael Soares Batista.
Coorientador: Francisco Silvestre Brilhante
Bezerra.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2023.

1. BCG. 2. CP40. 3. Imunização . 4.
Corynebacterium pseudotuberculosis. 5. Inflamação
dos gânglios linfáticos em ovinos. I. Soares
Batista, Jael , orient. II. Brilhante Bezerra,
Francisco Silvestre , co-orient. III. Título.

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

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SEGURANÇA EM UMA VACINA RECOMBINANTE CONTRA A LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade e Produção Animal

DEFENDIDA EM: __06__ / __12__ / __2023__.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **JAIL SOARES BATISTA**
Data: 05/03/2024 14:54:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jail Soares Batista

Presidente (UFERSA)

Documento assinado digitalmente
 **FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA**
Data: 08/03/2024 21:27:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra

Examinador Interno (UFERSA)

Documento assinado digitalmente
 **ANA CARLA DIOGENES SUASSUNA BEZERRA**
Data: 06/03/2024 06:42:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra

Examinadora Externa ao PPGCA

Documento assinado digitalmente
 **GABRIELA HEMYLIN FERREIRA MOURA**
Data: 12/03/2024 14:49:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Gabriela Hémilyn Ferreira Moura

Examinadora Externa à UFERSA

*Em memória ao minha avô Reyna Taleno
Leiva (1952 - 14-05-2023).*

AGRADECIMENTOS

A Deus porque dia a dia me deu forças, sabedoria e coragem para vencer, apesar de todas as adversidades. E também por esta grande oportunidade com a qual me recompensou.

Agradeço aos meus pais por serem um pilar tão fundamental na minha vida, e por me darem força. Minha mãe, Juana Robertina Espinoza Zamora, uma mulher cheia de sabedoria, obrigado por seus conselhos por me encorajar e me fazer sentir que posso. Meu pai Isidro Sequeira Taleno, obrigado por sendo aquele exemplo de humildade e simplicidade por acreditar em mim.

Agradeço a meu Orientador, Doutor Jael Soares Batista, por suas orientações e disponibilidade sempre que precisei e ao meu Coorientador, Doutor Francisco Silvestre Bezerra, por suas orientações, trabalho, disponibilidade e todo tempo dedicado para esclarecer dúvidas e assim a conclusão do trabalho fosse realizada.

Agradeço à Banca Examinadora pela disponibilidade, por aceitar participar da minha defesa e pelas correções indicadas para a melhora da dissertação.

A todos os colaboradores que me ajudaram durante toda essa pesquisa, em especial à equipe do Laboratório de Patologia Clínica e do Laboratório de Vacinologia e Imunologia Aplicada (LAVIA).

“Sucesso é o acúmulo de pequenos esforços, repetidos dia a dia”. Robert Collier

RESUMO

A *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria que causa uma doença crônica chamada linfadenite caseosa o mal de caroço, que acomete em pequenos ruminantes, provocando inflamação nos gânglios linfáticos e abscesso em órgãos, causando diminuição na produção do rebanho ovino. A principal diferença desta pesquisa com as vacinas existentes é que as vacinas existentes são vacinas vivas atenuadas, toxóides ou inativadas de primeira geração, e a vacina em estudo é uma vacina recombinante que possui uma proteína que foi produzida a partir de *Escherichia Coli*, tendo em conta que não existem vacinas recombinantes comercialmente aprovadas para utilização em ovinos e caprinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a segurança de longo prazo de uma formulação vacinal em ovinos composta por *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur e rCP40 através do acompanhamento clínico e laboratorial durante 88 dias após do esquema vacinal completo. A pesquisa apresentada foi realizada com ajuda de 12 carneros, hígidos, com idade de 4 - 6 meses, distribuídos em 2 clases, o primeiro protegido com solução salina 0,9% e o segundo com 200 µg de rCP40 e 106 UFC de BCG diluídos em PBS. Depois da última imunização, os ovinos foram acompanhados para a avaliação de eventos adversos de longo prazo. Os exames clínicos foram realizados durante 20 semanas, e se iniciaram após o esquema de vacinação completa, no qual foram avaliados parâmetros tais como: frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura retal, dinâmica ruminais, cor das mucosas nasal, ocular e oral, palpação de linfonodos e peso. Da mesma forma, foram feitos análises hematológicos e bioquímicos durante aproximadamente 3 meses após a imunização completa, onde foi avaliado os próximos valores sanguíneos: Hematócritos, hemoglobina, hemácias, volume corpuscular médio, concentração média de hemoglobina corpuscular, proteína plasmática total, fibrinogênio plasmático, leucócitos, proteína total e albumina. No caso do resultado, não foram encontradas variações significativas entre os ovinos que receberam BCG e CP40 como vacina e o grupo controle para os valores clínicos e hematológicos avaliados, com exceção dos valores de hemácias, hemoglobina e os valores bioquímicos como proteína total e albumina, que diferenças significativas foram observadas. Estes resultados podem demonstrar que o composto vacinal não aumenta os parâmetros a longo prazo, sendo seguro para uso em ovinos.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; gânglios linfáticos; BCG; CP40; imunização.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is a bacterium that causes a chronic disease called caseous lymphadenitis, which affects small ruminants, causing inflammation in the lymph nodes and abscesses in organs, causing a decrease in the production of the sheep herd. The main difference between this research and existing vaccines is that existing vaccines are first-generation live attenuated, toxoid or inactivated vaccines, and the vaccine under study is a recombinant vaccine that has a protein that was produced from *Escherichia Coli*, taking into account Note that there are no recombinant vaccines commercially approved for use in sheep and goats. The objective of this work was to evaluate the long-term safety of a vaccine formulation in sheep composed of *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur and rCP40 through clinical and laboratory monitoring for 88 days after the complete vaccination schedule. The research presented was carried out with the help of 12 healthy lambs, aged 4 - 6 months, distributed in 2 classes, the first protected with 0.9% saline solution and the second with 200 µg of rCP40 and 106 CFU of diluted BCG on PBS. After the last immunization, the sheep were monitored to evaluate long-term adverse events. Clinical examinations were carried out over 20 weeks, and began after the complete vaccination schedule, in which parameters such as: respiratory frequency, heart rate, rectal temperature, rumen dynamics, color of the nasal, ocular and oral mucous membranes, palpation of lymph nodes and weight. Likewise, hematological and biochemical analyzes were carried out approximately 3 months after complete immunization, where the following blood values were evaluated: Hematocrit, hemoglobin, red blood cells, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, total plasma protein, plasma fibrinogen, leukocytes, total protein and albumin. In the case of the result, no significant variations were found between the sheep that received BCG and CP40 as a vaccine and the control group for the clinical and hematological values evaluated, with the exception of the values of red blood cells, hemoglobin and biochemical values such as total protein and albumin, that significant differences were observed. These results may demonstrate that the vaccine compound does not increase parameters in the long term, being safe for use in sheep.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; lymph nodes; BCG; CP40; immunization

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Pesagem de ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas
- Gráfico 2 - Temperatura retal das ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas
- Gráfico 3 - Monitoramento respiratório das ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas
- Gráfico 4 - Pulso cardíaco das ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas
- Gráfico 5 - Movimentos peristálticos das ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas
- Gráfico 6 - Cor das fossas nasais em ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas
- Gráfico 7 - Cor da cavidade ocular das ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas

- Gráfico 8 - Cor da cavidade oral em ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas
- Gráfico 9 - Resultados de Hematócrito (HT) das ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses
- Gráfico 10 - Resultados da Hemoglobina (HB) nas ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses
- Gráfico 11 - Resultados da Hemácias (HE) nas ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses
- Gráfico 12 - Resultados do Volume Corpuscular Médio (VCM) nas ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses
- Gráfico 13 - Resultados da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses
- Gráfico 14 - Resultados da Proteína Plasmática totais (PPT) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses
- Gráfico 15 - Resultados de Fibrinogênio Plasmático (FP) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses

- Gráfico 16 - Resultados de Leucócitos (Le) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses
- Gráfico 17 - Resultados da Proteína Totais (PT) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses
- Gráfico 18 - Resultados da Albumina (AB) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG	Bacillus Calmette-Guerin
bpm	Batimentos por minuto
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
G1	Grupo controle
G2	Grupo imunizado com BCG e CP40
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
LC	Linfadenite caseosa
NEPPER	Núcleo de Ensino e Pesquisa em Pequenos Ruminantes
PBS	Tampão fosfato salino
PLD	Fosfolipase D
rpm	Respirações por minuto
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-árido

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
ml	Mililitro
%	Porcentagem
cm	Centímetro
ug	Micrograma
mm ³	Milímetro cúbico
g/dL	Grama/Decilitro
fl	Fentolitros
mg/dL	miligramas/decilitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 A Linfadenite caseosa	19
3.1.1 Alterações clínicas e hematológicas	21
3.2 Características microbiológicas do <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	22
3.2.1 Fatores de virulência	22
3.3 Epidemiologia	24
3.4 Controle e profilaxia da LC	26
3.5 Desenvolvimento de vacinas contra a LC	27
3.5.1 O uso de BCG na imunoprofilaxia contra a infecção por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	30
3.5.2 Uso de CP40 como antígeno vacinal contra a LC	31
3.5.3 Ensaios clínicos no desenvolvimento de vacinas contra a LC	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Animais experimentais e aspectos éticos	35
4.2 Delineamento experimental	35
4.2.1 Abordagem para a criação da fórmula vacinal	36
4.2.2 Aplicação da imunização	36
4.3 Diagnóstico clínico	37
4.4 Coleta de sangue	37
4.5 Realização do Hemograma	37
4.5.1 Eritrograma	37
4.5.2 Leucograma	38
4.6 Análise bioquímica	38
4.7 Análise estatística	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Medição de indicadores clínicos	40
5.3. Avaliação dos parâmetros hematológicos	46
5.4. Valorização dos indicadores bioquímicos	53
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
7 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A doença chamada linfadenite caseosa que é popularmente conhecida como mal do caroço, causa inflamação granulomatosa nos órgãos linfóides, sendo uma doença causada pela infecção da *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bactéria intracelular gram-positiva, facultativa, não esporulada e aeróbica (Faccioli-Martins *et al.*, 2014). A propagação desse patógeno é decorrente do contato direto entre animais com evacuação de abscessos supurados e também por fômites e ambiente infectado, podendo penetrar no indivíduo através de lesões na pele, ferimentos na mucosa oral e por aerossóis no caso de animais com linfadenite nos pulmões (Parise *et al.*, 2021., Pointon *et al.*, 2019., De Sá, 2018).

A patologia da *Corynebacterium pseudotuberculosis* é a causa da existência de abscessos em gânglios linfáticos e demais órgãos, causando uma diminuição nas taxas de produção dos animais afetados, caracterizada pela formação de granulomas que afeta especialmente os pequenos ruminantes como ovinos e caprinos (De Pinho *et al.*, 2024; Carmo *et al.*, 2012).

Quanto às lesões viscerais, elas não são detectáveis clinicamente, mas se expressam de acordo com o seu número, local e efeito no órgão envolvido; além dos sinais clínicos característicos, os animais podem apresentar problemas respiratórios, timpanismo ruminal crônico recorrente, redução de peso progressiva, sendo uma forma de expressão das lesões viscerais por LC (Faccioli-Martins *et al.*, 2014), conhecida como “síndrome da ovelha magra” e do “caprino definhado”.

A parte terapêutica da linfadenite caseosa é um pouco complicada, já que não é recomendável o uso de antibióticos devido a seu alto valor e sua baixa eficácia. Da mesma forma, o manejo desta patologia é complicado, já que a bactéria consegue permanecer no médio ambiente por períodos maiores e há limitações para descobrir e descartar ovinos que apresentem a doença de forma subclínica facilita a disseminação dentro do rebanho (Silva *et al.*, 2014., Gerelli *et al.*, 2019).

A imunização mediante vacinas comerciais é a forma de prevenção mais eficaz contra o síndrome da ovelha magra, porém, a doença pode persistir mesmo após um intervalo mais longo de vacinação, devido ao elevado nível de disseminação nos tecidos do animal, tendo em conta que a imunidade inata é responsável pelos eventos iniciais que não controlam a propagação

bacteriana; portanto, é importante buscar avanços que facilitem a criação de uma vacina ainda mais eficiente e com menor efeitos colaterais para ovinos e caprinos, capaz de proporcionar uma maior proteção (Basto *et al.*, 2012; De Pinho *et al.*, 2021).

Daí a necessidade de se pesquisar formulações vacinais mais seguras e eficazes. Neste sentido, nas últimas décadas, vários compostos de vacinas vêm sendo investigadas. Tais como, métodos que requerem o uso de proteínas recombinantes, que tem apresentado resultados favoráveis na proteção e se demonstrado seguras em ensaios pré-clínicos (Silva *et al.*, 2014; De Pinho *et al.*, 2021). Embora, os dados que demonstrem a eficácia dessas formulações em ovinos-caprinos são escassos. Os ensaios clínicos no desenvolvimento de vacinas veterinárias são importantes, pois servem para calcular a segurança e eficácia das vacinas. Segundo (Santana *et al.*, 2017), o progresso de vacinas contra linfadenite caseosa (LC) em ovinos pode reduzir a incidência de infecções e a presença de abscessos até 70%.

O manejo de BCG (*Bacillus Calmette–Guérin*) em compostos vacinais contra a LC confere proteção cruzada após o desafio da cepa de *C. pseudotuberculosis*, dada a proximidade filogenética entre os dois microrganismos (Leal *et al.*, 2018). No caso da proteína recombinante CP40 vem apresentando excelente desempenho em ensaios pré-clínicos em camundongos, alcançando taxas de imunidade muito alta (Droppa-Almeida *et al.*, 2016). As formulações de vacinas usando a proteína recombinante CP40 sozinha ou em combinação com outras cepas vivas recombinantes ou ambos antígenos usados como técnica de reforço inicial, resultam em taxas de sobrevivência e produção de anticorpos significativas (Barral *et al.*, 2022; Droppa-Almeida *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2014).

Por esse motivo, neste trabalho se realiza um acompanhamento de parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos de ovinos imunizados com duas doses com a formulação vacinal composta por BCG e rCP40 para avaliar possíveis efeitos adversos de longo prazo da formulação contra a linfadenite caseosa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a segurança de longo prazo de uma formulação vacinal contendo *M. bovis* BCG Pasteur e rCP40 contra a linfadenite caseosa em ovinos.

2.2 Objetivos específicos

Descrever e analisar achados clínicos de ovinos imunizados com *M. bovis*, BCG Pasteur e rCP40.

Descrever e analisar os achados hematológicos de ovinos imunizados com *M. bovis* BCG Pasteur e rCP40.

Quantificar proteína total e albumina sérica em ovinos imunizados com *M. bovis*, BCG Pasteur e rCP40.

Avaliar e descrever os possíveis efeitos adversos de longo prazo em até 20 semanas após completar o esquema vacinal com *M. bovis*, BCG Pasteur e rCP40.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Linfadenite caseosa

Patologia causada pela infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria intracelular gram-positiva, facultativa, não-esporulada e aeróbica que cresce facilmente a uma temperatura de 37 °C e pH de 7,0 a 7,2. Faz parte da ordem *Corynebacteriales*, que inclui os gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e outros. Também pode ser classificado em biovars *equi* e *ovis*, cada um causando diferentes doenças em diferentes espécies. A primeira causa de lesões granulomatosas ulcerativas e mastite em bovinos, linfangite ulcerativa (UL) ou febre dos pombos em cavalos e doença cutânea edematosa (OSD) em búfalos. A segunda, afeta majoritariamente pequenos ruminantes, causando a LC (Dorella *et al.*, 2006; Parise *et al.*, 2021).

O Mal de caroço afeta animais ruminantes e não ruminantes, tais como: bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, lhamas, alpacas, suínos, veados e animais de laboratório (Guimarães *et al.*, 2011). Porém, *C. pseudotuberculosis* é considerada uma zoonose emergente, principalmente relacionada a pessoas que tiveram contato com animais infectados e produtos lácteos contaminados, causando assim um problema de saúde pública (Baston *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2014, p. 15).

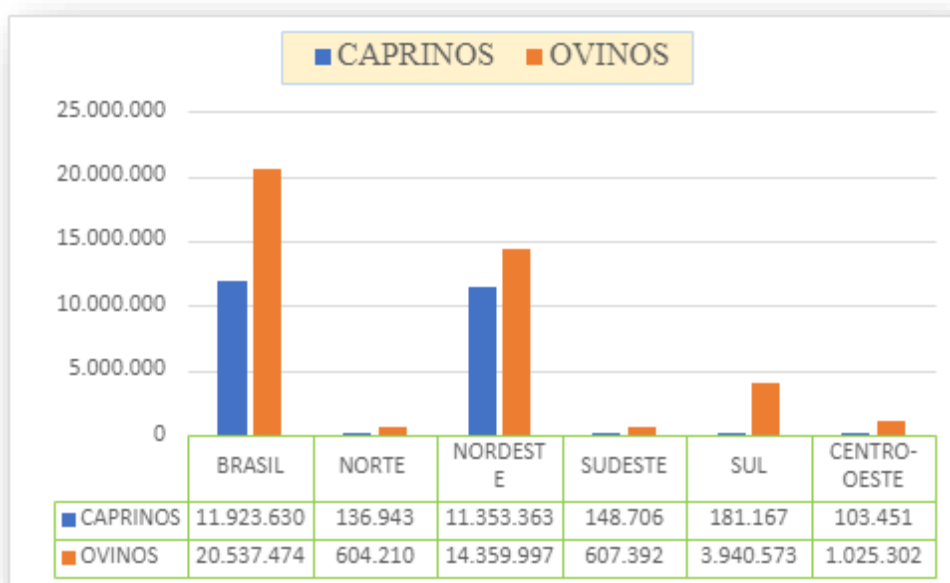
Em relação a pequenos ruminantes, a LC acomete principalmente animais adultos, devido ao maior tempo de permanência nas unidades de produção, sendo importante manter o controle entre animais jovens e adultos, evitando a aglomeração entre eles, já que é um possível fator de risco para contrair a doença em idade precoce (Nicoleti *et al.*, 2022).

No caso da infecção pode se manifestar em animais através de formação de abscessos externos, especificamente nos linfonodos superficiais e no tecido subcutâneo (forma externa). Esses abscessos podem se desenvolver internamente em órgãos, como pulmões, rins, fígado e baço (forma interna). Em alguns casos podem ser encontrados animais assintomáticos ou com poucos sinais clínicos, o que faz com que a infecção não seja reconhecida até que seja feito um exame *post mortem* (Dorella *et al.*, 2006).

Nos rebanhos brasileiros há alta prevalência de LC (estima-se algo em torno de 30%), e a falta de biossegurança adequada está diretamente relacionada a esses números. Os prejuízos no setor socioeconômico associados à LC são elevados, e estão geralmente associados à diminuição do leite, deterioração da pele e da carcaça. É sempre aconselhável não adquirir animais com suspeita de abscessos. Por se tratar de um material altamente infeccioso, no momento em que o pus contamina o médio ambiente, se torna fonte de infecção durante muito tempo para os outros animais (Lucas *et al.*, 2009).

A quantidade de ovinos e caprinos atuais no Brasil é de aproximadamente 11.923.630 e 20.537.474 cabeças, respectivamente. Dos quais Nordeste tem 11.353.363 cabeças de cabras e 14.359.997 cabeças de ovinos (IBGE, 2021), superando as demais regiões brasileiras (Figura 1).

Figura 1. Efetivo dos rebanhos (cabeças) de ovinos e caprinos no Brasil e grandes Regiões



Fonte: Adaptado de (IBGE, 2021).

3.1.1 Alterações clínicas e hematológicas

O achado clínico característico da LC são as lesões granulomatosas que podem ocorrer mais frequentemente nos linfonodos submandibulares, parotídeos, pré-escapulares e pré-femorais; ao contrário dos linfonodos supramamários ou inguinais, que ocorrem com pouca regularidade. O material purulento dessas lesões é inodoro e varia em consistência de mole e pastoso (mais comum em caprinos) a espesso e caseoso (mais comum em ovinos). Outros achados clínicos nos ovinos é a perda crônica de peso, bem como retardo de crescimento, aparecimento de abscessos nos pulmões que causam tosse, descarga nasal purulenta, febre e taquipnéia com ruídos pulmonares aumentados, etc. A incidência de abscessos e outros sintomas internos e externos aumenta com a idade do animal (Washburn, 2019).

As doenças infecciosas podem ocorrer devido a variações no nível sanguíneo, detectadas através de parâmetros hematológicos e bioquímicos que dão uma ideia da situação patológica dos ovinos. Essas alterações são o resultado entre os componentes do patógeno e do hospedeiro, que respondem de diferentes maneiras a diferentes tipos de agentes infecciosos e reações inflamatórias. As doenças bacterianas agudas apresentam aumento da atividade dos neutrófilos e as infecções bacterianas crônicas são identificadas pelo aumento de linfócitos e monócitos (Odhah *et al.*, 2017).

Têm sido feitas tentativas de desenvolver testes diagnósticos precisos para identificar a infecção, como métodos baseados na detecção de anticorpos específicos por ELISA, para identificar casos subclínicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que possui especificidade de 98,5% e sensibilidade de 93,5%. Estudos têm sido realizados com diversos antígenos bacterianos para expandir a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos, porém, estes testes não conseguem identificar todos os caprinos e ovinos infectados, depois que a maioria apresenta resposta humoral de baixo nível contra a bactéria. A quantidade de interferon (IFN)-c no sangue após a exposição a antígenos bacterianos tem sido relatada como um marcador altamente específico de LC, mas a descoberta de animais que produzem níveis altos e baixos de IFN-c torna imperativa a melhoria destes testes (Basto *et al.*, 2011).

De acordo com (Nicoletti *et al.*, 2022) as pesquisas baseadas em avaliações hematológicas e bioquímicas geralmente referem-se a algumas variações dietéticas e gestacionais e algumas referências patológicas, porém, não tem um modelo definido para linfadenite caseosa. Avaliações bioquímicas, sorológicas e hematológicas apoiam o diagnóstico clínico, embora não existam intervalos estabelecidos para as diferentes raças de caprinos mantidos em diferentes ecossistemas. Considerando que as variações clínicas, hematológicas e bioquímicas causadas pela infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* não são conhecidas e se algum desses parâmetros pode ser utilizado como candidato a biomarcador sorológico.

A LC pode se disseminar por vários órgãos, provocando a destruição dos linfonodos mediante a migração de fagócitos infectados, causando lesões granulomatosas crônicas, devido ao acúmulo de fagócitos infectados, eosinófilos e restos celulares; formando abscessos diferenciados que permite facilmente a disseminação bacteriana, afetando a função local do animal e causando uma diminuição na produção do ovino (Martins *et al.*, 2014; Gascoigne *et al.*, 2020).

3.2 Características microbiológicas do *Corynebacterium pseudotuberculosis*

As bactérias pertencentes ao gênero *Corynebacterium* crescem bem em ambiente com 5% de CO₂, medindo em torno de 0,5 a 0,6 µm por 1 a 3 µm, apresentando-se na forma de cocos ou filamentos. São anaeróbios facultativos, catalase e urease positivos, fermentam glicose e ribose, sem produção de gás, e cerca de 80% dos isolados fermentam maltose, mas não fermentam lactose, manose e sacarose. Não produzem esporos e são imóveis, também possuem *pilli* e são capazes de produzir biofilme. Apresentam características de serem intracelulares facultativos, não hidrolisando a gelatina e não digerindo a caseína. Possuem uma parede celular com alta concentração de lipídios, principalmente o ácido corinomicólico (Guedes *et al.*, 2015). *Corynebacterium pseudotuberculosis* consegue sobreviver no meio ambiente durante muito tempo (Abdullah *et al.*, 2020).

3.2.1 Fatores de virulência

A infecção da *C. pseudotuberculosis* está relacionada principalmente à fosfolipase D (PLD), que contribui para o aumento da produção e multiplicação desses genes patogênicos no início da infecção. A PLD tem ação de exotoxina ou citotoxina glicoproteica capaz de hidrolisar a esfingomiélin, enfraquecendo as membranas celulares e favorecendo a infecção pelo

microrganismo. Isso catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster dos glicerofosfolipídios, produzindo ácido fosfatídico e outras moléculas hidrofílicas como a serina. Além disso, causa ruptura de eritrócitos ovinos em meios de cultura suplementados com sangue. Esse efeito hemolítico da PLD apresenta sinergismo com *Rhodococcus equi* fosfolipase C, possibilitando a confirmação da bactéria pelo teste de hemólise sinérgica (teste CAMP). Deve-se levar em conta que muitos estudos já foram realizados sobre a PLD de *C. pseudotuberculosis*, isso por ser um meio patogênico com maior importância para o agente (De Sá *et al.*, 2018).

Outros genes que compõem a patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* também são relatados, como: *fagA* (proteína de membrana integral), ou *fagB* (transportador de ferro de enterobactina), ou *fagC* (proteína de ligação de membrana citoplasmática-ATP) e ou *fagD* (Sideróforos-ferro proteína de ligação). Esses genes codificam proteínas semelhantes aos transportadores de ferro ABC de outras bactérias. Demonstramos a regulação do operon *fag ABC* pelo ferro e o envolvimento desses genes no contágio pela bactéria (Billington *et al.*, 2002). Deve-se enfatizar que genes com funções associadas à absorção de ferro, carbono e magnésio aumentam a sobrevivência bacteriana em condições de estresse (Ruiz *et al.*, 2011).

Outro componente da infecção do microrganismo é o nível para criação de biofilme presente na *Corynebacterium*. Essa estrutura é um agregado de microcolônias envoltas por uma matriz de polissacarídeos que permitem a comunicação entre os mesmos, aderindo a qualquer superfície biológica e que poderia explicar parte da resistência à ação de antimicrobianos e biocidas (Guedes *et al.*, 2015).

3.2.1.1 Ácidos corynomicólicos

Os ácidos corynomicólicos conferem ao microrganismo patógeno proteção mecânica e bioquímica, causando resistência à digestão por enzimas hidrolíticas presentes nos lisossomos. Estudos mostram que a inoculação de extratos de ácido corynomólico em caprinos pode causar hemorragias, congestão, degeneração, necrose, edema e infiltrações leucocitárias em órgãos reprodutivos e linfonodos associados (Domínguez *et al.*, 2021).

Ácidos corynomicólicos estão presentes em diferentes grupos de bactérias Gram-positivas, que são classificadas na subordem *Corynebacterineae*, que inclui alguns gêneros como: *Myobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium*, este último gênero apresenta ácidos micólicos menores (C28 - C40) que exercem uma barreira de permeabilidade benéfica, mas não essencial à vida, para a troca de nutrientes e antibióticos na parede celular.

A diferença com outros gêneros, como espécies de *Mycobacterium*, que são totalmente dependentes para crescimento e sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de seus ácidos micólicos, que são naturalmente superiores (C60 – C90). Da mesma forma, é apresentado o gênero *Rhodococcus*, que possui ácidos micólicos de tamanho (C30 - C54) e *Nocardia* com tamanho de (C42 - C66), mas nos dois casos sem grupo funcional, apenas a possibilidade de uma ou mais ligações duplex (Verschoor *et al.*, 2012).

3.2.1.2 Endoglicosidase CP40

A proteína CP40 é codificada por um gene com quadro de leitura aberta de 1.137 pb, localizado a jusante do gene *pld* em PiCp1. Foi referida como uma enzima com atividade de serina protease, porém, em outro estudo, a análise de sequência permitiu seu agrupamento mais próximo das sequências de endoglicosidases e mais distante das sequências de serina protease. A atividade enzimática é a endoglicosidase, mediando a hidrólise de ligações glicosídicas, proteínas da família GH18, semelhante ao domínio EndoE pertencente ao *Enterococcus faecalis*. As enzimas GH18 contêm um motivo de sequência de consenso conservado (LIVMFY)-(DN)-G-(LIVMF)-(DN)-(LIVMF)-(DN)-X-E, onde o ácido glutâmico terminal é essencial para a atividade enzimática. Ao alinhar o sítio ativo do GH18 no CP40, foi estabelecida sua similaridade com as enzimas EndoE e EndoS, com apenas alterações em um ou dois aminoácidos, respectivamente. O papel como fator de infecção foi associada à amplitude realizada *in vitro* de degradar a região Fc dos anticorpos IgG. A endoglicosidase CP40 não hidrolisa glicanos em IgG bovina e caprina, enquanto a IgG ovina é parcialmente hidrolisada e a IgG equina completamente. A análise também foi feita com subclasses de IgG humana, apresentando atividade em todas elas e parcialmente em IgG4. Não houve atividade enzimática detectável em outras glicoproteínas, incluindo alguns dos outros isotipos de imunoglobulina (IgA, IgD e IgE) (Domínguez *et al.*, 2021, p. 1226).

3.3 Epidemiologia

A distribuição global da linfadenite caseosa em ovelhas e cabras foi encontrada em países e continentes exportadores de carne ovina e caprina, como: Austrália, África, alguns países da Europa e da América, principalmente o Brasil (De Sá, 2018).

Na década de 1920, a LC tornou-se um problema significativo, devido à contaminação das carcaças frequentemente acometidas pela doença em carneiros importados para a Grã-Bretanha e outros países. Isso ocorreu porque as lesões causadas pela infecção passaram despercebidas no momento da inspeção da carne importada, tornando-se perceptíveis até que o consumidor observasse algumas anomalias na carne. Muitos países foram afetados por esta patologia em ovinos, como foi Argentina, obrigando o governo britânico a tomar medidas sanitárias, pois foi demonstrado por um relatório que, em uma única temporada, 9.770 carcaças de carneiro (27% do rendimento total) foram rejeitadas em um contêiner na Patagônia devido ao LC. Depois disso, outros países foram afetados como: Uruguai, Chile, Austrália e Nova Zelândia (Baird; Fontaine, 2007).

O Brasil é um dos maiores compradores de carne de caprinos e ovinos do mundo. (Martins *et al.*, 2016). O maior número desses animais é encontrado na região semiárida do país, com uma média de 95,22% da produção caprina e 69,92% da produção ovina em todo o Brasil. (IBGE, 2021).

Levando em consideração que embora exista um grande número de animais, o percentual de produção é baixo. Isto pode ser devido à alta taxa de portadores de linfadenite caseosa na região Nordeste. A LC tem prevalência clínica de aproximadamente 30% em animais. Por esse motivo, acredita-se que a incidência esteja subestimada devido à falta de comunicação com os órgãos correspondentes. (Alencar *et al.*, 2010; Carmo *et al.*, 2012; Andrade, 2007).

A doença infectocontagiosa (ovelha magra) é considerada endêmica no país brasileiro, tendo maior impacto no setor econômico do Nordeste de Brasil (De Faria *et al.*, 2018). A deficiência do manejo sanitário dos rebanhos nordestinos afeta muito a produção ovino - caprina (Cruz *et al.*, 2019).

De acordo com (Silva *et al.* 2019) As doenças zoonóticas em ovinos constituem um problema de saúde pública, devido à fácil transmissão de microrganismos de animais infestado com ovinos saudáveis ou pelo consumo de produtos contaminados. Existem diferentes formas de transmissão da infecção por LC, uma delas é através da expulsão do *C. pseudotuberculosis* contida em abscessos de paredes espessas, sendo transferida de um animal ou outro, existem várias vias possíveis de infecção. Uma delas é através da ruptura de abscessos superficiais que liberam quantidades abundante de bactérias viáveis na pele e no velo adjacentes e podem facilmente contaminar o ambiente próximo, podendo assim outros animais serem expostos, seja

por diretamente com o animal acometido ou por via indireta através de fômites contaminados (Baird; Fontaine, 2007, p. 179 – 210)

3.4 Controle e profilaxia da LC

Dada a existência de LC nas unidades produtivas de ovinos, é aconselhável estabelecer um plano de controle sanitário para prevenir o aumento da doença nos animais. Esse plano pode ser baseado no aconselhamento aos produtores sobre as medidas sanitárias, bem como na introdução de vacinação em ovinos saudáveis, para reduzir a incidência desta doença, sendo evidente o grande impacto positivo que o plano de vacinação acarreta no rebanho, evitando assim perdas econômicas pelo baixo índice produtivo em ovinos (Windsor; Bush, 2016).

Quando é constatada a aparição da LC em unidades ovino-caprina, a primeira medida que deve ser tomada é a biossegurança por parte dos operadores para impedir a disseminação do microrganismo, já que pode estar no meio ambiente por mais de dois a três meses e em locais com sombra, feno ou esterco ainda mais. No caso de abscessos presentes em animais infectados, a melhor opção é extrair todo o pus e descartá-lo, levando em consideração os meios de biossegurança ou também podem ser removidos cirurgicamente e descartados adequadamente. Antibióticos (sistêmicos ou intralesionais) podem ser usados, mas para essa patologia a melhor opção é o abate. Depois disso, recomenda-se desinfetar todos os bebedouros, comedouros, baldes de água e estruturas contaminadas com clorexidina. É importante descartar qualquer material utilizado no processo de descontaminação e saber que esta doença não é curável, mas tratar os ovinos infectados é uma forma de diminuir a contaminação para o restante do rebanho. (Sanders, 2018).

Dentre os processos indicados para um programa de controle sanitário estão o diagnóstico sorológico precoce (a cada 6 meses em rebanhos soropositivos e a cada 12 a 24 meses em rebanhos soronegativos) e a eliminação de animais com presença de sinais clínicos e acompanhamento rigoroso dos animais induzida no rebanho (EMBRAPA, 2020). Qualquer novo animal que chegue à unidade de produção deve passar por quarentena por uma duração de pelo menos dois meses, da mesma forma é importante realizar os respectivos testes de diagnóstico para impedir a entrada de animais doente no rebanho (Scott, 2011).

Através do uso de vacinas, podem ser obtidos resultados como a redução de animais com lesões cutâneas ou pulmonares, diminuindo a disseminação de infecções e a carga bacteriana no rebanho ovino, para proteger os animais jovens e descartar os animais mais velhos (Gascoigne *et al.*, 2020). Atualmente existem vacinas comerciais para pequenos ruminantes, que devem ser utilizadas especificamente nas espécies indicadas, pois já foram relatados casos de reações adversas em caprinos que receberam vacinas marcadas para ovinos. O cumprimento rigoroso das vacinações pode ajudar a reduzir a prevalência e a incidência de LC no rebanho (Washburn, 2019).

3.5 Desenvolvimento de vacinas contra a LC

O avanço de vacinas para combater a LC em ovinos pode reduzir a incidência de infecções e até 70% o a presença de abscessos. Muitas vacinas comercializadas são combinadas com outros patógenos, geralmente do gênero *Clostridium* (Santana *et al.*, 2017). A resposta imunológica proporcionada pela vacina depende de muitos fatores, como o tipo de vacina, a dose, o intervalo entre doses, características dos antígenos e a genética do próprio animal (Martins *et al.*, 2014).

Atualmente existem diferentes tipos de vacinas presentes no mercado, baseadas principalmente em cepas atenuadas da bactéria e na exotoxina fosfolipase D recombinante inativada, mas essas vacinas atuam e apresentam alguns problemas de segurança. Por isso, estudos moleculares e de bioinformática têm sido realizados para descobrir novas técnicas imunogênicas mais eficientes. Esses estudos moleculares tiveram um grande avanço após o sequenciamento do genoma de várias cepas de *C. pseudotuberculosis* e modelos vacinais baseados em bactérias recombinantes com resultados promissores. Uma alternativa tem sido a análise proteômica de proteínas reconhecidas por soros de pequenos ruminantes naturalmente infectados pela bactéria, o que tem mostrado novas oportunidades para o crescimento de vacinas (Guedes *et al.* 2015).

No quadro 1, estão apresentadas as vacinas comerciais disponíveis contra a LC.

Quadro 1. Vacinas contra a Linfadenite Caseosa disponíveis no mercado nacional e internacional.

Nome comercial	Componentes	Uso licenciado	País	Fabricante	Validade	Revacinação
Glanvac 3®	Toxóide de CP associado a toxóides de dois clostrídeos	Caprinos e Ovinos	África do Sul	Zoetis	-	Anual
Glanvac® 6	Toxóide de CP associado a toxóides e bacterinas de cinco clostrídeos	Ovinos	Nova Zelândia	Zoetis	-	Anual
Glanvac® 3 B12	Toxóide de CP associado a toxóides de dois clostrídeos e vitamina B12	Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Glanvac® 3 Vaccine (for goats)	Toxóide de CP associado a toxóides de dois clostrídeos	Caprinos e Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Glanvac® 3S B12	Toxóide de CP associado a toxóides de dois clostrídeos, selênio e vitamina B12	Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Glanvac® 6 (for goats)	Toxóide de CP associado a toxóides e bacterinas de cinco clostrídeo	Caprinos e Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Glanvac® 6S	Toxóide de CP associado a toxóides e bacterinas de cinco clostrídeo e selênio	Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual

Glanvac® 6 B12	Toxóide de CP associado a toxóides e bacterinas de cinco clostrídeos e vitaminas B12	Ovinos	Austrália	Zoetis	-	Anual
Case-Bac ®	Bacterina e toxóide de CP	Ovinos	EUA, Canadá	Colorado, Serum, Company	-	Anual
Caseus D-T ®	Bacterina e toxóide de CP Associado a toxóides de dois clostrídeos	Ovinos	EUA, Canadá	Colorado, Serum, Company	-	Anual
Glanvac ® 6	Toxóide de CP associado a toxóides e bacterinas de cinco clostrídeos	Caprinos e Ovinos	Brasil	Zoetis	-	Anual
LinfoVac ®	Bactérias vivas atenuadas	Caprinos e Ovinos	Brasil	Laboratório Vencofarma do Brasil	12 meses	Anual
Vacina 1002®	Bactérias vivas tenuadas	Caprinos e Ovinos	Brasil	Labovet Produtos Veterinários	3 meses	Anual

CP = *Corynebacterium pseudotuberculosis*Fonte: (Martins *et al.*, 2014)

Glanvac® foi a primeira vacina comercial desenvolvida na Austrália, composta por exotoxina inativada por formalina e adjuvante incompleto de Freud. Atualmente existem 9 tipos de vacinas Glanvac (Quadro 1), elaboradas a partir de antígenos de *Clostridium* necessários para a proteção ideal do animal através do uso de doses múltiplas por cordeiro e reforço anual para ovelhas adultas (De Pinho *et al.*, 2021). Biodectin® é um produto para ovinos composto por uma mistura de vacina e endectocida (moxidectina) que combate outras doenças além da LC. Esta vacina é produzida pela Fort Dodge (Farm Point, 2009).

Caseous DT® (Colorado Serum Co., Denver, CO, EUA) é outra vacina disponível comercialmente, baseada na combinação de duas formulações: uma composição contendo apenas toxóides clostridiais (um componente) e outra contendo uma mistura de *C. pseudotuberculosis* e toxóides (dois componentes). O uso de Caseous DT® reduz a incidência de lesões externas e internas de LC (Baird; Fontaine, 2007). Case-Bac® (Colorado Serum Co., EUA) não utiliza toxóides clostridiais como as vacinas anteriores, é baseada na combinação do toxóide *C. pseudotuberculosis* e bacterina, que promove a redução do número e tamanho dos abscessos pulmonares em animais, evitando a propagação do LC no rebanho (De Pinho *et al.* 2021).

Uma vacina viva atenuada de *C. pseudotuberculosis* cepa 1002, foi desenvolvida pela empresa Baiana de desenvolvimento agropecuário, sendo liberada para uso no Brasil desde 2002. A vacina é produzida industrialmente na forma líquida e liofilizada, sendo administrada por via subcutânea anualmente, apresentando uma imunidade próxima a 83% contra LC (Dorella, 2006).

Embora essas vacinas sejam úteis e ofereçam proteção razoável, elas devem ser administradas pelo menos duas vezes, levando em consideração que podem apresentar efeitos colaterais como febre, lesões e baixo índice produtivo (Ribeiro *et al.*, 2014).

3.5.1 O uso de BCG na imunoprevenção contra a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A BCG tem se mostrado eficiente na parte imunológica contra diversas doenças, pois apresenta diversas vantagens para melhoras de vacinas recombinantes multivalentes como: longa resposta imune, propriedades adjuvantes, estabilidade e segurança. Estudos propõem a avaliação do BCG recombinante apresentando antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, com auxílio de testes desafiados em camundongos com a cepa *C. pseudotuberculosis* para avaliar seu potencial de ação como vacina recombinante eficaz contra a doença Mal do caroço (Rezende *et al.*, 2018).

Alguns estudos mostram que a vacina com BCG oferece resistência à infecção causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, como foi o caso do estudo com mais de 500 cabeças de animais, onde um modelo de infecção natural por *C. pseudotuberculosis* foi usado na introdução de ovinos clinicamente infectados ao rebanho. Durante aproximadamente 4 anos,

99% dos cordeiros imunizados com BCG foram protegidos do desenvolvimento da doença, demonstrando que o sistema imunológico inato de caprinos e ovinos tem a capacidade de promover resistência à linfadenite caseosa (Byrne *et al.*, 2020).

Estudos mostram que o uso do *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) como adjuvante da rPLD para o desenvolvimento de vacinas recombinantes é uma ótima opção na proteção imunológica contra diversas doenças infecciosas, proporcionando aos camundongos uma sobrevivência significativa de 66% quando são expostos a cepas de *C. pseudotuberculosis*, sendo eficiente no controle da linfadenite caseosa (Leal *et al.*, 2018).

3.5.2 Uso de CP40 como antígeno vacinal contra a LC

A CP40, uma proteína de 40 kDa de *C. pseudotuberculosis*, é uma endoglicosidase com atividade imunológica de proteína hospedeira, que tem relevante importância imunológica contra infecções e pode auxiliar no desenvolvimento contínuo de vacinas para combater a *C. pseudotuberculosis* (De Sá *et al.*, 2018). As formulas de vacinas usando a proteína recombinante CP40 sozinha ou com outras cepas vivas recombinantes ou ambos antígenos usados como técnica de reforço inicial, resultam em taxas de sobrevivência elevadas e produção significativa de anticorpos (Silva *et al.*, 2014).

Estudos mostram que o uso de CP40 associado à saponina e adjuvantes como antígeno vacinal contra *C. pseudotuberculosis* pode apresentar eficácia de até 100%, já que camundongos do grupo experimental não apresentaram sinais clínicos relacionados à infecção, demonstrando que as vacinas recombinantes conferem proteção (Droppa-Almeida *et al.*, 2016).

Plataformas vacinais têm sido desenvolvidas para melhorar a resposta imunológica específica e apresentar maiores taxas de proteção. A proteína CP40 de *C. pseudotuberculosis* foi identificada através de células secretoras de anticorpos locais presentes em linfonodos (Bastos *et al.*, 2012). Os estudos avaliados por (De Pinho *et al.*, 2024) mostram que a resposta imune de camundongos vacinados com *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur recombinante combinado com CP40 e reforçado com rCP40, apresenta uma taxa de sobrevivência de 90% após desafio com a cepa *C. pseudotuberculosis* MIC -6. Apresentando resposta imune humoral e níveis mais elevados de IL-17, sendo uma estratégia viável contra *C. pseudotuberculosis*.

3.5.3 Ensaios clínicos no desenvolvimento de vacinas contra a LC

Estudos foram realizados avaliando vacinas recombinantes por meio de testes em camundongos utilizando cepas virulentas de *C. pseudotuberculosis* para induzir proteção imunológica contra linfadenite caseosa (Rezende *et al.*, 2018). Deve-se ressaltar, no entanto, que há inúmeras diferenças entre as respostas imunológicas de camundongos e pequenos ruminantes. Além disso, muitas vezes um camundongo é desafiado com uma mesma carga de *C. pseudotuberculosis* que um caprino ou ovino, o que se reflete em alta letalidade para camundongos, enquanto que em espécies alvo isso não acontece (Moussa *et al.*, 2016; Pinho *et al.*, 2009). Adicionalmente, apesar do modelo murino ser importante para a realização de uma triagem de alvos e indicativos da capacidade protetora dos alvos vacinais, há a necessidade da confirmação da segurança e eficácia nas espécies alvos para tornar efetivamente licenciada uma vacina veterinária (Vich, 2010).

A maioria das vacinas contra a LC em que já se realizaram ensaios clínicos são vacinas consideradas empíricas ou tradicionais, como as vacinas de toxóide, vacinas vivas inativadas ou vacinas vivas atenuadas. Através de estudos com bacterinas de *C. pseudotuberculosis* ou toxóides totais com adição opcional de adjuvante em ovelhas e alpacas, observou-se imunidade de longo prazo após a infecção por *C. pseudotuberculosis* (De Pinho *et al.*, 2021). Vacinas toxóides baseadas em exotoxinas tratadas de *C. pseudotuberculosis* são amplamente descritas. O uso de exotoxinas tratadas com formaldeído ou toxóides são administrados em baixas doses de infecção na primeira imunização para conferir proteção ao animal vacinado em uma infecção subsequente, apresentando quantidades favorável de anticorpos contra exotoxinas e numerosos antígenos celulares por ELISA, o que contribui para uma diminuição da doença em ovinos (De Pinho *et al.*, 2021)

As vacinas vivas atenuadas apresentam agentes imunizantes vivos que podem se replicar no corpo sem causar doença. As primeiras vacinas vivas experimentais para LC usaram uma cepa chamada Toxminus, cujo gene *pld* foi modificado por mutação específica do local. Mediante necropsia, não foi observada a formação de abscessos nos ovinos desafiados com 10^6 UFC de cepa virulenta, em comparação ao grupo controle que pôde observar abscessos de 2,5 cm nos gânglios poplíteos; além, a vacina produziu um abscesso indesejável no local da inoculação (Domínguez *et al.*, 2021).

Um grande número de estudos empregou vacinas toxóides derivadas de fosfolipase D (PLD) inativadas com formalina, ricas em sobrenadantes de cultura de *C. pseudotuberculosis*, e estas conferiram níveis variáveis de imunidade protetora em ovelhas e cabras. Estudos realizados com base em duas vacinas combinadas preparadas a partir de células inteiras inativadas biovar 1 (origem ovina) em cada dose, e a segunda vacina composta por células inteiras inativadas biovar 2 (origem búfala) com rPLD que foram usados para a vacinação dos animais, onde a eficácia protetora foi avaliada usando cepas virulentas isoladas localmente de ovinos com LC ou búfalos com OSD. Todas as ovelhas vacinadas exibiram uma resposta de anticorpos ao antígeno rPLD, enquanto as ovelhas (controle) permaneceram negativas durante todo este período de soro. Nos grupos imunizados, os anticorpos aumentaram após a segunda dose de reforço da vacinação, mas após a exposição ao desafio, observou-se uma ligeira diminuição nos animais examinados, mas o nível de anticorpos persistiu acima do valor de corte até 20 semanas que foi o sacrifício dos animais (Moussa *et al.*, 2016).

De acordo com (Domínguez *et al.*, 2021) através dos avanços moleculares, novas vacinas foram criadas, como a vacina de DNA (plasmídeos com os genes de interesse), que não possuem envelopes ou estruturas proteicas, portanto a via de administração, a dose e a reimunização, pois são fatores importantes na resposta imune do animal. O desenho de um plasmídeo contendo o gene que codifica o domínio extracelular da CTLA-4 bovina fundido ao gene pld inativado (boCTLA-4-Hlg- Δ PLD) foi avaliado como uma vacina (DNA nu) em ovinos. CTLA-4 se liga com alta afinidade ao antígeno de membrana B7 nas células apresentadoras de antígenos (APC), aumentando a imunidade humoral. Diferentes vias de imunização foram avaliadas: intramuscular, subcutânea e bombardeio de gene gun. Os níveis máximos de anticorpos IgG totais foram de 12×10^3 no grupo vacinado por via intramuscular, enquanto nos grupos com as outras vias de administração foram atingidos valores de $3-4 \times 10^3$. A proteção conferida pela vacina administrada por via intramuscular foi de um 45% (9 de 20 animais), a diferença do resto dos grupos (via subcutânea e gene gun) que protegeram apenas 10% dos ovinos.

As vacinas veterinárias passam por testes de segurança e liberação de lotes em animais em seu controle de qualidade, além de protocolos de monitoramento para atender padrões internos de qualidade e exigências regulatórias governamentais. Esses testes são efetuados em animais de espécies-alvo ou de laboratório com dose única ou doses múltiplas do lote para detectar sinais de reações adversas locais ou sistêmicas. Atualmente, grupos de defesa do bem-estar animal e agências reguladoras continuam investigando métodos alternativos para reduzir

a sua dependência de métodos baseados em animais para testes de segurança de libertação de lotes. As abordagens que foram implementadas ou propostas incluem a harmonização dos requisitos técnicos, avance nos testes *in vitro*, o refinamento dos testes em animais existentes e a melhoria das reações adversas (vacino-vigilância) dos métodos de fabricação. Uma abordagem, conhecida como abordagem de consistência, é cada vez mais reconhecida como uma alternativa potencialmente viável para reduzir, refinar e substituir a utilização de animais nestes testes (Gifford *et al.*, 2011).

Mediante o desenvolvimento das vacinas são realizados testes de segurança em diferentes espécies para mostrar os possíveis riscos da utilização do produto sobre o estado imunológico do animal. Para isso, são levados em consideração três fatores: 1) Os animais devem estar livres de anticorpos contra vírus/bactérias/toxina etc. presente na vacina; 2) É preferível que as espécies estejam livres de imunoglobulina contra vírus/bactérias/toxinas, etc. contidos na vacina, mas podem ser utilizados animais com baixos índice de anticorpos, desde que os animais não tenham sido vacinados e a administração da vacina não provoque resposta anamnésica; e 3) Os animais não devem ser vacinados contra a doença que a vacina pretende prevenir. Como regra geral, o número 1 é específico para vacinas vivas; o número 2 é para outras vacinas e o número 3 é específico para algumas vacinas inativas onde a determinação de anticorpos antes do teste é desnecessária ou impraticável (European Pharmacopoeia, 2016).

Os critérios para vacinas veterinárias bem-sucedidas podem ser muito diferentes para vacinas humanas, dependendo da espécie em consideração. Por exemplo, os critérios para vacinas para animais de companhia são semelhantes aos das vacinas humanas, na medida em que a saúde e o bem-estar de cada animal são preocupações primárias. No caso das vacinas pecuárias, o objetivo é melhorar a produção global dos produtores primários, o custo-benefício resultante da vacinação e o resultado final para a indústria. No caso das vacinas contra infecções zoonóticas ou de origem alimentar, reduzem ou eliminam o risco para o consumidor e, em alguns casos, melhoram a produtividade de cada animal. Além de melhorar a saúde e a produtividade animal, as vacinas veterinárias têm uma repercussão significativa na saúde pública, reduzindo o manejo de produtos farmacêuticos, hormonas veterinárias e resíduos na cadeia alimentar humana. Isto constituirá um impulso crescente para a atividade com os requisitos mais rigorosos das agências reguladoras e grupos de consumidores (Meeusen *et al.*, 2007)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais e aspectos éticos

O experimento foi realizado em agosto de 2022 a fevereiro de 2023, no setor de Núcleo de estudos ovino-caprino (Figura 2) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) Mossoró – Rio Grande do Norte, Brasil, sob as seguintes coordenadas geográficas: (5° 11' 16" S, 37° 20' 38" W), as amostras foram analisadas e processadas no Laboratório de Diagnósticos em Patologia Clínica Veterinária da UFERSA. O protocolo experimental do trabalho foi devidamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA.

Figura 2: Núcleo de estudos ovino-caprino (UFERSA)



Fonte: Autor

4.2 Delineamento experimental

Neste estudo, foram utilizados doze ovinos, raça Dorper, com uma idade entre 4 e 6 meses e com um peso corporal médio de 20 ± 5 kg. Para realizar o estudo, os ovinos ficaram na área de quarentena por aproximadamente 1 mês, também foi estabelecido plano de desparasitação com doramectina (Dectomax®). A dieta das ovelhas foi sempre à base de feno, sais minerais, concentrado e água.

4.2.1 Abordagem para a criação da fórmula vacinal

4.2.1.1 Meio de cultivo da variante *M. bovis* (BCG Pasteur)

De acordo com (Marshall, 1992) O caldo base Middlebrook 7H9 foi utilizado para o cultivo da cepa *Calmette-Guérin Pasteur* do bacilo *Mycobacterium bovis* com adição de 10% de Albumina Oleica Dextrose Catalase (OADC), também 0,2% de glicerol e 0,05% de Tween80. A quantidade de BCG foi feita por meio da técnica de enumeração, apresentando em séries diluições décimais, plaqueadas e enroladas por meio de (B.O.D) a 37° Celsius por 7 dias.

4.2.1.2 Expressão proteica de rCP40 do bacilo *Pseudotuberculosis*

Para a produção das proteínas rCP40 foi utilizado o vetor pAE ou o gene cp40 sendo alterado por impacto térmico em *E. coli* BL21 com auxílio de CaCl₂ em seguida foi realizado o cultivo da bactéria recombinante em Caldo Luria-Bertani (LB) com 1 mM de IPTG, e confirmação por Western Blot, aplicando anti-6x-His em combinação com enzima sigma-peroxidase (Silva *et al.*, 2014). A proteína recombinante foi purificada usando uma coluna de cromatografia de afinidade HisTrap. Após a obtenção da proteína purificada, a pureza foi verificada por SDS-PAGE e posteriormente quantificada utilizando o kit BCA.

4.2.2 Aplicação da imunização

Os ovinos foram estabelecidos em 2 lotes, o primeiro com a quantidade de 6 ovinos que foram injetados por via subcutânea com soro fisiológico 0,9% (G1 – controle), depois o segundo grupo de 6 ovinos vacinados com *Bacillus Calmette-Guérin* em PBS e rCP40 (G2 – imunizado). Foi aplicada a quantidade de 200 µg/dose de proteína recombinante e 10⁶ UFC/dose de BCG para um volume total de 1ml. Aplicación de 2 doses da vacina foi realizada com intervalo de três semanas. Um mês após a última dose, o desafio foi realizado nos 2 lotes de ovinos, por meio da aplicação subcutânea de 1 ml da cepa MIC-6 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, começando a ser avaliado para observar eventos adversos em longo prazo.

4.3. Diagnóstico clínico

Ao final da imunização completa, foram realizados exames clínicos a cada 7 dias, totalizando 20 semanas; com o objetivo de identificar qualquer lesão, alteração ou inflamação no local da vacinação ou ao nível geral. Valores fisiológicos como ritmo cardíaco, ritmo respiratório, dinâmica ruminal e temperatura foram avaliados através da tríade clínica para detectar qualquer alteração ou diminuição nas constantes fisiológicas.

A inspeção dos gânglios linfáticos foi realizada para descartar qualquer alteração nos linfonodos, bem como possível inflamação; da mesma forma, avaliou-se a cor das mucosas ocular, nasal e da cavidade oral para conhecer a sanidade do animal. Também as ovelhas foram pesadas para determinar antecipadamente a infecção patológica, refletida no ganho ou perda de peso.

4.4 Coleta de sangue

Foram coletadas amostras de sangue dos doze ovinos em nove momentos diferentes, tendo sido a primeira coleta realizada após a aplicação da segunda dose da vacina e as outras coletas no dia 7, 14, 21, 28, 43, 58, 73 e 88 após a imunização completa. Os animais, nos dias de coleta pela manhã, encontravam-se em jejum alimentar de, no mínimo, 6 horas. Quanto à coleta de sangue, foram obtidas, de cada animal, amostras 3 a 5 ml após venopunção jugular, sendo estes distribuídos posteriormente em dois tubos: um sem anticoagulante, para obtenção de soro, e outro com EDTA, para realização de hemograma. Todas as amostras foram analisadas em um período máximo de 4 horas após a coleta.

4.5 Realização do Hemograma

4.5.1 Eritrograma

Para a realização do Eritrograma, foi utilizado o sangue que se encontrava no tubo com anticoagulante EDTA. Para a contagem das hemácias, foram diluídos 5 µl de sangue em 2 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%. A contagem dos 5 quadrantes centrais foi feita com auxílio do hemocítômetro, sendo o valor multiplicado por 20.000 e obtendo assim, o número total de hemácias em milhões.

A hemoglobina foi mensurada em analisador bioquímico semiautomático utilizando kit comercial específico. Para avaliação do hematócrito foi necessário preencher um capilar submetido à centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm. Com a ajuda de dados adquiridos para hemácias, hematócrito e hemoglobina, foram calculados os índices hematimétricos do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). No caso do fibrinogênio e proteína plasmática, os capilares foram colocados em banho-maria a 56° Celsius por 5 minutos e posteriormente centrifugados por 3 a 5 minutos a 1500 rpm, apenas os capilares para leitura do fibrinogênio, já que os capilares com leitura de proteínas plasmáticas totais não precisam.

4.5.2 Leucograma

No Leucograma, a contagem de leucócitos foi feita em hemocítômetro, após diluição de 10 µl de sangue total em 200 µl de líquido de Türk, em seguida foram colocados 40 µl da solução na câmara de Neubauer nos quatro quadrantes externos, sendo o valor multiplicado por 50 e obtendo assim, o número total de leucócitos.

4.6 Análise bioquímica

Para análise da bioquímica sérica, as amostras de sangue do tubo sem anticoagulante foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm. Ao fim da centrifugação, o soro foi retirado com pipeta e aliqotado em microtubos para análise bioquímica, onde foi mensurado com os produtos químicos: Proteína total (g/dl) e Albumina (g/dl). As análises bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico semiautomático (BIOPLUS 2000 ®; Mossoró RN, Brasil), utilizando kit comercial específico da marca Vida Biotecnologia®, mediante as recomendações do fabricante.

4.7 Análise estatística

Foi realizado por meio de estatística descritiva, calculando a tendência central e para cada grupo a média ou mediana. Cada um dos dados coletados foi levado ao teste T-student, para cálculo de indicadores significativos dos dois lotes de ovinos em estudo. O nível de significância estabelecido foi de 0,05 (Pereira, 2023) com exceção da análise bioquímica que foi de 0,03.

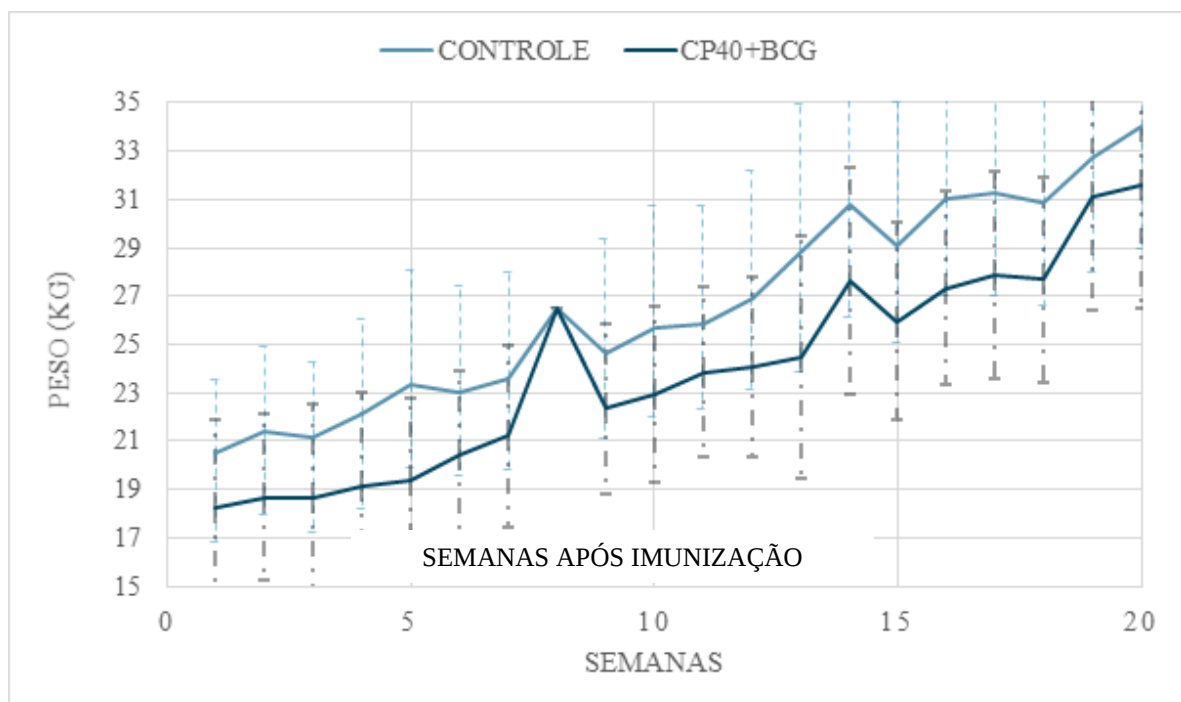
O método mais adequado para o estudo dos valores analíticos foi mediante a facilidade de cada medida em demonstrar os resultados alcançados. A possibilidade que a média seja influenciada por valores extremos, poderia criar alterações analíticas, por outro lado, a mediana não sofre alteração nos valores extremos das distribuições assimétricas, o que a torna mais propícia ao estudo dos dados (Duquia; Basto, 2006, p. 193), desta forma, alguns dados foram feitos com a média e outros demonstrados com a mediana (Pereira, 2023).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Medição de indicadores clínicos

Os resultados de peso obtidos das ovelhas ao longo de 20 semanas de monitoramento após o esquema completo de vacinação são observados no (Gráfico 1). No estudo, foram observadas alterações significativas nas ovelhas ao longo do tempo. Foi confirmado ao longo do estudo que os ovinos do lote 1 obtiveram maior ganho de peso em relação aos ovinos do lote 2. Levando em consideração que através da análise T-student não foram encontradas alterações nos dados de peso dos animais ($p>0,05$).

Gráfico 1 - Pesagem de ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas

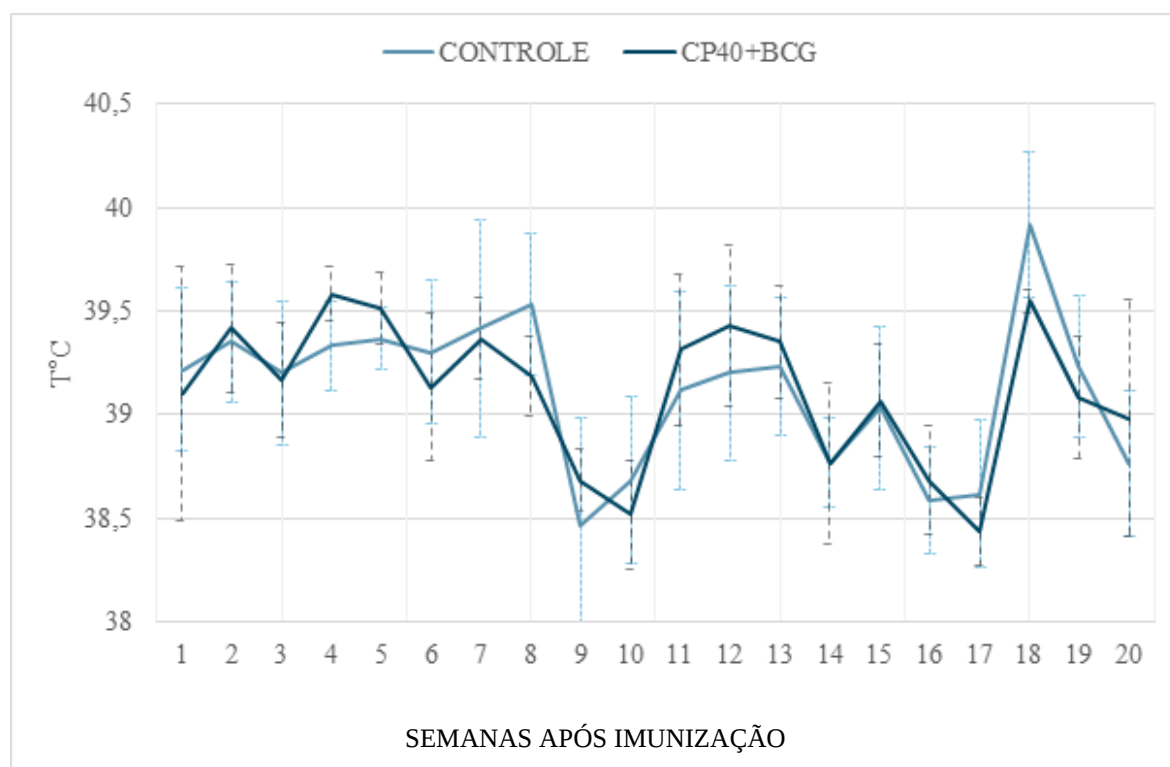


(Pereira, 2023)

Quanto à média de temperatura retal dos ovinos durante as 20 semanas analisadas (Gráfico 2), em geral os animais apresentaram temperaturas dentro da faixa normal para ovinos, que varia entre 38,5 e 40,5°C (Ítavo *et al.*, 2011).

As variações dos lotes foram discretas, sem significância ($p>0,05$) entre os dois grupos, isso significa que a vacina não tem efeito significativo na temperatura das ovelhas que indique alteração no sistema imunológico. Foi confirmado que algumas ovelhas isoladas apresentaram valores térmicos abaixo do parâmetro de 38,5°C. Estas alterações foram específicas, sem a presença de outras variações clínicas nos ovinos (Ítavo *et al.*, 2011). Porém, no estudo apresentado por (Serrano *et al.*, 2020) ocorre o contrário, os animais apresentaram alterações de temperatura, provocando estresse térmico (Seixas *et al.*, 2017) devido à mudança na temperatura ambiente.

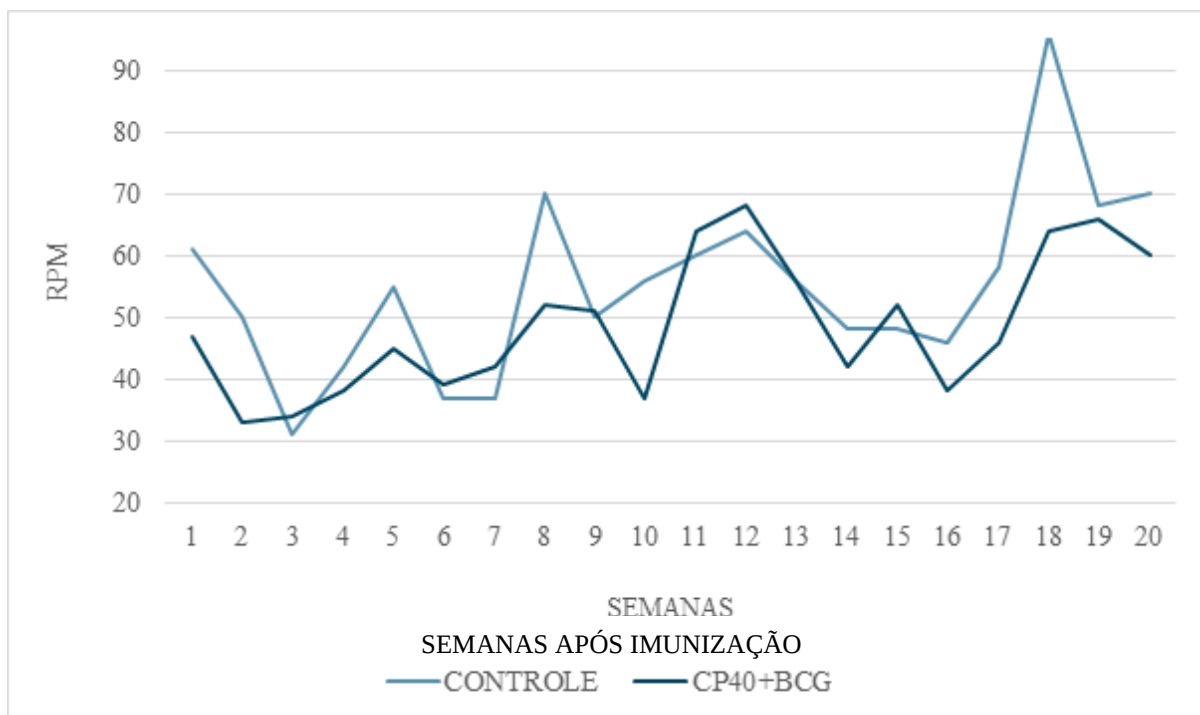
Gráfico 2 - Temperatura retal das ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas



(Pereira, 2023).

Os ovinos não apresentaram alterações respiratórias típicas de *Mycobacterium pseudotuberculosis* (Gráfico 3). Segundo (Cezar *et al.*, 2004) os valores de frequência respiratória estão na faixa normal para ovinos, que está entre (12 – 60 respirações/min). Tendo irregularidade apenas na semana 18, com duas ovelhas do grupo controle com dados superiores, acima de 80 (Pereira, 2023). Provavelmente, quando os ovinos foram contidos para inspeção clínica, houve um rápido aumento da frequência respiratória, sem influência das condições de estresse térmico (Ítavo *et al.*, 2011).

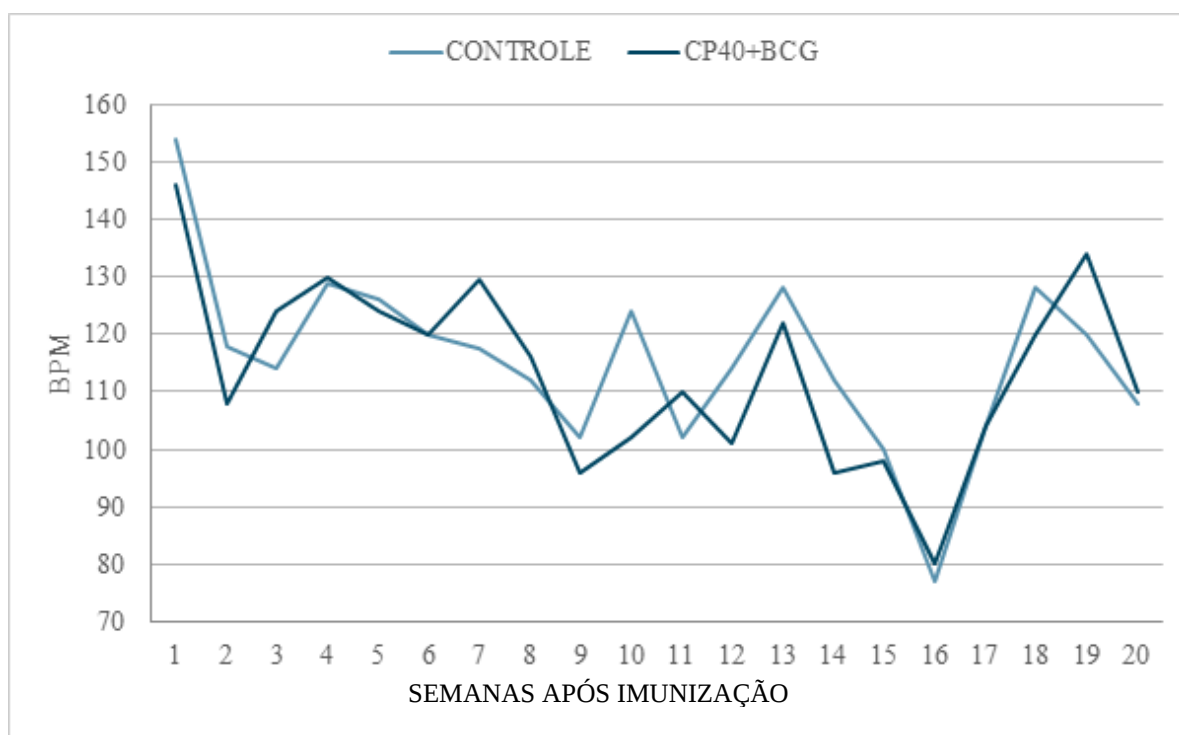
Gráfico 3 - Monitoramento respiratório das ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas



(Pereira, 2023).

Os valores encontrados para a frequência cardíaca em ovinos foram (70 a 120 batimentos/min) conforme (Cezar *et al.*, 2004). Porém, (Santos *et al.*, 2006) encontraram taxas entre (122 - 144 batimentos/min), superiores às deste estudo. Ao avaliar as constantes fisiológicas, determinados animais apresentaram sinais cardíacos levemente alterados, devido a diferenças individuais entre os animais. Provavelmente, no ato de segurar os ovinos para avaliação clínica, ocorreu uma pequena alteração cardíaca (Ítavo *et al.*, 2011). Segundo (Santos *et al.*, 2006) a frequência cardíaca é uma variante devido a diversos fatores, como idade, individualidade, temperamento e nível de excitação das ovelhas.

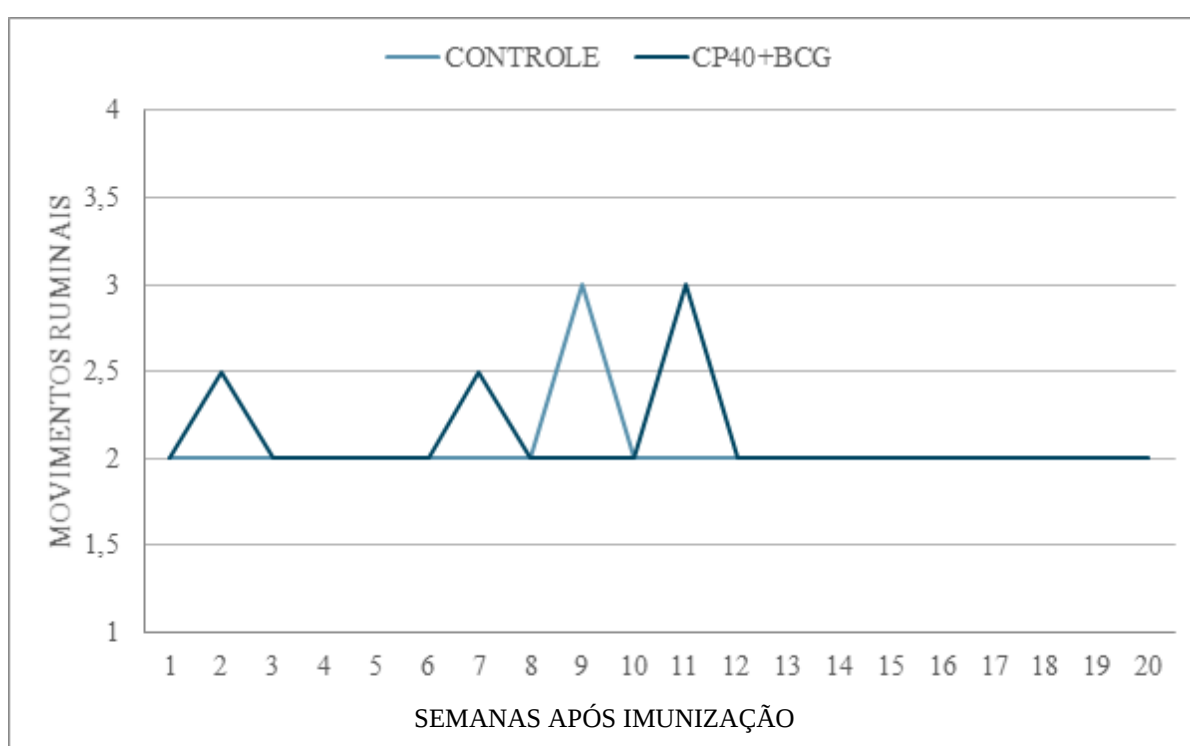
Gráfico 4 - Pulso cardíaco das ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas



(Pereira, 2023)

Os dados obtidos e refletidos no (Gráfico 5) relativos aos movimentos peristálticos, mostram que não existe desigualdade estatística ($p>0,05$) nas ovelhas em estudo (Pereira, 2023). Os dois grupos de ovinos apresentam valores normais entre 1 a 2 circulações peristálticas ruminais por minuto (De Faria, 2010).

Gráfico 5 – Movimentos peristálticos das ovelhas do grupo controle e vacinados com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 20 semanas



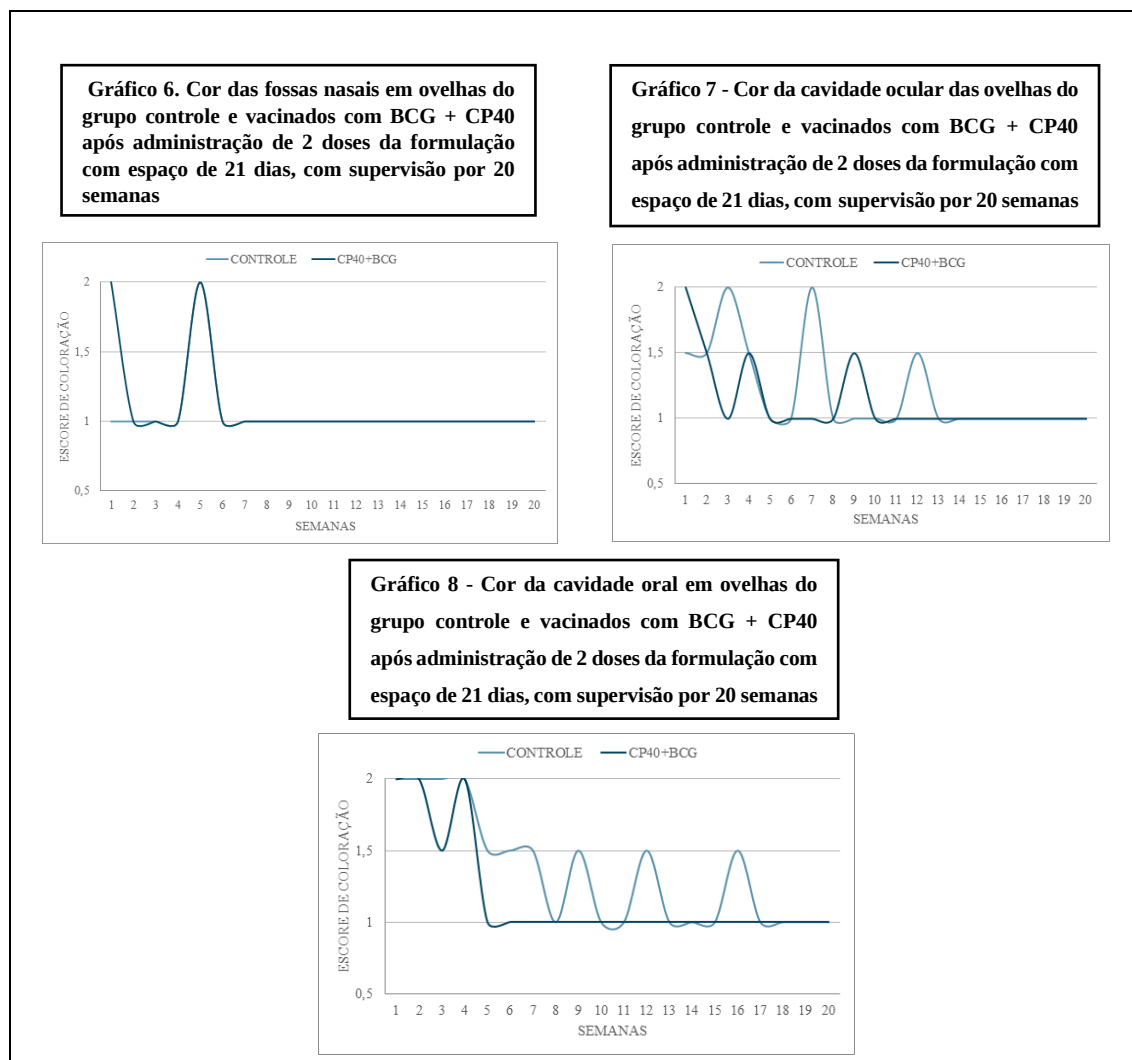
(Pereira, 2023)

Durante as 20 semanas do estudo para inspecionar o estado das mucosas: Nasal, ocular e oral. Foram obtidos dados que estão representados nos gráficos a seguir. Com base nestes resultados, observou-se uma variação durante as primeiras semanas do teste, coincidindo com o facto de a desparasitação dos animais ainda não ter sido concluída. Os resultados mostram que não há variação estatística significativa nas ovelhas (Pereira, 2023)

No gráfico 6 pode-se analisar que os animais durante a semana 5 de avaliação foram observados com mucosas pálidas, diferentemente do tempo anterior, onde a cor estava na faixa normal. Alterações como essas podem indicar que há variação na saúde das ovelhas. No entanto, este aumento refletido na semana 5 não é estatisticamente significativo (Pereira, 2023)

Através da inspeção foi possível identificar alterações da mucosa ocular nas semanas 3 e 7 do grupo controle (Gráfico 7), diferentemente do grupo vacinado, que permanece dentro da normalidade. No (Gráfico 8) durante as primeiras semanas pode-se observar uma alteração na mucosa oral de ambos os grupos, levando em consideração que a partir da semana 8 os animais no grupo controle apresentaram variações periódicas, mas não estatisticamente significativas, diferentemente do grupo vacinado, que permaneceu dentro da normalidade. Isto significa que a vacina recombinante com BCG e CP40 é uma alternativa eficaz para melhorar a proteção em pequenos ruminantes.

Gráficos 6, 7, 8 - Coloração da mucosa nasal, ocular e oral dos ovinos em estudo

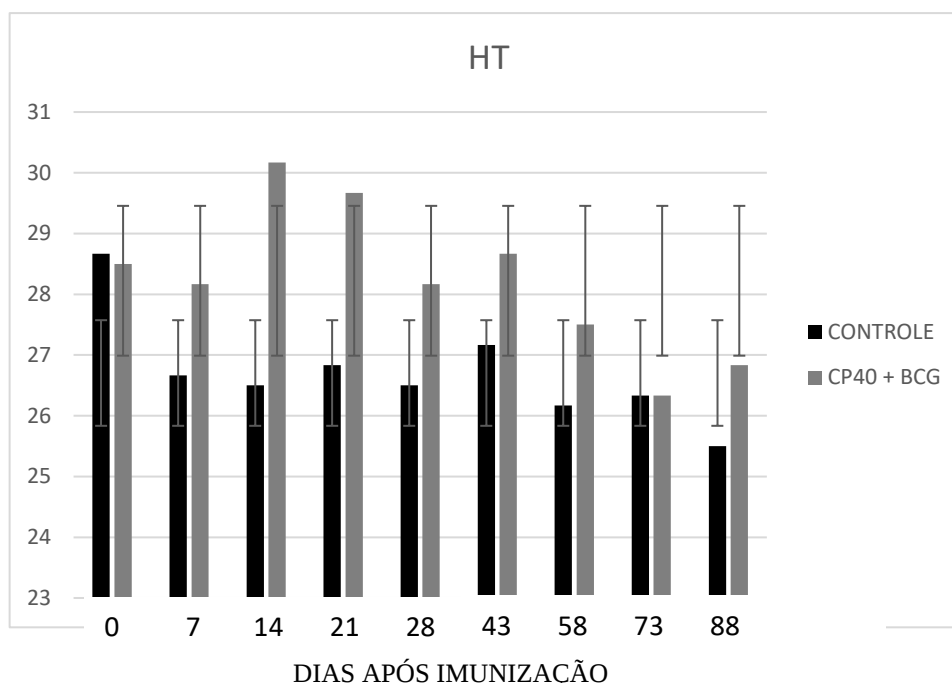


(Pereira, 2023)

5.3. Avaliação dos parâmetros hematológicos

Os resultados do hematócrito obtidos no estudo dos animais por um período de 3 meses de monitoramento estão refletidos na (gráfica 9). Através do qual não foram observados dados significativos, com exceção do animal nº 3 do G1 (controle) que apresentou pequena diminuição do rango normal de hematócrito. Foi confirmado mediante análise laboratorial que as ovelhas do G2 apresentaram valores de hematócrito mais elevados em comparação às ovelhas do G1. Levando em consideração que através do teste T-Student foram encontradas variações notáveis nos dados de hematócrito nos animais do estudo ($p > 0,05$).

Gráfico 9 – Resultados de Hematócrito (HT) das ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses

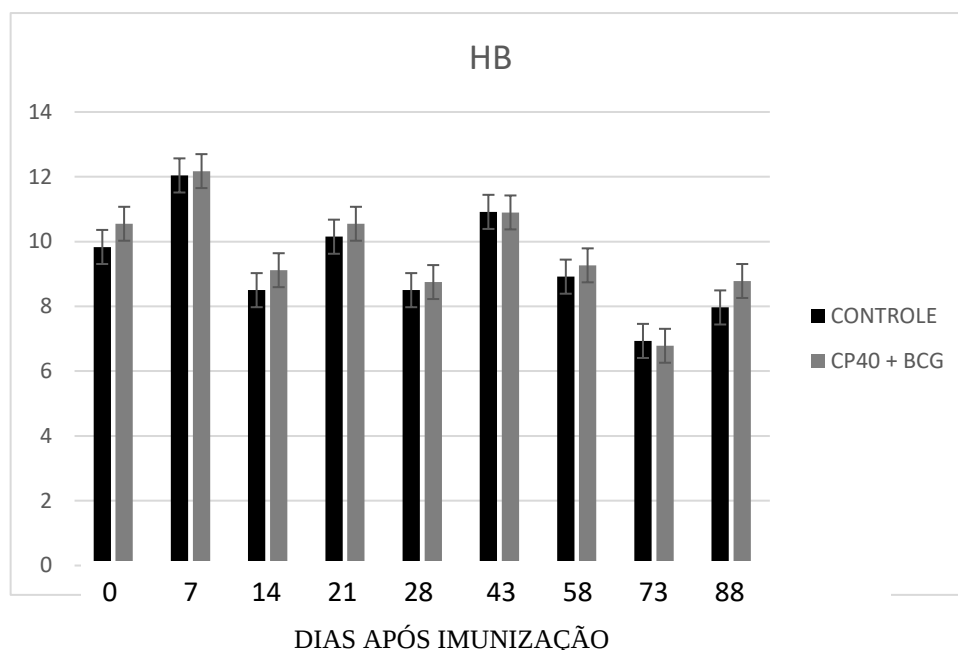


Fonte: Autor

Quanto os resultados da hemoglobina das ovelhas no período de 3 meses de análise (Gráfico 10), no geral quase a maioria dos ovinos apresentou valores de hemoglobina na faixa normal para esta espécie, que é (8 – 16 g/dL) segundo (Jain, 1993, p. 417; Meyer; Harvey, 2004, p. 351). Exceto alguns ovinos analisados no dia 73, que apresentaram anemia.

A variância estatística dos 2 lotes foi moderada e, portanto, não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) do G1 - G2, exceto no dia 88 do G2 em comparação ao G1 com diferença significativa ($p > 0,05$). Tudo foi ao contrário com (Odhah *et al.*, 2017) onde a concentração de Hb indicou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nas semanas 2, 3 e 12 do lote C em comparação do lote controle.

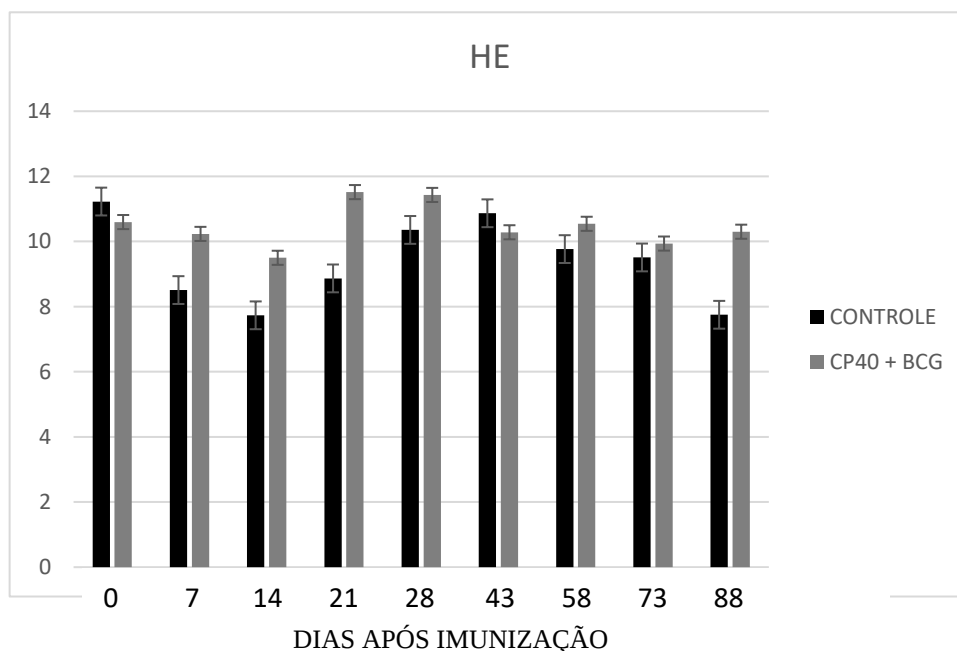
Gráfico 10 - Resultados da Hemoglobina (HB) nas ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses



Fonte: Autor

Através dos dados hematológicos apresentados no (Gráfico 11), nenhum ovino do G2 (vacinado) apresentou diminuição das células sanguíneas devido ao patógeno, diferentemente do G1 (Não vacinado) onde alguns animais foram observados com níveis baixos de hemácias refletido nos resultados dos dias 7, 14, 21 e 88 (Gráfico 11), tendo em conta que o intervalo de referência é (8 – 16 milhões/mm³) citado por (Jain, 1993, p. 417; Meyer; Harvey, 2004, p. 351). Foi encontrada uma diferença significativa ($p > 0,05$) na contagem de hemácias do Grupo 2 em comparação ao Grupo 1.

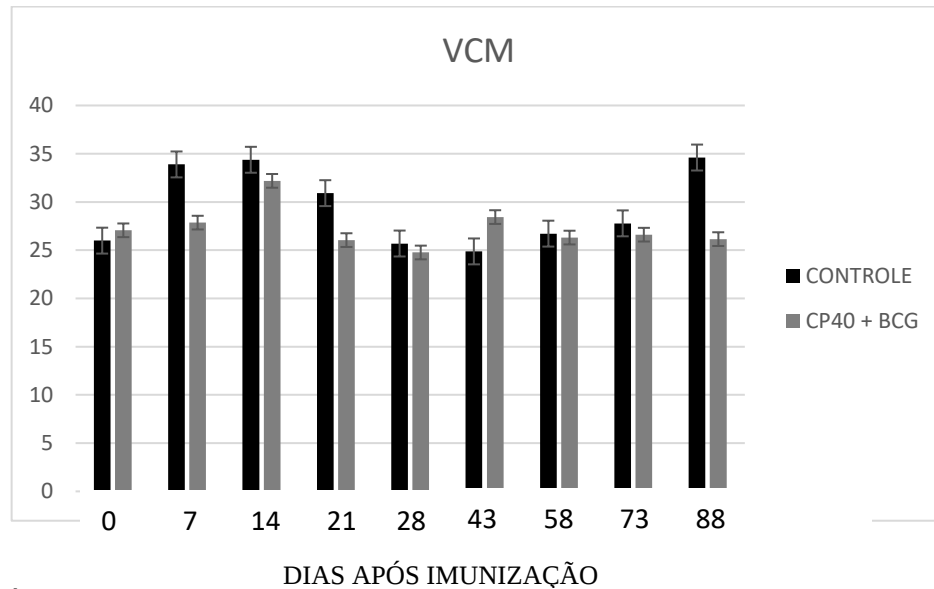
Gráfico 11 - Resultados da Hemácias (HE) nas ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses



Fonte: Autor

Em relação ao Volume Corpuscular Médio (VCM) no (Gráfico 12), o G1 apresentou uma alteração significativa ($p > 0,05$) nos dias 7, 14, 21, 28 e 88. E uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no dia 43 e 73 em comparação ao G1. As taxas ficaram nas faixas consideradas saudáveis em ovinos, sendo de aproximadamente (Ref. 23 – 48 fL) de acordo com (Jain, 1993, p. 417; Meyer; Harvey, 2004, p. 351).

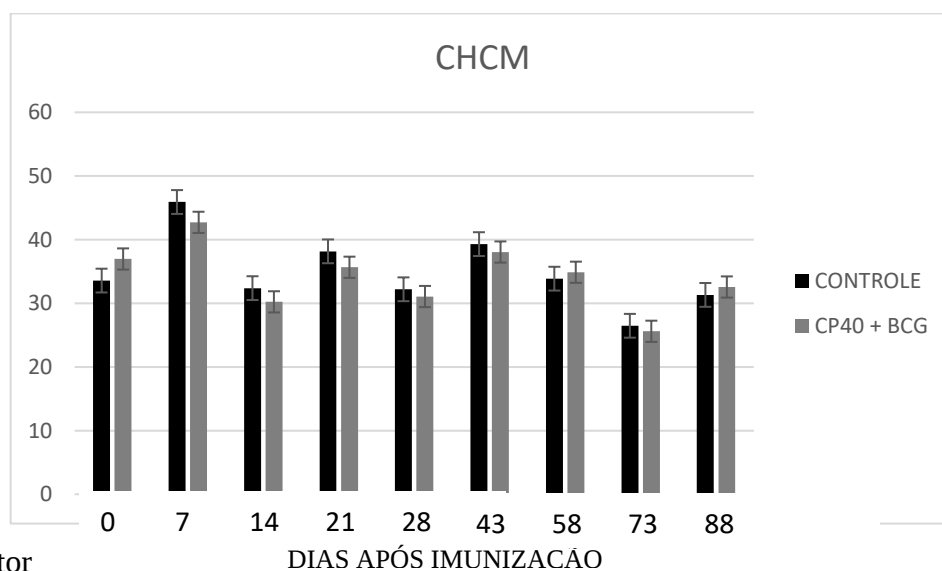
Gráfico 12 - Resultados do Volume Corpuscular Médio (VCM) nas ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses



Fonte: Autor

Através da análise, um número notável de ovinos do G1 apresentou valores de Concentração Corpuscular Média de Hemoglobina (CHCM) com uma alteração significativa ($p > 0,05$) nos dias 7, 14, 28 e 43, em comparação ao G2 que só apresentaram nos dias 0, 21, 58 e 88 (Gráfico 13).

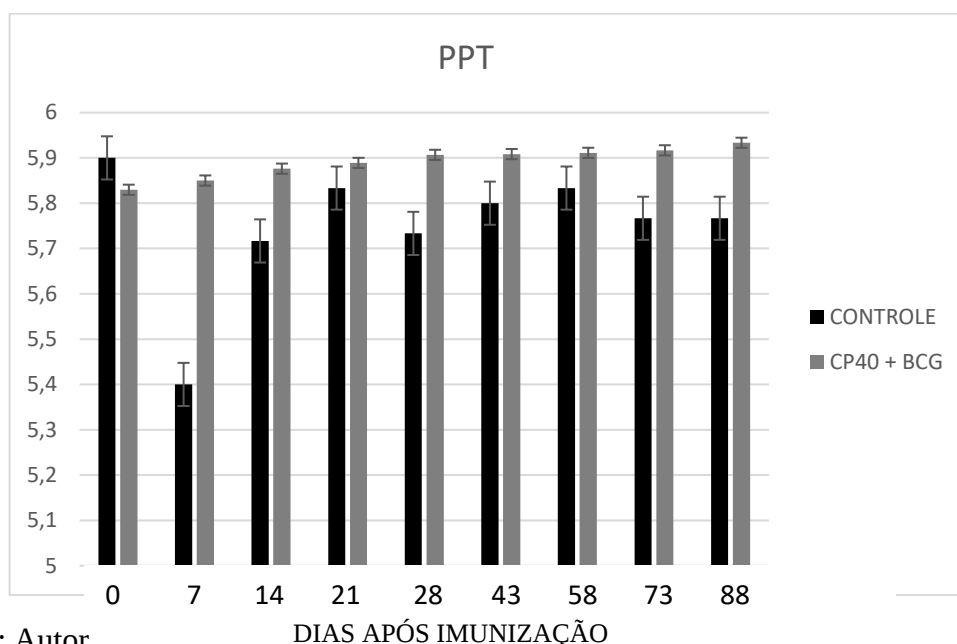
Gráfico 13 - Resultados da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses



Fonte: Autor

No (gráfico 14) é possível observar os valores da proteína plasmática total dos ovinos ao longo de dois meses de experimento, apresentando valores em sua maioria baixos, principalmente no lote 1, no dia 7 do experimento, levando em consideração que o intervalo de referência é (6 – 7,5 g/dL) citado por (Kaneko et al; 1997; Meyer; Harvey, 2004, p. 351; Blood; Radostite, 1991, p. 1263). Não foram encontradas variações estatísticas significativas entre lotes de animais ($p>0,05$). Da mesma forma, (Odhah *et al.*, 2017) no seu estudo mostra que o Grupo B revelou uma diminuição significativa ($p<0,05$) nas semanas 2 e 10 com base no grupo de controle.

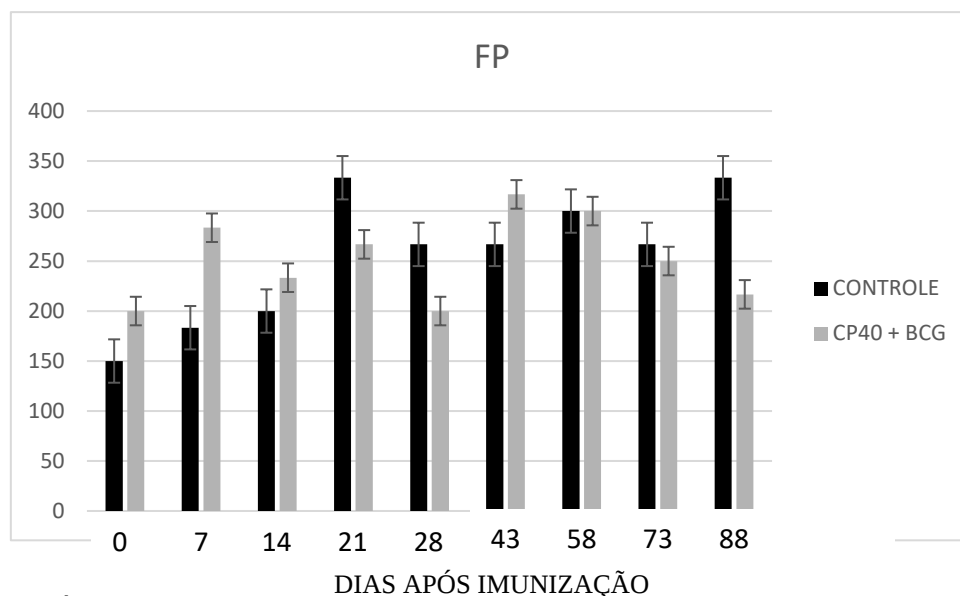
Gráfico 14 - Resultados da Proteína Plasmática totais (PPT) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses



Fonte: Autor

Em relação ao resultado do fibrinogênio plasmático (FP) no (Gráfico 15), no G2 apresenta uma alteração significativa ($p>0,05$) nos dias 7, 14, 43, 73 e 88 em comparação ao G1, em quanto o G1 apresentam alteração significativa ($p<0,05$) só nos dias 21 e 28 pôs desafio. Todos apresentam dados normais, que são de (100 – 500 mg/ dL) conforme a (Kaneko *et al*; 1997; Meyer; Harvey, 2004, p. 351; Blood; Radostitis, 1991, p. 1263).

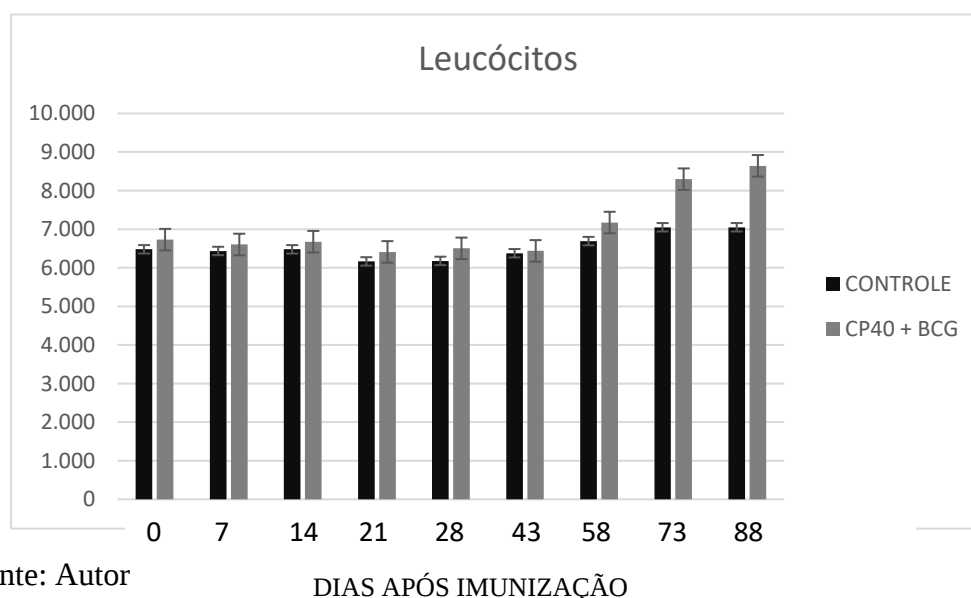
Gráfico 15 - Resultados de Fibrinogênio Plasmático (FP) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses



Fonte: Autor

De acordo com a quantidade de leucócitos em ovinos (Gráfico 16), os dados ficaram no rango normais em ovelhas, sendo o valor de referência de (4 – 12 mil/mm³) segundo (Jain, 1993, p. 417; Meyer; Harvey, 2004, p. 351). Porém, o aumento significativo ($p > 0,05$) foi nos dias 73 e 88 em relação ao G1 (controle).

Gráfico 16 - Resultados de Leucócitos (Le) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses

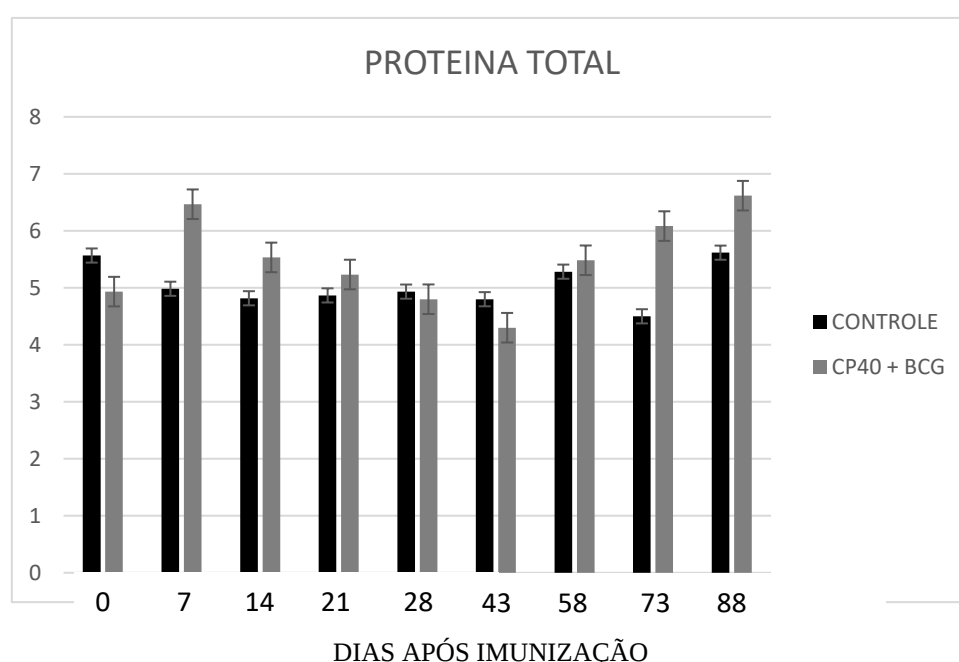


Fonte: Autor

5.4. Valorização dos indicadores bioquímicos

Através da análise bioquímica foi possível identificar algumas diminuições na proteína total nos 2 grupos (G1 – G2) refletidas não (Gráfico 17) com diferença significativa ($p>0,03$), devo ressaltar que os dados referenciais para o as proteínas totais são (6 - 7,5 g/dL) de acordo com (Kaneko et al; 1997; Meyer; Harvey, 2004, p. 351; Blood; Radostite, 1991, p. 1263).

Gráfico 17 - Resultados da Proteína Totais (PT) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses

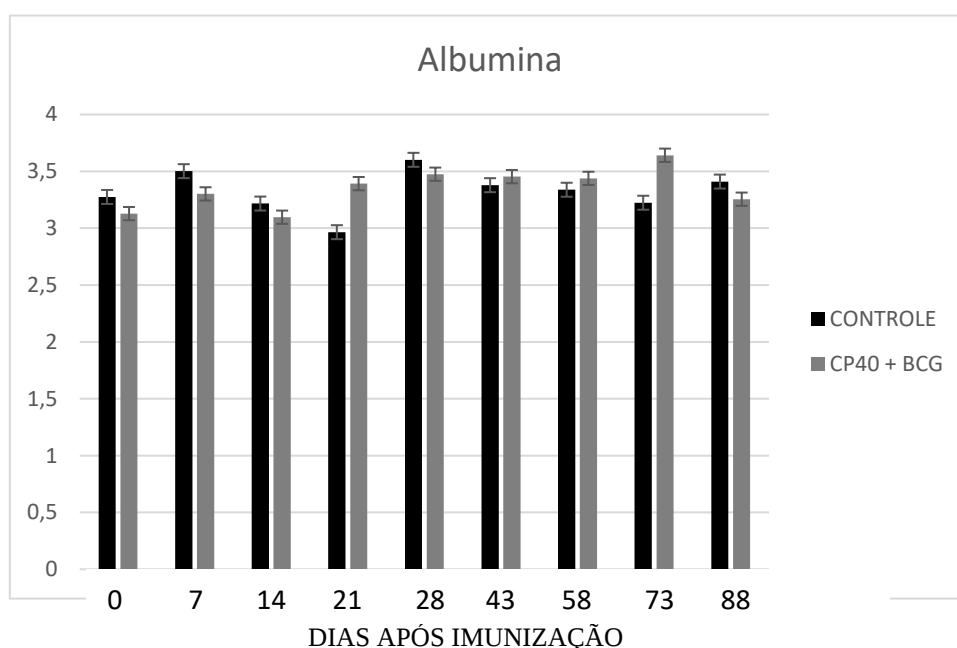


Fonte: Autor

Através da análise bioquímica foi identificado aumento de albumina nas ovelhas do (G1 – G2) (Gráfico -18) com uma diferencia significativa ($p>0,03$). Em comparação os dados normais para albumina (2,4 – 3,0 g/dL) citados por (Kaneko *et al*; 1997; Meyer; Harvey, 2004, p. 351; Blood; Radostitis, 1991, p. 1263). O aumento de albúmina é possível, devido ao grau de suscetibilidade e tolerância ao processo infeccioso, apresentando resposta imunológica aos processos inflamatórios, da mesma forma, não se pode descartar uma possível e leve desidratação horas antes da coleta nos ovinos, o que influencia ao aumento (Bustamante *et al.*, 2016). De acordo com (Doria *et al.*, 2014) as alterações da albumina podem ser decorrentes do manejo nutricional que os animais receberam antes e durante o estudo.

No entanto, o nível de albumina foi significativamente baixo e paralelo em ovinos infectados com CLA (Mahmood *et al.*, 2015). Em relação às concentrações de albumina, estudos semelhantes apresentam valores de $3,83 \pm 1,46$ g/dL para ovinos (Doria *et al.*, 2014). Esses valores são semelhantes aos descritos por (Avellanet *et al.*, 2007) em ovinos da raça Xisqueta ($3,48 \pm 0,60$ g/dL). Estas diferenças nas concentrações séricas de albumina podem ser devidas a ligeiros graus de desidratação que permitem uma diminuição do volume plasmático e, portanto, da concentração proteica (Doria *et al.*, 2014).

Gráfico 18 - Resultados da Albumina (AB) em ovelhas do grupo controle e vacinadas com BCG + CP40 após administração de 2 doses da formulação com espaço de 21 dias, com supervisão por 3 meses



Fonte: Autor

Quadro 2: Avaliação de linfonodos alterados em ovinos com tratamento variado, com ovelhas imunizadas com BCG + CP40 após 2 aplicações com intervalo de 3 semanas e inspecionados por 5 meses

Nódulo Linfoide	G1: Controle	G2: CP40 + BCG
Parotídeo	0/6	1/6
Retrofaríngeo	1/6	0/6
Submandibular	1/6	0/6
Mediastinal	0/6	2/6
Pré-escapular	1/6	2/6
Pré-femoral	0/6	0/6
Poplíteo	2/6	1/6
Inguinal	1/6	1/6

O resultado é demonstrado no aumento do número de linfonodos nas 6 ovelhas (G1: controle) e nas 6 ovelhas (G2: CP40 + BCG) que foram desafiadas.

Todas as ovelhas tanto do G1 como do G2 expressaram um ligeiro aumento nos linfonodos externos, sem apresentar variações estatisticamente significativas com base no aspecto inflamatório nodular ($p > 0,05$), porém não houve abscedação dos mesmos, e com o tempo voltou ao tamanho normais. Cabe mencionar que o aumento do tamanho dos linfonodos é um processo comum que ocorre frente a diversos tipos de patógenos e que pode estar associado a outros fatores além da vacina

Entretanto, não se sabe até que ponto a linfadenite caseosa pode influenciar nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, e se essas alterações podem ou não ser utilizadas como possíveis biomarcadores de infecção por esta bactéria (Nicoleti *et al.*, 2022). Visto que (Fidelis *et al.*, 2016) menciona que as fases crônicas da *Corynebacterium pseudotuberculosis* e outras patologias apresentam menores variações nas concentrações de elementos séricos e de células sanguíneas do que as infecções agudas.

Neste trabalho, grande parte dos componentes hematológicos não apresentou variação estatística notável nos ovinos, bem como a baixa presença de alterações cutâneas no G1; isso pode estar relacionado à origem desconhecida das ovelhas, onde provavelmente foram expostas ao microrganismo, ocasionando uma possível imunização incompleta contra a bactéria. O mediante descrito por (Al-Gaabary *et al.*, 2009) onde mostra que ovelhas com menos de 1 ano de idade representam menor prevalência de linfadenite caseosa em comparação com ovelhas com mais de 1 e 2 anos de idade, isso pode ser devido à transmissão imunológica materna.

Atualmente, nossa pesquisa é uma das primeiras a estimar a eficácia imunológica da fórmula rCP40 e BCG em ovinos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A realização de estudos em espécies alvo é eficaz para conhecer o grau imunológico de novas criações vacinais (De Pinho *et al.*, 2021). Até agora, métodos baseados em proteínas recombinantes têm sido utilizados como vacinas de subunidades contra o desafio da linfadenite caseosa, para aumentar a proteção imunológica (Bezerra *et al.*, 2020; Rezende *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2018)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo clínico, hematológico e bioquímico de ovinos imunizados e não imunizados utilizando a fórmula rCP40 e BCG indica que a vacina não modifica os valores clínicos, hematológicos e bioquímicos, com exceção das hemácias e da proteína plasmática total, que apresentaram diminuição em relação aos valores normais, por outro lado, com a concentração de hemoglobina corpuscular média e albumina, ocorreu o contrário, ou seja, apresentou alteração baseada nos valores normais. Desta forma, a formulação vacinal composta por rCP40 e *M. bovis* BCG Pasteur foi eficiente na aplicação em ovinos durante os 3 meses.

Também, recomenda-se que mais estudos com fórmulas vacinais contra linfadenite caseosa sejam realizados em pequenos ruminantes, com o objetivo de desenvolver e aprimorar vacinas com maior eficácia e melhor segurança para as espécies.

7 REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, J. F. F. *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. **Microb Pathog.** v. 139, p. 103852, 2020.
- ALENCAR, S. P. *et al.* (2010). Perfil Sanitário Dos Rebanhos Caprinos E Ovinos No Sertão De Pernambucano. **Ciência Animal Brasileira.** 11(1). p. 131–140. Disponível em: <https://doi.org/10.5216/cab.v11i1.4051>. Acessado em março de 2023
- AL-GAABARY, M.H. *et al.* Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Ruminant Research.* v. 87, ed. 1-3, p. 116 – 121. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.10.008> >. Acessado em março de 2023.
- ALVES, F. S. F. *et al.* (2007). Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Embrapa.** p. 1 - 60. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPC/20869/1/doc74.pdf> Acessado em março de 2023.
- ANDRADE, J. S. L. D. (2007). **Linfadenite caseosa em ovinos e caprinos criados nas micro-regiões de Piancó e Itaporanga-PB:** inquérito e fatores de risco associados à doença. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/handle/riufcg/25322>>. Acessado em março de 2023.
- AVELLANET, R. *et al.* Parámetros hematológicos y bioquímicos clínicos en la raza ovina Xisqueta. **Arch. Zootec.** v. 56, n. 1, p. 497 – 501. 2007. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/495/49509922.pdf>>. Accesado em janeiro de 2024.
- BACKES, A. P. *et al.* Estudo retrospectivo de casos de linfadenite caseosa diagnosticados pelo laboratório de patologia veterinária no período de 2012 a 2017. **FAG.** v. 2, n. 1, p. 1 – 5, maio, 2018.
- 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. *et al.* Propriedades imunoproláticas da proteína de fusão MBP:PLD:CP40 derivada de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 106, p. 8035–8051, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12279-1> Acessado em outubro de 2023.

BASTO, B. L. *et al.* Concentrações de haptoglobina e fibrinogênio e contagens de leucócitos na investigação clínica de linfadenite caseosa em ovinos. **Veterinary Clinical Pathology**, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2011.00355.x>

BASTO, B. L. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Clinical & Cellular Immunology**, v. 4, n. 005, p. 9, 2012.

BEZERRA, B. F.S. *et al.* A combinação da própolis vermelha brasileira e da proteína recombinante rCP01850 na imunoprolaxia da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em camundongos. **Patogênese Microbiana**. v. 149, p. 104 – 354. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104354>. Acessado em janeiro, 2024.

BILLINGTON, J. S. *et al.* Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiol Lett**. v. 208, n. 1, p. 41-45, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11934492/>. Acessado: 24 de jul, 2023.

BLOOD, D. C., RADOSTITS, O. M. Clínica Veterinária. 6. ed. 1991, 1263p.

BRUM, A. A. *et al.* Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 635–642, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28516859>. Acesso em: 13 out, 2023.

BUSTAMANTE, M. DE J. *et al.* Determinación del Perfil Metabólico Durante el Periodo Gestación-Lactancia en Hembras Ovinas de Pelo en Córdoba, Colombia. **Revista de la facultad de ciencias veterinarias**. v. 57, n. 2, p. 114 – 124, dez. 2016. Disponível em: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762016000200005. Acessado em janeiro, 2024.

BYRNE, K. A. *et al.* Innate Immunomodulation in Food Animals: Evidence for Trained Immunity?. **Front Immunol**. v. 11, p. 1099, 2020.

CARMO, F. B. *et al.* Prevalência De Anticorpos Contra A Linfadenite Caseosa Em Criações Comerciais De Ovinos No Distrito Federal, Brasil. **Arquivos Do Instituto Biológico**. v. 79, n. 2, p. 293–296, 2012. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/950142>. Acessado em outubro de 2023.

CEZAR, M. F. *et al.* AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE OVINOS DORPER, SANTA INÊS E SEUS MESTIÇOS PERANTE CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DO TRÓPICO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 614-620, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/qwhxJcQt3rK3fGbmjtyCP4G/?lang=pt>. Acessado em março de 2023.

CRUZ, G. R. B. *et al.* Aspectos sanitários na produção de caprinos e ovinos de produtores familiares no Semiárido Paraibano. **Revista Conexão UEPG**, v. 15, n. 2, p. 129-134, 2019. Disponível em: <https://revistas.uepg.br/index.php/conexao/article/view/12780/209209210884>. Acesso em março de 2023.

DE FARIA, M. A. E. *et al.* Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. **Trop Anim Health Prod**, v. 51, p. 745–752, 2018.

DE FARIA, W. G. **Aspectos fisiológicos de ovelhas Santa Inês alimentadas com distintas dietas durante dois períodos climáticos em Pedro Leopoldo–MG**. Dissertação (Mestrado em produção animal) Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, MG. 2010. Disponível em: <https://vet.ufmg.br/tese-e-dissertacao/aspectos-fisiologicos-de-ovelhas-santa-ines-alimentadas-com-distintas-dietas-durante-dois-periodos-climaticos-em-pedro-leopoldo-mg/>. Acessado em abril de 2023

DE PINHO, R. B. *et al.* *Mycobacterium bovis* BCG expressando as proteínas CP40 ou CP09720 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* promove proteção em camundongos após desafio. **Vaccine**. v. 42, n. 1, p. 33 – 39, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.11.049> >. Acessado em janeiro de 2024

DE PINHO, R. B. *et al.* Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 105, n. 6, p. 2287 – 2296, 2021.

DE SÁ, A. M. D C. *et al.* Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: Revisão. **Pubvet**, v. 12, n. 11, p. 1 - 13, 2018.

DOMINGUEZ, R. M. C. *et al.* Linfadenitis caseosa: factores de virulencia, patogénesis y vacunas. Revisión. **Rev Mex Cienc Pecu**, Toluca – Mexico, v. 12, n. 4, p. 1221 – 1249, 2021.

DORELLA, F. A. *et al.* Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Rev Vaccines**. v. 8, n. 2, p. 205–213, 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14760584.8.2.205?scroll=top&needAccess=true>>. Acessado: 22 may, 2023.

DORELLA, F. A. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**. v. 37, n. 2, p. 202 – 218, 2006.

DORIA, G. C. *et al.* Variación de las concentraciones séricas de glucosa y proteínas durante el día en ovinos de diferente sexo. **Revista de Medicina Veterinária**. V. 1, n. 28, p. 57 – 66. 2014. Disponível em: <<https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1199&context=my>>. Acessado em janeiro, 2024.

DROPPA-ALMAIDA, 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.

DUQUIA, R. P., & BASTOS, J. L. D. Medidas de tendência central: onde a maior parte dos indivíduos se encontra. **Scientia Medica**, v. 16, n. 4, p. 190-94, 2006. Disponível em: <<https://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/view/2287/1787>> Acessado em novembro de 2023.

EMBRAPA. **Linfadenitis Caseosa (LC)**: Centro de inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. 2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/zoossanitario-linfadenite>>. Acesso em: 03 jul, 2023.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **For vaccines and immunological veterinary medicinal products**. 1era revision, edition 2016.

FACCIOLI-MARTINS, P. Y. *et al.* **Linfadenite caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle**. 1 a edição on line - CGPE – 11548. Sobral – CE: 2014. p. 1 – 69, v. 1.

Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/117061/1/CNPC-2014-Linfadenite.pdf>>. Acessado: 01 jul, 2023.

FARMPOINT. **Biodectin da Fort Dodge é solução para proteger os ovinos**. 2009. Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/parceiros/novidades/biodectin-da-fort-dodge-e-solucao-para-protoger-os-ovinos-51162n.aspx>>. Acessado: 05 jul, 2023.

GASCOIGNE, E. *et al.* Atualização em linfadenite caseosa em ovinos. **In practice**. v. 42, p. 105 – 114, 2020. Disponível em: <https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1136/inp.m455>

GERELLI, A. *et al.* Estudo retrospectivo de casos de linfadenite caseosa diagnosticados pelo laboratório de patologia veterinária no período de 2012 a 2017. Estudos em Medicina Veterinária FAG. P, 1 – 5. 2019. Disponível em: <<https://ojsrevistas.fag.edu.br/index.php/ACNMVF/article/view/84/164>>. Acessado em março de 2023.

GIFFORD, G. *et al.* Veterinary vaccine post-licensing safety testing: overview of current regulatory requirements and accepted alternatives. **Procedia in Vaccinology** 5. p. 236 – 247, 2011. Disponível em: < <https://ojsrevistas.fag.edu.br/index.php/ACNMVF/article/view/84> >

GUEDES, M. T. *et al.* Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 8, p. 701 - 708, 2015.

GUIMARAES, A. S. *et al.* Caseous lymphadenitis: Epidemiology, diagnosis, and control. **Veterinary Microbiology**. v. 2, n. 2, pag. 33 – 43, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PPM – Pesquisa da Pecuária Municipal**, 2021.

ÍTAVO, C. C. B. F. *et al.* Green propolis extract as additive in the diet for lambs in feedlot. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Mato Grosso do Sul, v. 40, n. 9, p. 1991-1996, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000900021>>. Acessado em março de 2023.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. 3. ed. Lea & Febeger, Philadelphia, 1993. 417p.

KANEKO, J. *et al.* Clinical Biochemistry of Domestic Animals. California: EUA, 1997.

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**. Brasil, v. 36, n. 25, p. 3578–3583, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29759378/>>. Acessado em outubro de 2023.

LUCAS, P. R. *et al.* Linfadenite caseosa em ovinos – Revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. São Paulo, v. 7, n. 12, p. 1-7, 2009.

MAHMOOD, A. *et al.* Clinico-pathological changes in goats challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (PLD). **Am J Anim Vet Sci**. v. 10, n. 3, p. 112-132. 2015. Disponível em: <<https://thescipub.com/abstract/ajavsp.2015.112.132>>. Acessado em janeiro, 2024.

MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16th. ed. Washington, DC: Livro, 1992. 546p.

MARTINS, E. C. *et al.* Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura. **Boletim ativos de ovinos e caprinos**, v. 3, n. 2, p. 3-6, 2014. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1068421/1/CNPC2016Cenarios.pdf>>. Acessado: 28 de jul, 2023.

MARTINS. E. C. *et al.* Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura. **Embrapa**. v. 3, n. 2, p. 3 – 6, jul. 2016. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1068421/1/CNPC2016Cenarios.pdf>>. Acessado em março de 2023.

MEEUSEN, E, N. T. *et al.* Situação atual das vacinas veterinárias. **Revisões de Microbiologia Clínica**. vol. 20, n. 3, 2007

MEYER, D. J., HARWEY, J. W. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis*. 3.ed. Saunders, 2004. 351p.

MOUSSA, I. M. *et al.* Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematousskin disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 6, p. 718-723, 2016.

NICOLETI, J. L. *et al.* Perfil hematológico e bioquímico clínico de caprinos Canindé infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* criados em região semiárida tropical. **Saúde e produção animal tropical**. 2022.

ODHAH, M. N. *et al.* Hemogram responses in goats toward challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogen mycolic acids. **Vet World**, 2017.

PARISE, D. *et al.* The Transcriptional Regulatory Network of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 415, 2021.

PEREIRA, O. J. A. Avaliação clínica de ovinos vacinados para a linfadenite caseosa. TCC. 2023

PINHO, R, J. M. *et al.* Immunization with recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* Heat-Shock Protein (Hsp) - 60 is able to induce an immune response in mice, but fails to confer protection against infection. **The Open Veterinary Science Journal**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 22–27, 2009.

POINTON, A. Comparison of post mortem inspection procedures for case detection lymphadenitis of Australian sheep and goats. **VetRecord**, v. 185, n. 2, p. 54, 2019.

REZENDE, A. F. S. *et al.* Valiação da fosfatase ácida recombinante CP01850 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em formulações vacinais de subunidade e de DNA contra a linfadenite caseosa. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.72, n.1, p.199-207, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10790>. Acessado em: maio de 2023.

REZENDES, S. A. *et al.* Avaliação de BCG recombinante expressando antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como vacina para linfadenite caseosa. **Portal institucional UFPEL**. 2018. Disponível em: <<https://institucional.ufpel.edu.br/projetos/id/p8161>>. Acessado: 22 jul, 2023.

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.

RUIZ, J. C. *et al.* Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, p. 3, 2011.

SANDERS, N. M. **Caseous Lymphadenitis**. TEX VET PETS. ORG. 2018. Disponível em: <<https://www.texvetpets.org/article/caseous-lymphadenitis/>>. Acessado: 01 jul, 2023.

SANTANA, M. S. *et al.* Imunização com vacina de DNA contra Linfadenite Caseosa e análise da resposta imune em camundongos. **Embrapa Gado de Corte**. v. 242, p. 70, 2017.

SANTOS, S. J. R dos. *et al.* Respostas fisiológica e gradientes térmicos de ovinos das raças Santa Inês, Morada Nova e de seus cruzamentos coma raça Dorper as condições do Semi-Árido Nordeste. **Ciência agrotec.**, v. 30, n.5 p. 995 – 1001, set. 2006. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cagro/a/VYVG9S5pC7tKYjWpbHn97bP/?format=pdf&lang=pt>>. Acessado em fevereiro de 2023.

SEIXAS, L. *et al.* Heat tolerance in Brazilian hair sheep. **J Anim Sci.** v. 30, n. 4, p. 593 – 601. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.5713/ajas.16.0191>>. Acessado em janeiro de 2024

SERRANO, T. J. O. *et al.* Indicadores fisiológicos y ambientales como predictores de estrés térmico en ovinos de la raza Pelibuey. **Revista Científica Agroecosistemas.** v. 8, n. 3, p. 143 – 147. 2020. Disponível em: <<https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/437>>. Acessado em janeiro de 2024.

SILVA, D - O. M. T. *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, 2019.

SILVA, J. W. *et al.* *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2014.

SCOTT, P. **Linfadenitis caseosa (CLA)**. NADIS: HABILIDADE DE SAÚDE ANIMAL. 2011. Disponível em: <<https://nadis.org.uk/disease-a-z/sheep/caseous-lymphadenitis-cla/>>. Acessado em: 03 jul, 2023.

STANFORD, K. *et al.* The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccinationwith commercial and experimental vaccines. **Can J Vet Res.** v. 62, n. 1, p. 38-43, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9442938/>>. Acessado: 30 de outubro, 2023.

VERSCHOOR, J. A. Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*. **Progress in lipid research**, v. 51, n. 4, p. 325-339, 2012.

VICH. **VICH and its role for authorisation of veterinary medicinal products Executive Summary.** [S. l.: s. n.], 2010. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/VICH/VICH_and_its_role_for_authorisation_of_VMPs_Eng.pdf>. Acessado em: 15 set, 2023.

WASHBURN, K. **Caseous Lymphadenitis of Sheep and Goats.** MSD Veterinary Manual, 2019. Disponível em: <https://www.msdsvetmanual.com/circulatory-system/lymphadenitis-and-lymphangitis/caseous-lymphadenitis-of-sheep-and-goats> >. Acessado em: 01 jul, 2023.

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

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DA ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFERSA)



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Mossoró, 25 de fevereiro de 2022

PARECER 14/2022

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da eficácia de vacinas recombinantes de subunidade associadas ao adjuvante saponina no combate à linfadenite caseosa em ovinos” sob a responsabilidade de Francisco Silvestre Brilhante Bezerra, o qual envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11.794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFERSA em reunião no dia 25 de fevereiro de 2022.

Vigência do projeto	3 de maio de 2022 a 21 de outubro de 2022
Espécie/linhagem	ovinos / SRD
N. de Animais	30
Peso/idade	Peso variável /4 a 6 meses
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Propriedades rurais no Município de Mossoró-RN.

SIDNEI MIYOSHI SAKAMOTO:
11203780877
Coordenador CEUA-UFERSA

BR 110 – Km 47 – Bairro Pres. Costa e Silva
CEP 59625-900 – Mossoró – RN – (84) 3317-8360
<http://www2.ufersa.edu.br/portal/comissoes/ceua>

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO: ARTIGO

Ciência Rural



Avaliação dos níveis de segurança em uma vacina recombinante contra a Linfadenite Caseosa em ovinos

Journal:	Ciência Rural
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	linfadenite caseosa, ovinos, imunização, cp40, BCG

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

01/12/2023, 16:24

Gmail - Ciência Rural - ID do manuscrito CR-2023-0641



Carlos Daniel Sequeira Espinoza <carlossequeira030699.cs@gmail.com>

Ciência Rural - ID do manuscrito CR-2023-0641

Ciência Rural <onbehalf@manuscriptcentral.com>

1º de dezembro de 2023, 15h48

Respondente a: cienciarural@gmail.com

Para: silvestre@ufersa.edu.br

CC: carlossequeira030699.cs@gmail.com, jamile03@gmail.com, thiago.alves53237@alunos.ufersa.edu.br, hevertonbio@gmail.com, dayanacordeirobarreto@gmail.com, jampson@gmail.com, gabriel.macedo@alunos.ufersa.edu.br, barbara.biotec1@gmail.com, monicaellencs@gmail.com, michelly@ufersa.edu.br, jaelsoares@hotmail.com, sibelborsuk@gmail.com, silvestre@ufersa.edu.br

01-Dez-2023

Prezado Dr. Bezerra:

Seu manuscrito intitulado "Avaliação dos níveis de segurança em uma vacina recombinante contra a Linfadenite Caseosa em ovinos" foi submetido online com sucesso e atualmente está sendo considerado para publicação na Ciência Rural.

O ID do seu manuscrito é CR-2023-0641.

Por favor mencione o ID do manuscrito acima em todas as correspondências futuras ou quando ligar para o escritório para tirar dúvidas. Se houver alguma alteração em seu endereço ou endereço de e-mail, faça login no ScholarOne Manuscripts em <https://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo> e edite suas informações de usuário conforme apropriado.

Você também pode visualizar o status do seu manuscrito a qualquer momento, verificando sua Central de Autores após fazer login em <https://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo>.

Obrigado por submeter seu manuscrito à Ciência Rural.

Atenciosamente,
Editorial Ciência Rural