



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

JAMILE ALVES OLIVEIRA PEREIRA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE OVINOS VACINADOS PARA A
LINFADENITE CASEOSA**

MOSSORÓ
2023

JAMILE ALVES OLIVEIRA PEREIRA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE OVINOS VACINADOS PARA A
LINFADENITE CASEOSA**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Francisco Silvestre Brilhante Bezerra, Prof. Dr.

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.

P436a Pereira, Jamile Alves Oliveira.
Avaliação clínica de ovinos vacinados para a
linfadenite caseosa / Jamile Alves Oliveira
Pereira. - 2023.
42 f. : il.

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

1. linfadenite caseosa. 2. ovinos. 3.
imunização. 4. CP40. 5. BCG. I. Bezerra, Francisco
Silvestre Brilhante, orient. II. 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

JAMILE ALVES OLIVEIRA PEREIRA

AVALIAÇÃO CLÍNICA DE OVINOS VACINADOS PARA A LINFADENITE CASEOSA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal Rural do Semi-Árido
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em MEDICINA VETERINÁRIA.

Defendida em: 03/05/2023.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZER
Data: 15/05/2023 17:40:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Presidente



Documento assinado digitalmente
BARBARA MONIQUE DE FREITAS VASCONC
Data: 15/05/2023 18:56:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Membro Examinador



Documento assinado digitalmente
MONICA ELLEN DA COSTA SOARES
Data: 15/05/2023 21:47:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mônica Ellen da Costa Soares, Bel. em Biotecnologia (UFERSA)

Membro Examinador

*Dedico à Bela e Lia, minhas eternas amigas e
melhores companheiras (In Memoriam).*

*Ao meu pai José, à minha mãe Maria e
à minha irmã gêmea Juliana, pelo privilégio
de ter vocês como família.*

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho de conclusão de curso contou com a ajuda de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

Ao meu professor orientador, que através dos seus ensinamentos permitiram que eu pudesse hoje estar concluindo este trabalho.

Agradeço a todos que participaram da pesquisa, pela colaboração e disposição em me ajudar durante todo o processo.

Agradeço a minha família por absolutamente tudo. Obrigada por me apoiarem todos esses anos que passei morando longe de casa. Eu tô voltando! Amo vocês.

Agradeço a todas as minhas supervisoras de estágio no Hospital Veterinário da UFRSA por toda a paciência e conhecimento transmitido.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial ao meu colega de turma Abu, por fazer parte dessa jornada comigo.

E por fim, agradeço a Deus.

O mundo sempre parece mais brilhante quando você acaba de fazer algo que não existia antes.

Neil Gaiman

RESUMO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença crônica e debilitante causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* que afeta pequenos ruminantes, sendo responsável pelo aparecimento de abscessos em linfonodos e órgãos, levando à queda nos índices produtivos de rebanhos. O tratamento da doença é difícil e insatisfatório. Atualmente não há vacinas eficazes para a prevenção da LC, mas estratégias envolvendo o uso de proteínas recombinantes têm mostrado resultados promissores experimentalmente. Objetivou-se com este trabalho avaliar as alterações clínicas em ovinos imunizados e não imunizados com a formulação vacinal contendo a proteína rCP40 e BCG e desafiados com cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* MIC-6. O estudo apresentado foi realizado usando 12 ovinos nativos, machos, sadios, entre 4 e 6 meses de idade, divididos em 2 grupos e imunizados com solução salina a 0,9% ou com associação de 200 µg de rCP40 e 10⁶ UFC de BCG diluído em PBS. Trinta dias após a última imunização, todos os animais foram desafiados. Foram realizados exames clínicos durante 20 semanas pós-desafio, onde foram avaliados os seguintes parâmetros: peso, temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, coloração de mucosas ocular, nasal e oral e palpação de linfonodos. Como resultado, não foram observadas diferenças significativas entre os animais que receberam BCG e CP40 como vacina e o grupo de controle para os parâmetros clínicos avaliados. Esses resultados podem indicar que a formulação vacinal não altera parâmetros clínicos a curto e longo prazo, e que, desta forma é segura para uso em ovinos.

Palavras-chave: linfadenite caseosa; ovinos; imunização; CP40; BCG.

ABSTRACT

Caseous lymphadenitis (CLA) is a chronic and debilitating disease caused by the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis* that affects small ruminants, being responsible for the appearance of abscesses in lymph nodes and organs, leading to a drop in the productive indexes of herds. The treatment of the disease is difficult and unsatisfactory. Currently, there are no effective vaccines for the prevention of CL, but strategies involving the use of recombinant proteins have shown promising experimental results. The objective of this work was to evaluate the clinical alterations in sheep immunized and not immunized with the vaccine formulation containing the protein rCP40 and BCG and challenged with a virulent strain of *C. pseudotuberculosis* MIC-6. The presented study was carried out using 12 native, male, healthy sheep, between 4 and 6 months old, divided into 2 groups and immunized with 0.9% saline solution or with an association of 200 µg of rCP40 and 10⁶ CFU of diluted BCG on PBS. Thirty days after the last immunization, all animals were challenged. Clinical examinations were performed during 20 weeks post-challenge, where the following parameters were evaluated: weight, rectal temperature, heart rate, respiratory rate, ruminal movements, coloration of ocular, nasal and oral mucous membranes and palpation of lymph nodes. As a result, no significant differences were observed between the animals that received BCG and CP40 as a vaccine and the control group for the evaluated clinical parameters. These results may indicate that the vaccine formulation does not change clinical parameters in the short and long term, and that, therefore, it is safe for use in sheep.

Keywords: caseous lymphadenitis; sheep; immunization; CP40; BCG.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Média e desvio padrão (Média $\pm$ DP) do peso de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i> , e acompanhados durante 20 semanas	28
Gráfico 2	– Média e desvio padrão (Média $\pm$ DP) da temperatura retal de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i> , e acompanhados durante 20 semanas.....	29
Gráfico 3	– Mediana da frequência respiratória de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i> , e acompanhados durante 20 semanas	30
Gráfico 4	– Mediana de frequência cardíaca de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i> , e acompanhados durante 20 semanas	31
Gráfico 5	– Mediana de movimentos ruminiais de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i> , e acompanhados durante 20 semanas	32
Gráfico 6	– Mediana do escore de coloração de mucosa nasal de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i> , e acompanhados durante 20 semanas	33
Gráfico 7	– Mediana do escore de coloração de mucosa ocular de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i> , e acompanhados durante 20 semanas	34
Gráfico 8	– Mediana do escore de coloração de mucosa oral de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i> , e acompanhados durante 20 semanas	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Comparação da quantidade de linfonodos alterados em ovinos submetidos a diferentes protocolos de tratamentos, vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de <i>C. pseudotuberculosis</i> , e acompanhados durante 20 semanas	35
----------	---	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG	Bacillus Calmette-Guerin
bpm	Batimentos por minuto
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
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

% Porcentagem

°C Graus Celsius

ml Mililitro

cm Centímetro

µg Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Linfadenite caseosa	16
2.1.1	Epidemiologia	16
2.1.2	Etiopatogenia	16
2.1.3	Alterações clínicas	17
2.1.4	Tratamento	18
2.1.5	Controle e prevenção	18
2.2	Vacinas de subunidade recombinante	19
2.2.1	Proteína recombinante CP40	20
2.2.2	Bacillus Calmette-Guerin (BCG)	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Aspectos éticos	23
4.2	Seleção e preparação dos animais	23
4.3	Preparo da formulação vacinal	23
4.3.1	Cultivo de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG pasteur	23
4.3.2	Expressão e purificação da proteína recombinante CP40 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	23
4.4	Protocolo de vacinação	24
4.5	Inspeção física	24
4.6	Análise de dados	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1	Expressão e purificação da proteína rCP40 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	27
5.2	Avaliação dos parâmetros clínicos	27
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença crônica e debilitante, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que atinge principalmente ovinos e caprinos (Alves et al., 2007; Droppa-Almeida et al., 2016). A doença é responsável pelo aparecimento de abscessos em linfonodos e órgãos, levando ao comprometimento da carcaça e queda nos índices produtivos dos animais acometidos (Carmo et al., 2012).

A doença é endêmica no Brasil e afeta grande parte dos rebanhos no território brasileiro, com destaque para a região Nordeste, que possui o maior número de rebanhos caprinos e ovinos do país. Ela acarreta grandes perdas financeiras para os criadores da região, podendo até mesmo tornar inviável a continuidade da atividade pecuária para pequenos e médios produtores (Alencar et al., 2010; Faria et al., 2018).

O tratamento da linfadenite caseosa é desafiador, uma vez que o uso de antibióticos não é aconselhado por ser uma tática dispendiosa e ineficaz (Silva et al., 2014). Além disso, o controle da doença também é complicado, pois a bactéria é capaz de sobreviver no ambiente por longos períodos e há limitações para detectar e descartar animais doentes apresentando a forma subclínica da doença, o que facilita sua rápida disseminação dentro do rebanho (Gerelli et al., 2019).

Nesse contexto, a vacinação é a medida mais adequada para o controle da linfadenite caseosa, porém apesar de já existirem vacinas disponíveis comercialmente, a doença persiste mesmo após um período prolongado de vacinação, não sendo totalmente eficaz na prevenção da doença. Com isso, torna-se crucial buscar progressos que possibilitem a criação de uma vacina eficiente para ovinos e caprinos, capaz de proporcionar 100% de proteção (Bastos et al., 2012; Pinho et al., 2021).

Diversas composições de vacinas estão sendo pesquisadas nos últimos anos. Dentre elas, técnicas que envolvem o uso de proteínas recombinantes têm apresentado bons resultados em estudos experimentais (Silva et al., 2014).

A proteína recombinante CP40 é expressa pelo *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro e apresenta potencial proteção imune (Droppa-Almeida et al., 2016), assim como o uso de BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) em vacinas de vetores recombinantes, por suas propriedades adjuvantes (Leal et al., 2018). No entanto, poucos estudos foram realizados utilizando as espécies alvo como modelo animal, sendo a maioria em modelo murino. Assim, esse trabalho se propõe a avaliar a segurança da formulação vacinal contendo rCP40 e BCG em ovinos em longo prazo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Linfadenite caseosa

2.1.1 Epidemiologia

O mercado brasileiro é um grande consumidor de carnes ovinas e caprinas (Martins et al., 2016). A região Nordeste do Brasil domina com o maior número de cabeças, com aproximadamente 92,96% dos rebanhos de caprinos e 63,04% dos rebanhos de ovinos do país (IBGE, 2016). Vale ressaltar que apesar do grande número de rebanhos, os índices produtivos desses animais se apresentam baixos. Um dos fatores que contribuem para essa situação é a alta taxa de morbidade dos animais, em particular devido a elevada incidência de linfadenite caseosa presente nas propriedades do Nordeste. A LC atinge a grande maioria dos rebanhos do Brasil, com a prevalência clínica superando 30% dos animais (Alencar et al., 2010; Carmo et al., 2012). Porém, acredita-se que a prevalência seja subestimada por falta de notificação (Andrade, 2007).

A doença é endêmica no Brasil e tem impacto direto no desenvolvimento socioeconômico do semiárido brasileiro (Souza et al., 2011). No Nordeste houve uma rápida expansão dessa atividade na última década. Esse fator aliado ao caráter rural de grande parte das criações tem agravado o problema da deficiência sanitária, afetando seriamente a cadeia produtiva (Faria et al., 2018).

A LC é responsável por grandes prejuízos econômicos, já que a presença de abscessos no organismo do animal pode interferir nas atividades naturais, como alimentação, o que pode resultar em enfraquecimento ou debilitação (Faccioli-Martins et al., 2014). Além disso, a doença causa a desvalorização da pele, condenação das carcaças, além de poder levar o animal ao óbito, o que realça o impacto econômico provocado pela doença, principalmente para pequenos e médios produtores rurais (Souza et al., 2011; Corrêa et al., 2018; Cruz et al., 2019).

2.1.2 Etiopatogenia

A linfadenite caseosa é causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um parasita macrófago gram positivo, não esporulado, aeróbio (Barnabé, 2020). Esta bactéria é pleomórfica, assumindo forma cocóide ou filamentosa, além de ser intracelular facultativa. Ela

é imóvel e não esporulada. Embora não possua cápsula ou flagelos, as fímbrias estão presentes (Andrade, 2007; Bastos et al., 2012).

A transmissão ocorre por meio do contato com secreções de abscessos rompidos, podendo ser contato direto com animais clinicamente infectados ou a partir do contato com superfícies contaminadas (Faccioli-Martins et al., 2014).

A porta de entrada de *C. pseudotuberculosis* no organismo ocorre através da pele, mucosas oral e respiratória (Alves et al., 2007). Uma vez inoculada, Dorella et al. (2006) demonstrou que a interação entre o *Corynebacterium pseudotuberculosis* e os macrófagos é fundamental na patogênese da doença, visto que a bactéria consegue sobreviver dentro dessas células sendo transportada até o linfonodo de drenagem local, onde se multiplica, coloniza e provoca inflamação (Baird et al., 2007).

De acordo com Sá et al. (2018) a bactéria produz fatores de virulência, como a toxina fosfolipase D e a proteína CP40, que são importantes para sua sobrevivência e disseminação nos tecidos. Esse processo é seguido de uma resposta inflamatória intensa, que leva à formação de granuloma, pus e necrose, alterações típicas da doença.

Uma vez estabelecida a doença torna-se crônica, e se dissemina para todo o rebanho, sendo raramente fatal e persistindo por toda a vida do animal (Baird et al., 2007; Sá et al., 2018).

2.1.3 Alterações clínicas

As alterações clínicas causadas pela linfadenite caseosa em pequenos ruminantes são principalmente caracterizadas pela necrose caseosa induzida por bactérias dos gânglios linfáticos (Dorella et al., 2006). Os abscessos medem de 4 a 5 cm, mas podem atingir até 15 cm e apresentam pus de consistência caseosa ou caseo-purulenta de cor esverdeada ou branco-acinzentada (Riet-Correa et al., 2007).

Os linfonodos mais frequentemente acometidos são os pré-escapulares, retrofaríngeos, parotídeos, submandibulares e pré-crurais, possivelmente porque esses linfonodos drenam áreas de pele onde ocorrem escoriações e traumas mais frequentemente, favorecendo a entrada do microorganismo (Souza et al., 2011).

Os linfonodos afetados se apresentam aumentados de volume, firmes e sensíveis a palpação, sendo facilmente identificados no exame clínico (Andrade, 2007). Ocorre diminuição da produção de lã, carne, leite e diminuição da eficiência reprodutiva (Guimarães et al., 2011).

Quanto aos sinais clínicos menos específicos, os animais podem apresentar dispneia e distúrbios respiratórios, má condição corporal, anemia e problemas reprodutivos como perda de fertilidade (Kaba et al., 2011; Sá et al., 2018). Outra alteração clínica menos comumente observada é o emagrecimento progressivo do animal, que ocorre devido a abscessos localizados em vísceras da cavidade torácica ou abdominal, sendo denominada ‘doença da ovelha magra’ (Riet-Correa et al., 2007).

Ademais, a linfadenite caseosa pode não provocar sintomas, se apresentando na forma subclínica, ou provocar poucas alterações evidentes, permanecendo despercebida até o momento do abate, o que dificulta o controle da doença (Barnabé et al., 2020).

2.1.6 Tratamento

Existem duas alternativas para o tratamento da LC, o tratamento medicamentoso e o cirúrgico, porém nenhuma das duas apresenta eficácia satisfatória. O tratamento medicamentoso é feito com antibióticos, sendo a tetraciclina, eritromicina e penicilina os antimicrobianos ativos mais usados em bactérias intracelulares (Bastos et al., 2012). Contudo, a antibioticoterapia não apresenta eficácia pois atinge níveis muito baixos dentro dos abscessos devido a presença de cápsula fibrosa, pus e a localização intracelular da bactéria que dificultam a ação da substância (Alves et al., 2007).

Segundo Bastos et al. (2012) o tratamento farmacológico é prolongado, durando um período maior que 15 dias. A ineficiência do tratamento somada ao alto custo torna essa uma alternativa inviável para o controle da doença nos rebanhos (Guimarães et al., 2011).

Outra alternativa é a drenagem cirúrgica dos abscessos seguida de cauterização química com iodo 10% (Andrade, 2007). Porém esse método apenas diminui a contaminação ambiental, sendo ineficaz por não atingir abscessos internos (Guimarães et al., 2011).

2.1.7 Controle e prevenção

O desafio de eliminar a LC dos rebanhos decorre da combinação da falta de eficácia dos antibióticos com a capacidade do agente infeccioso de sobreviver no ambiente, juntamente com a dificuldade de detectar os animais infectados (Gerelli et al., 2019). Além do mais, a *C. pseudotuberculosis* consegue permanecer no hospedeiro cronicamente e escapar eficientemente do sistema imune, sendo capaz de se disseminar silenciosamente nos rebanhos (Faccioli-Martins et al., 2014).

Embora a vacinação seja considerada a estratégia mais eficaz para controlar a doença, ainda não é uma prática totalmente consolidada e, portanto, é necessário medidas como detecção precoce, segregação e descarte de animais infectados. Contudo, essa tarefa é complicada de ser executada, uma vez que o agente infeccioso se espalha rapidamente entre os animais e é difícil identificar aqueles que apresentam a doença de forma subclínica. Assim, medidas de manejo sanitário são essenciais para evitar a propagação da doença (Guimarães et al., 2011; Corrêa et al., 2018).

No que se refere às vacinas disponíveis, no Brasil há três produtos autorizados pela indústria para serem utilizados. Entre eles, a vacina 1002 Atenuada® não apresenta à campo a mesma eficácia observada nos estudos experimentais (Santana et al., 2017). A vacina Linfovac® é uma vacina viva atenuada liofilizada, enquanto a vacina Glanvac T/LC® é polivalente e oferece proteção contra várias doenças, incluindo a linfadenite caseosa, tétano, carbúnculo e enterotoxemia. No entanto, a proteção fornecida por essas vacinas é apenas parcial, podendo também ocorrer efeitos colaterais indesejáveis, razão pela qual essas vacinas não são usadas rotineiramente. Portanto, ainda é preciso realizar mais estudos para desenvolver um modelo vacinal que promova 100% de proteção (Bastos et al. 2012; Faccioli-Martins et al., 2014; Barbosa, 2016, Gonçalves, 2017).

2.2 Vacinas de subunidade recombinante

Diversas abordagens têm sido avaliadas com o objetivo de produzir uma vacina efetiva contra a *C. pseudotuberculosis*, entre elas o uso de bactérias atenuadas e inativadas, bem como a utilização de vacinas de DNA e toxóide (Pinho et al., 2021).

Vacinas de subunidade recombinante são formuladas utilizando antígenos de proteínas definidos do patógeno. Como vantagens estão a capacidade de produzir antígenos altamente purificados e especificamente direcionados contra o patógeno, a capacidade de produzir uma resposta imunológica mais forte e específica e o menor risco, pois não contêm patógenos vivos (Anderson, 2000; Doytchinova e Flower 2007; Nascimento, 2012).

O uso de proteínas recombinantes em estratégias vacinais para prevenir a linfadenite caseosa tem sido considerado uma opção viável e promissora, uma vez que os resultados experimentais têm sido favoráveis (Silva et al., 2014).

Contudo, os antígenos proteicos geralmente são imunógenos fracos e por isso se faz necessário o uso de adjuvante para aumentar a eficácia da formulação (Nascimento, 2012).

Adjuvantes são compostos que aumentam a resposta imune, melhorando a eficácia da vacina. Em vacinas de subunidades recombinantes, o adjuvante intensifica a imunogenicidade de proteínas purificadas (Droppa-Almeida et al., 2016).

2.2.1 Proteína recombinante CP40

A proteína recombinante CP40 é um dos primeiros antígenos proteicos da *C. pseudotuberculosis* conhecidos, e foi identificada em 1994 no sobrenadante do meio de cultura da bactéria. A CP40 foi purificada por cromatografia e é descrita como uma proteína extracelular secretada pelo patógeno. Essa proteína trata-se de um antígeno de 40 kDa e comprimento de cerca de 351 aminoácidos. Ela é considerada um importante fator de virulência de *C. pseudotuberculosis* devido a capacidade demonstrada *in vivo* de degradar a região Fc de anticorpos IgG (Dorella et al., 2006; Baird et al., 2007; Silva et al., 2014; Rodríguez Domínguez, 2020).

Vacinas recombinantes foram desenvolvidas utilizando a proteína CP40. No estudo realizado por Droppa-Almeida et al. (2016) foram avaliadas formulações contendo rCP40 com diferentes adjuvantes, sendo eles saponina e adjuvante completo de Freud. As formulações vacinais foram testadas em camundongos BALB/c. Após 40 dias da última imunização, foi realizado o desafio contendo 10^4 UFC da cepa virulenta C57. Como resultado, a proteína rCP40 induziu altos níveis de anticorpos IgG2a e IgG2b. Após desafio, os níveis de IgG2a e IgG2b foram mantidos, o que sugere uma resposta Th1. Todos os grupos imunizados com a proteína rCP40 apresentaram 100% de proteção.

Silva et al. (2014) avaliou diferentes formulações de vacinas utilizando a proteína recombinante rCP40 e a cepa recombinante viva CP09, que foram testadas em camundongos. Um total de cinco grupos, cada um com 10 camundongos, foi imunizado com diferentes formulações, incluindo salina (G1), CP40 e saponina (G2), CP09 (G3), uma combinação de CP09, rCP40 e saponina (G4) e uma estratégia heteróloga prime-boost com adjuvante saponina (G5). Todos os grupos de camundongos receberam duas doses da vacina com um intervalo de 15 dias entre as doses. No dia 30 após a primeira imunização, todos os grupos foram desafiados com a cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* MIC-6 na dose de 10^4 UFC. Os camundongos foram monitorados por 30 dias após o desafio. O estudo obteve uma taxa de proteção de 90% em animais imunizados apenas com CP40, enquanto a combinação de rCP40 e CP09 mostrou uma proteção de 70%, revelando que o uso da CP40 em formulações vacinais é uma estratégia promissora no controle da linfadenite caseosa.

Poucos estudos foram realizados utilizando a proteína CP40 e testando-a na espécie-alvo. O estudo de Walker et al. (1994) foi realizado com ovinos vacinados duas vezes com 100 µg por dose de CP40 em adjuvante hidróxido de alumínio. Os resultados mostraram que os animais foram protegidos contra infecção por *C. pseudotuberculosis*, com redução de 82% no número de ovinos infectados e redução de 98% nas lesões pulmonares, sugerindo que o antígeno CP40 desempenha um papel importante na imunidade dos animais.

2.2.2 Bacillus Calmette-Guerin (BCG)

O Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) é uma cepa atenuada da bactéria *Mycobacterium bovis* amplamente utilizada na formulação de vacinas (Bastos et al., 2009). Apresenta inúmeras vantagens como estabilidade, segurança, baixo custo de produção, capacidade adjuvante e indução de imunidade celular, além de expressar com sucesso antígenos heterólogos (Dorneles et al., 2020).

O BCG é especialmente adequado para uso como adjuvante por sua capacidade de se replicar em células apresentadoras de antígenos e induzir uma forte resposta Th1 e Th2. Essa característica é considerada um elemento essencial de vacina bem-sucedida contra patógenos intracelulares, como é o caso da *C. pseudotuberculosis*. Outro fator é sua segurança comprovada após décadas de uso em todo o mundo e sua disponibilidade em muitos países (Nascimento, 2012; Mouhoub et al. 2021).

Leal et al. (2018) avaliou o uso de BCG recombinante expressando a proteína PLD como uma possível candidata para o desenvolvimento de uma vacina contra *C. pseudotuberculosis* em um modelo murino. Os animais foram imunizados por via intraperitoneal com duas doses separadas por um intervalo de 21 dias. O desafio foi realizado 42 dias após a primeira imunização, com 10⁴ UFC da cepa *C. pseudotuberculosis* MIC-6. Após o desafio, os animais foram observados por 60 dias. A vacina *M. bovis* BCG expressando a proteína PLD e reforçada com proteína rPLD purificada foi capaz de induzir uma sobrevivência de 88% dos camundongos desafiados, que apresentaram níveis mais altos de produção de IFN-γ, destacando a capacidade do BCG recombinante ser uma estratégia útil para o desenvolvimento de novas vacinas contra a *C. pseudotuberculosis*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar o acompanhamento clínico pós-desafio de ovinos vacinados e não vacinados com a formulação vacinal contendo a proteína recombinante CP40 e *M. bovis* BCG Pasteur, após o desafio com a cepa MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*.

3.2 Objetivos específicos

- Mensurar parâmetros clínicos de peso, temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais e coloração de mucosas nasal, nasal e oral, sendo atribuído escore 1 para coloração normal e escore 2 para coloração pálida;
- Avaliar os parâmetros clínicos obtidos ao longo de 20 semanas em ovinos vacinados e não vacinados pós-desafio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Núcleo de Ensino e Pesquisa em Pequenos Ruminantes (NEPPER) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, no município de Mossoró (5° 11' 16" S, 37° 20' 38" W), no estado do Rio Grande do Norte.

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (parecer número 14/2022).

4.2 Seleção e preparação dos animais

Foram utilizados 12 ovinos nativos, machos, sem raça definida, sem a presença de LC clínica, entre 4 e 6 meses de idade. Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de quarentena de 30 dias e foram vermifugados com doramectina (Dectomax®) seguindo o protocolo de vermifugação recomendado pelo fabricante. Os animais foram alimentados com feno e concentrado, além de água *ad libitum*.

4.3. Preparo da formulação vacinal

4.3.1. Cultivo de *Mycobacterium bovis* BCG pasteur

A cepa *M. bovis* BCG Pasteur foi cultivada em meio Middlebrook 7H9 (Difco) acrescido de 10% de OADC (Oleic Albumin Dextrose Catalase), 0,2 % de glicerol e 0,05% de Tween 80. A quantificação do BCG foi feita utilizando o método de contagem de submetidas às diluições decimais seriadas, semeadas em placas e incubadas em estufa B.O.D. a 37°C por aproximadamente 1 semana (Marshall, 1992).

4.3.2. Expressão e purificação da proteína recombinante CP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Para a expressão da proteína rCP40, utilizou-se o plasmídeo pAE/cp40 (Droppa-Almeida et al., 2016) previamente construído e gentilmente cedido pela Dra. Sibele Borsuk da

Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O plasmídeo foi inserido na bactéria *Escherichia coli* (cepa BL21 Star) por meio de choque térmico, utilizando CaCl_2 . Posteriormente, foi realizada a indução da expressão da rCP40 fazendo uso de 1mM de IPTG, e para confirmação da expressão foi efetuado o *Western Blot*, utilizando-se de um anticorpo monoclonal anti-6x-His em combinação com a enzima peroxidase (Sigma).

A purificação da proteína recombinante foi executada com o auxílio de uma coluna de sepharose (HisTrap), baseando-se na cromatografia de afinidade ao níquel. Após a obtenção da proteína purificada, foi realizado um SDS-PAGE para verificação dessa pureza e em seguida foi feita a quantificação da rCP40 pelo Kit BCA (Pierce).

4.3 Protocolo de vacinação

Os animais foram divididos em 2 grupos, sendo 6 animais imunizados por via subcutânea com solução salina a 0,9% (G1, grupo controle) e 6 animais imunizados com rCP40 e BCG diluído em PBS (G2). A proteína recombinante foi utilizada na quantidade de 200 $\mu\text{g}/\text{dose}$, e o BCG na quantidade de 10^6 UFC/dose de vacina em um volume final de 1ml. As vacinas foram administradas em 2 doses intervaladas por 21 dias. Trinta dias após a última imunização, todos os animais foram desafiados utilizando 1 ml contendo 10^5 UFC da cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* por via subcutânea.

4.4 Inspeção física

O exame físico dos animais foi realizado semanalmente após o desafio, totalizando 20 semanas. O exame físico foi realizado visando a detecção de lesões, presença de possíveis reações adversas nos locais das vacinas e a observação do aspecto geral dos animais. Foi realizada a palpação dos linfonodos parotídeos, retrofaríngeo, submandibular, mediastinal, pré-escapular, pré-femoral, poplíteo e inguinal.

Além disso, foi realizada a mensuração do peso corporal, observação das colorações de mucosa ocular, nasal e oral, aferição da temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais.

A escolha da mensuração do peso corporal como um parâmetro de interesse neste estudo se justifica pela sua estreita relação com o estado de saúde dos animais e sua capacidade de sinalizar de forma antecipada a presença de condições patológicas em curso (Feitosa, 2008). A análise do peso corporal foi realizada com o auxílio de uma balança mecânica.

A aferição da temperatura retal foi realizada utilizando um termômetro clínico digital, através da introdução do termômetro no reto do animal, mantendo-o em contato com a mucosa retal, até a leitura digital da temperatura ser estabilizada e disparar o sonarizador. A temperatura retal foi selecionada como um parâmetro de análise pois alterações podem ser indicativas de processos inflamatórios ou infecciosos no organismo dos ovinos (Feitosa, 2008), podendo ser decorrente tanto de reações adversas à imunização ou ao desafio, como também da manifestação da LC em curso.

A aferição da frequência cardíaca foi feita a partir da ausculta cardíaca na região torácica esquerda do animal, entre o terceiro e quarto espaço intercostal, utilizando um estetoscópio. Os batimentos foram contados durante 15 segundos com auxílio de um cronômetro e o resultado foi multiplicado por 4, para obter o total de batimentos cardíacos por minuto.

A frequência respiratória foi feita de forma semelhante, com o estetoscópio posicionado na região torácica, próximo as primeiras costelas. Os movimentos respiratórios foram contados durante 15 segundos com auxílio do cronômetro e o resultado foi multiplicado por 4, para obter o total de respirações por minuto. A frequência respiratória foi avaliada devido à capacidade da LC causar distúrbios respiratórios, incluindo taquipneia, em decorrência de abscessos pulmonares (Kaba et al., 2011).

Para realização da verificação dos movimentos ruminais, foi colocado um estetoscópio sobre a região do flanco esquerdo do animal, onde o rúmen está localizado. Em seguida, os sons produzidos foram auscultados durante 2 minutos, com auxílio do cronômetro, e ao final, o número de movimentos ruminais foi registrado. A escolha deste parâmetro se deu em razão da capacidade da linfadenite caseosa provocar abscessos na cavidade abdominal, o que pode ocasionar a redução no consumo (Faccioli-Martins et al., 2014) e, consequentemente, alterações nos movimentos ruminais.

Para a verificação da coloração da mucosa ocular, foi feita a exposição da conjuntiva, pressionando a pálpebra superior com o dedo polegar e abaixando a pálpebra inferior do animal. A verificação da coloração de mucosa nasal e oral foi feita através da observação direta das narinas e gengivas. A análise da coloração da mucosa foi realizada em função da capacidade da LC causar anemia nos animais infectados (Sá et al., 2018).

A fim de simplificar a interpretação dos resultados, a coloração da mucosa foi categorizada como normal ou pálida, sendo atribuído o escore 1 à mucosa com coloração normal e o escore 2 à mucosa com coloração pálida.

4.5 Análise dos dados

Os dados foram submetidos a uma análise estatística descritiva, na qual foram calculadas as medidas de tendência central, sendo a média ou a mediana, para cada grupo. Os valores obtidos foram posteriormente submetidos ao teste t de Student, com o intuito de avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados. A análise foi conduzida com um nível de significância estabelecido em 0,05.

A seleção do método mais apropriado para a análise dos dados, sendo a média ou a mediana, foi escolhida com base na capacidade de cada medida em representar mais adequadamente os resultados obtidos. Esta decisão foi tomada considerando a possibilidade da média ser influenciada por valores extremos, o que pode levar a distorções na análise, enquanto a mediana, por sua vez, é menos sensível a esses valores discrepantes, tornando-se uma opção mais apropriada para conjuntos de dados que possuem distribuições mais assimétricas (Duquia, 2006), portanto alguns resultados foram apresentados por meio da média, enquanto outros foram expressos por meio da mediana.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

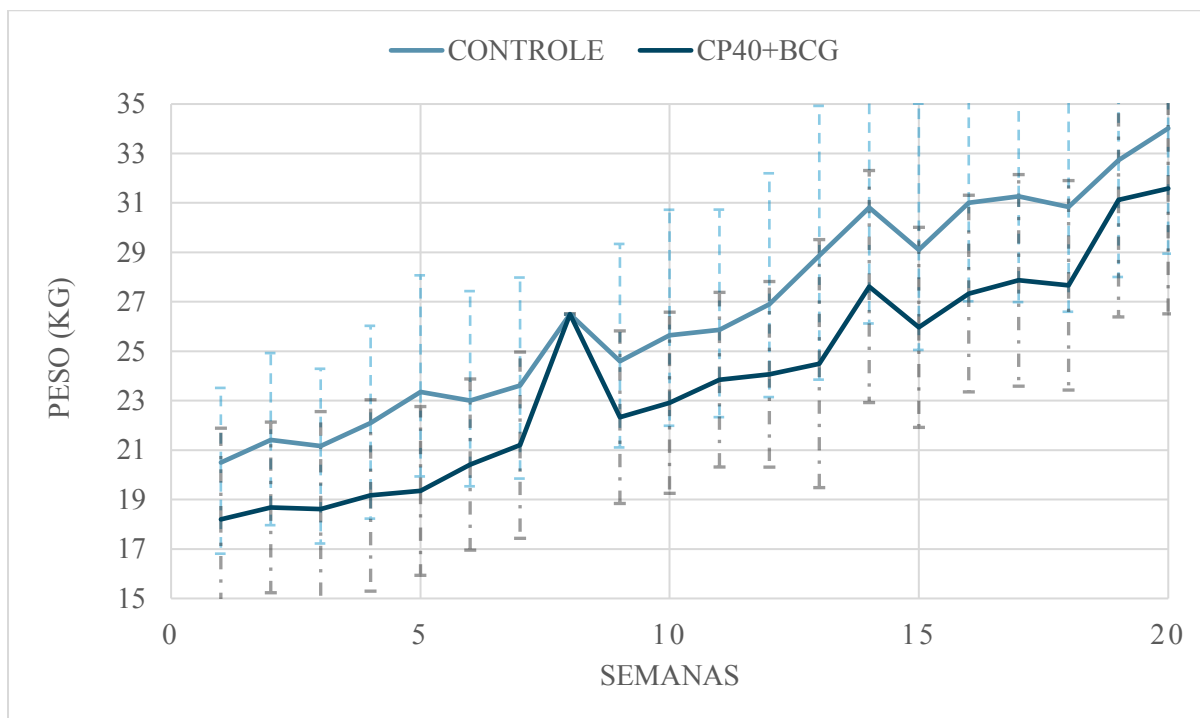
5.1. Expressão e purificação da proteína rCP40 de *C. pseudotuberculosis*

A expressão da proteína rCP40 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* apresentou rendimento de 8,22 mg/L. O rendimento final apresentou valor parecido com o obtido por Droppa-Almeida et al. (2016), que foi de 10,4 mg/L.

5.2. Avaliação dos parâmetros clínicos

Os dados de peso coletados dos ovinos ao longo das 20 semanas de acompanhamento estão apresentados no Gráfico 1 (abaixo). Observou-se um aumento significativo de peso em todos os animais ao longo das semanas. Esses achados mostram que nenhum dos animais avaliados manifestaram a forma severa da doença, uma vez que o ganho de peso foi preservado. Verificou-se que, durante o experimento, os animais pertencentes ao grupo G1 (controle) apresentaram valores superiores de peso comparados aos animais do G2. Todavia, a análise estatística t de Student não identificou diferenças significativas entre os valores de peso dos grupos investigados ($p > 0,05$).

Gráfico 1. Média e desvio padrão (Média $\pm$ DP) do peso de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, e acompanhados durante 20 semanas.



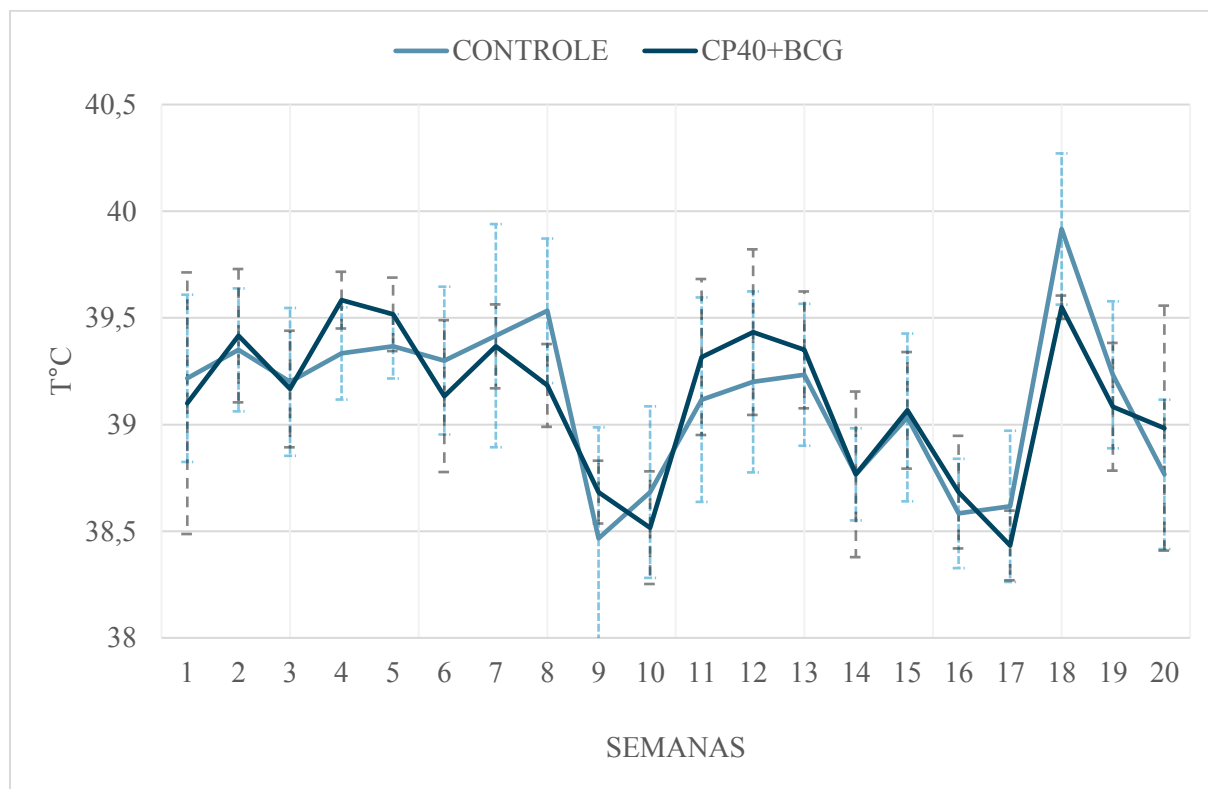
Fonte: Autor.

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).

A diferença média entre os dois grupos foi muito discreta, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) entre G1 e G2, demonstrando que o desafio com a cepa MIC-6 não teve um impacto significativo na temperatura dos animais que indique um quadro inflamatório ou infeccioso após desafio.

Ocasionalmente observou-se que alguns animais isolados apresentaram valores de temperatura abaixo de 38,5°C. Essa alteração se mostrou pontual e não foi acompanhada de outras manifestações clínicas. Além disso, há uma variação considerável nas temperaturas ao longo das semanas, o que indica que a temperatura das ovelhas foi fortemente influenciada por fatores externos, tais como: horário do dia, radiação solar, época do ano, estresse e/ou manejo.

Gráfico 2. Média e desvio padrão (Média $\pm$ DP) da temperatura retal de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, e acompanhados durante 20 semanas.

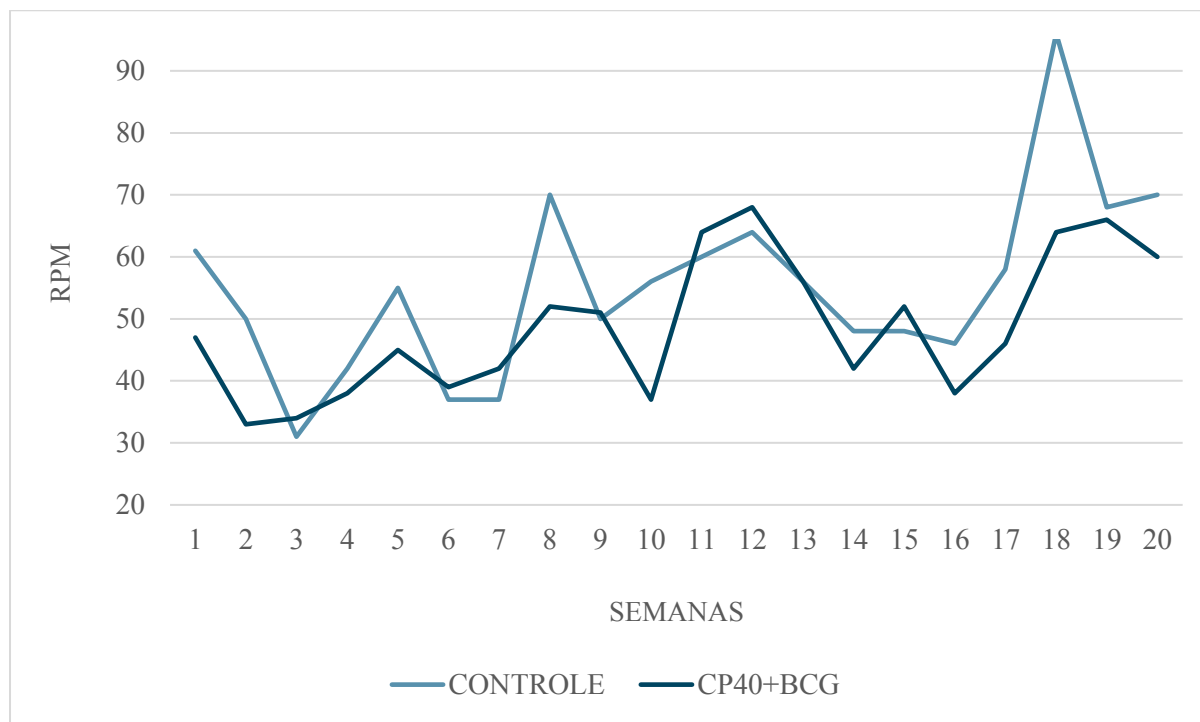


Fonte: Autor.

Nenhum animal apresentou aumento na frequência respiratória (taquipneia) típica de linfadenite caseosa (Gráfico 3). As faixas de valores para a FR estão dentro dos limites normais para ovelhas, entre 12 e 60 respirações por minuto (Cesar et al., 2004). A única exceção ocorreu próximo a semana 18, onde foi observado que dois animais do grupo controle apresentaram leituras mais altas, acima de 80, porém essa alteração foi momentânea e não acompanhada de outras alterações clínicas.

Não existe um padrão claro ou consistente de aumento e diminuição da FR ao longo das semanas, novamente indicando uma forte influência externa sobre os resultados.

Gráfico 3: Mediana de Frequência Respiratória de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, e acompanhados durante 20 semanas.

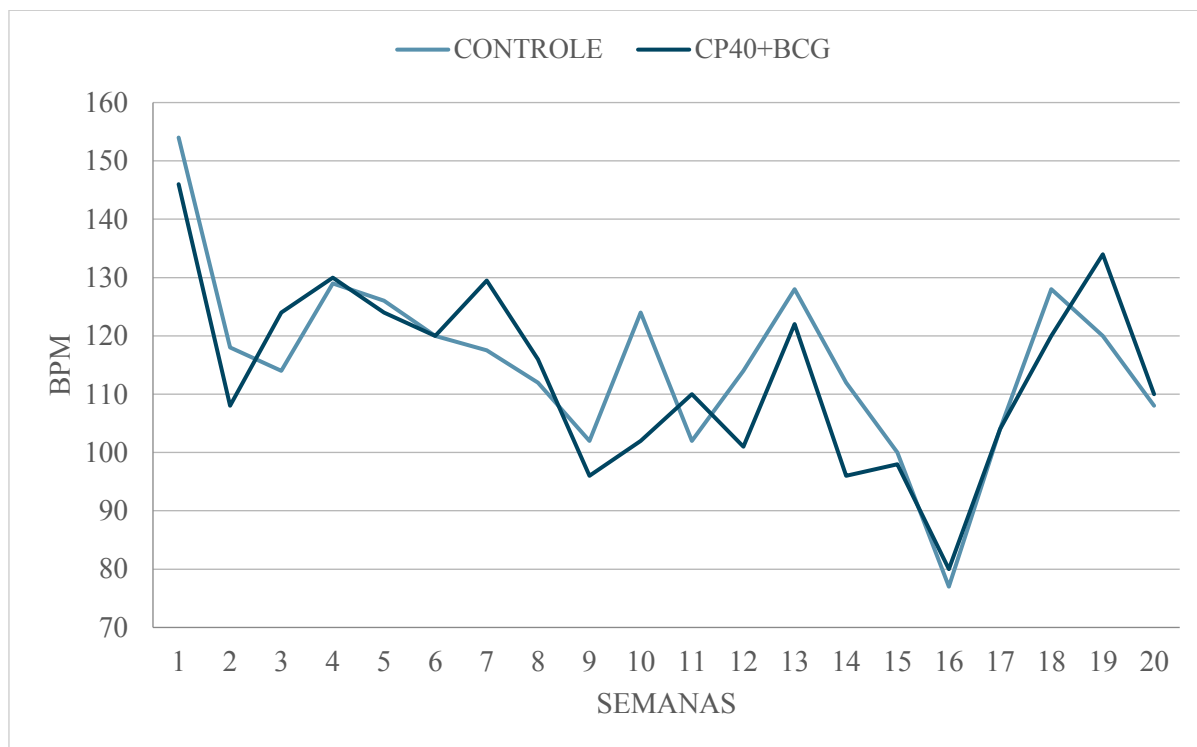


Fonte: Autor.

Quanto à frequência cardíaca dos animais (Gráfico 4), as taxas se apresentaram dentro da faixa considerada saudável para ovelhas, que é de aproximadamente 70 a 120 bpm (Cesar et al., 2004). Durante o estudo algumas ovelhas apresentaram valores de frequência cardíaca um pouco mais baixos, enquanto outras apresentaram valores bastante altos. Isso pode ser explicado por diferenças individuais entre os animais ou por diferenças nas condições em que foram analisados.

Assim como os valores de FR, os valores de FC não seguem um padrão claro de aumento ou diminuição ao longo das semanas e as frequências cardíacas variaram bastante, com valores mais altos no início do experimento e valores mais baixos nas semanas seguintes.

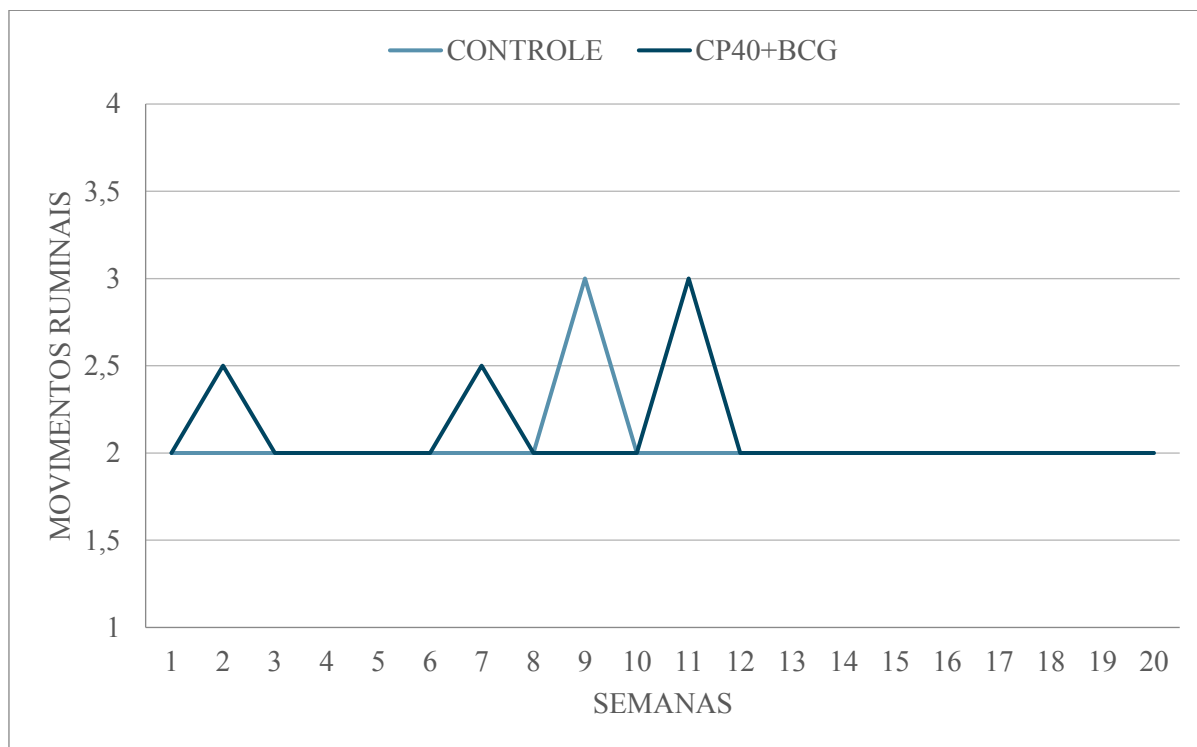
Gráfico 4: Mediana de Frequência Cardíaca de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, e acompanhados durante 20 semanas.



Fonte: Autor.

Em relação aos movimentos ruminais (Gráfico 5), não há diferenças estatísticas entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). Todos os animais apresentaram taxas de movimentos ruminais dentro da normalidade, que varia entre 1 e 2 movimentos por minuto (Faria, 2010).

Gráfico 5: Mediana de Movimentos Ruminiais de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, e acompanhados durante 20 semanas.



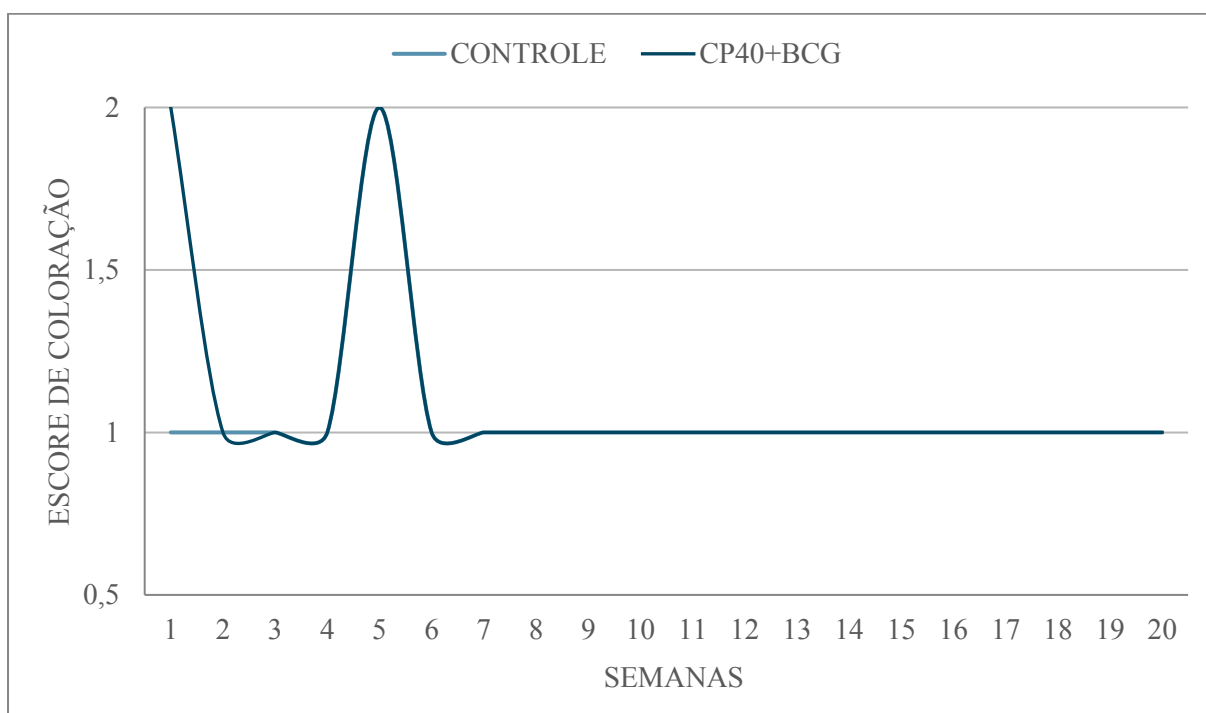
Fonte: Autor.

Os dados de coloração de mucosas nasal (Gráfico 6), ocular (Gráfico 7) e oral (Gráfico 8) dos ovinos ao longo das 20 semanas de acompanhamento estão apresentados abaixo. Quanto a esses parâmetros, é possível verificar que as alterações foram mais prevalentes nas semanas iniciais do experimento, o que coincide com o fato do protocolo de vermifugação ainda não ter sido concluído. Vale a pena ressaltar que a coloração de mucosa é uma análise de certa forma subjetiva, uma vez que é desafiador distinguir nuances sutis de cores, como o rosa pálido (normal) e o levemente pálido. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p > 0,05$).

De acordo com o Gráfico 6, na semana 5 a mucosa nasal se apresentou como pálida em muitos animais em comparação com as semanas anteriores, em que a coloração foi considerada normal. Essa alteração pode indicar uma possível mudança no estado de saúde das ovelhas ou alguma mudança na dieta. No entanto, é importante notar que uma única semana de alteração na coloração da mucosa não é necessariamente significativa e pode ser apenas um ponto fora da curva.

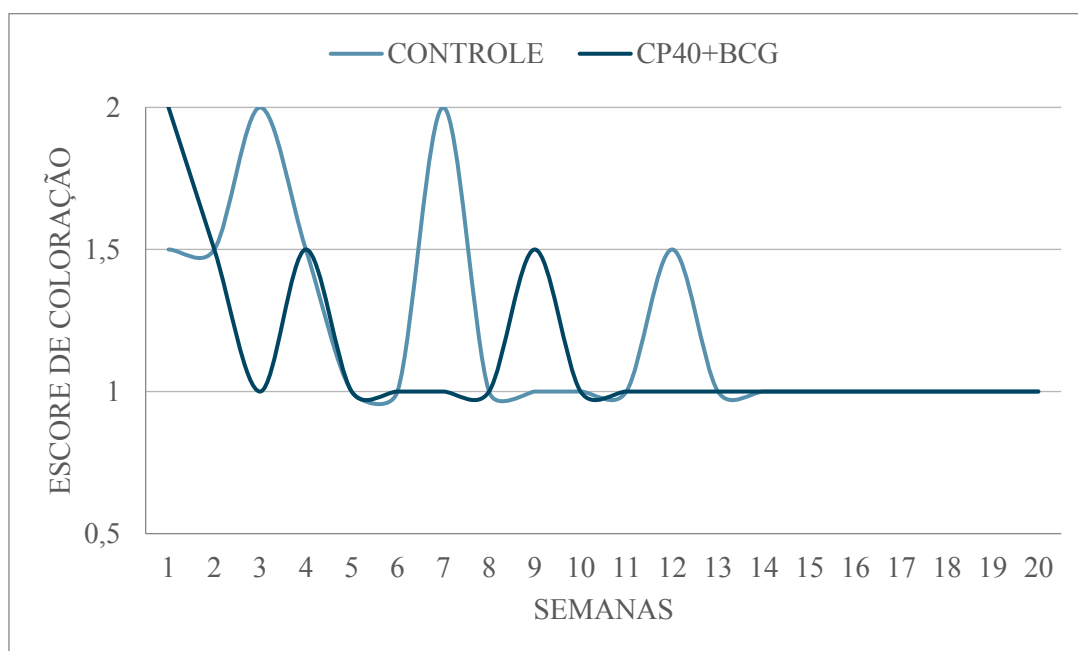
Durante o estudo, foram detectadas variações periódicas de palidez em mucosa ocular e oral nos 2 grupos (Gráfico 7 e 8, respectivamente). Entretanto, não é possível concluir com base nos resultados obtidos que a linfadenite caseosa tenha sido a causa dessas alterações, já que outros fatores podem ter contribuído para essa manifestação.

Gráfico 6: Mediana do escore de coloração de mucosa nasal de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, e acompanhados durante 20 semanas.



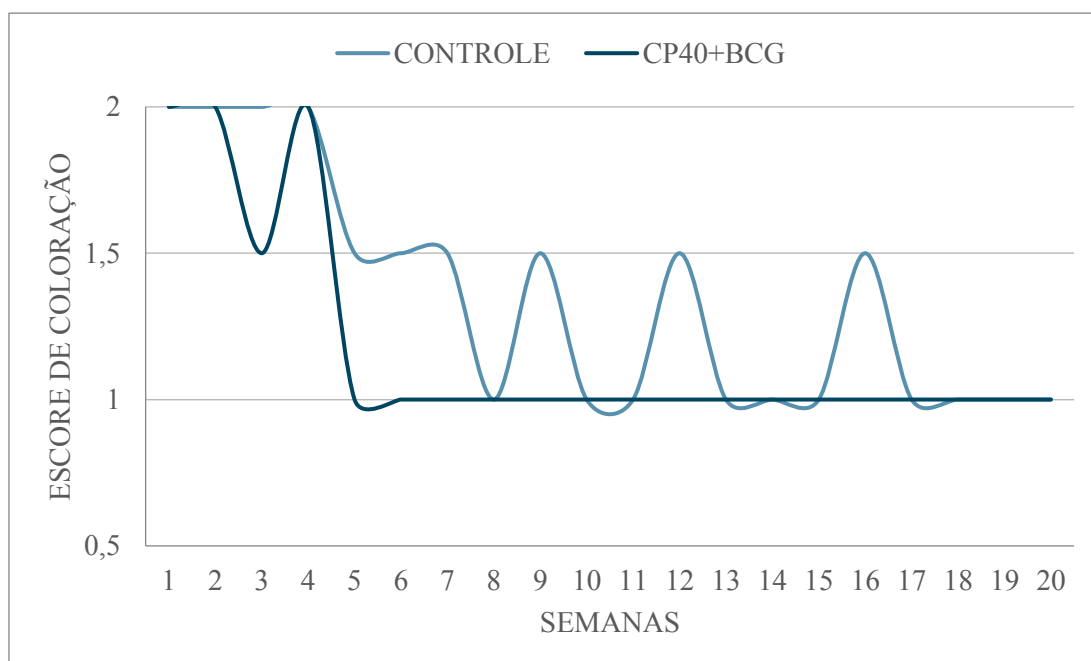
Fonte: Autor.

Gráfico 7: Mediana do escore de coloração de mucosa ocular de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, e acompanhados durante 20 semanas.



Fonte: Autor.

Gráfico 8: Mediana do escore de coloração de mucosa oral de ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, e acompanhados durante 20 semanas.



Fonte: Autor.

Deste modo, pudemos observar com esse estudo que a vacinação com a formulação contendo rCP40 e *M. bovis* BCG Pasteur não altera os parâmetros de peso, coloração de mucosas, temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais em longo prazo, uma vez que as avaliações foram feitas durante 20 semanas após o desafio. Isto pode ser um bom indicativo de que a formulação vacinal não gera reações adversas imediatas ou tardias, sendo segura para uso em ovinos.

Tabela 1: Comparação da Quantidade de Linfonodos Alterados em Animais Submetidos a Diferentes Protocolos de Tratamento, com ovinos vacinados com BCG + CP40 e não-vacinados após o desafio com a cepa virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*, e acompanhados durante 20 semanas.

	PAR	RET	SUB	MED	PES	PFE	POP	ING
Controle	0/6	1/6	1/6	0/6	1/6	0/6	2/6	1/6
CP40+ BCG	1/6	0/6	0/6	2/6	2/6	0/6	1/6	1/6

Fonte: Autor.

Os resultados são expressos em quantidade de linfonodos alterados nos grupos controle (n=6) e imunizado com CP40 e BCG (n=6), sendo PAR: parotídeo; RET: retrofaríngeo; SUB: submandibular; MED: mediastinal; PES: pré-escapular; PFE: pré-femoral; POP: poplíteo; ING: inguinal.

Os animais pertencentes tanto ao grupo controle quanto ao grupo vacinado apresentaram poucas lesões externas, não havendo diferenças significativas entre os dois grupos em relação à manifestação das lesões ($p>0,05$). Cabe ressaltar que as lesões observadas foram de baixa intensidade e com características similares em ambos os grupos.

Acreditamos que alguns aspectos podem ter influenciado a ausência de lesões em animais desafiados do grupo controle. Primeiramente, pode ser explicado pela origem dos animais utilizados neste estudo, que é desconhecida, o que torna incerta a exposição prévia dos animais ao *C. pseudotuberculosis*, que pode ter fornecido uma imunidade parcial ao agente.

Al-Gaabary et al. (2009) relata que animais mais jovens tendem a ser menos suscetíveis à linfadenite caseosa do que animais adultos, visto que a menor prevalência em animais menores de 1 ano pode ser atribuída à transferência passiva da imunidade materna. Assim, a idade dos animais utilizados em nosso estudo pode ter influenciado na baixa manifestação de lesões nos animais do grupo controle.

Nossos resultados são semelhantes ao de Moreira et al. (2021), avaliando formulações vacinais contendo combinações de proteínas recombinantes contra *C. pseudotuberculosis* em ovelhas com idade menor que 1 ano. Nove ovelhas foram divididas aleatoriamente em três grupos, sendo o Grupo 1 controle, e os Grupos 2 e 3 imunizados com diferentes combinações de proteínas recombinantes. Os animais foram desafiados com a cepa de *C. pseudotuberculosis* CAPJ4 por via subcutânea. Como resultado, dois dos três animais dos grupos 1 e 3 apresentaram apenas uma pequena lesão superficial próximo ao ponto de infecção do desafio. Apenas um animal do grupo 2 apresentou lesão granulomatosa no linfonodo esquerdo do mesmo lado do desafio. Dessa forma, não houve diferença entre a quantidade e a gravidade das lesões nos grupos vacinados e no grupo controle.

Até o momento, o nosso estudo representa o primeiro experimento a avaliar a eficácia da combinação da proteína recombinante rCP40 e BCG em espécies-alvo da linfadenite caseosa. É importante ressaltar que pesquisas realizadas em animais alvo são fundamentais para se avaliar a eficácia e a segurança de novas formulações vacinais, uma vez a maioria dos estudos são realizados em modelos animais distintos da espécie afetada, o que dificulta a avaliação da efetividade dos antígenos contra a linfadenite caseosa nas espécies-alvo (Pinho et al., 2021).

Exceto pela análise dos linfonodos, os resultados obtidos em nosso estudo apresentam uma grande diversidade, sem uma tendência óbvia ou consistente ao longo das semanas que possa ser associada à presença da linfadenite caseosa. Os parâmetros examinados estão dentro dos valores normais, embora haja algumas exceções, que podem ser atribuídas ao estresse causado pelo procedimento de avaliação e às condições ambientais e de manejo às quais os animais foram submetidos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O acompanhamento clínico de ovinos vacinados e não vacinados com a formulação de rCP40 e BCG demonstrou que a vacinação não altera os parâmetros de peso, coloração de mucosas, temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais, em longo prazo, o que pode ser um bom indicativo de que a formulação vacinal não gera reações adversas imediatas ou tardias, sendo seguras para uso em ovinos.

Além disso, mais pesquisas com formulações vacinais contra *C. pseudotuberculosis* testadas na espécie-alvo devem ser realizadas, abrindo caminho para o desenvolvimento de uma vacina 100% eficaz e segura em pequenos ruminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alencar, S.P., Mota, R.A., Coelho, M.C.O.C., Nascimento, S.A., Abreu, S.R.D.O. & Castro, R.S. (2010). Perfil Sanitário Dos Rebanhos Caprinos E Ovinos No Sertão De Pernambucano. **Ciência Animal Brasileira**. 11(1). P. 131–140. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/4051>. Acessado em março de 2023.
- Alves, F. S. F., Santiago, L. B., & Pinheiro, R. R. (2007). **Linfadenite caseosa**: o estado da arte. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/526524/linfadenite-caseosa-o-estado-da-arte>. Acessado em março de 2023.
- Al-Gaabary, M. H., Osman, S. A., & Oreiby, A. F. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Ruminant Research**, 87(1-3), 116-121. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448809002156?casa_token=5UVJggtPCOsAAAAA:pclsOMEFvmJx-XVvWdEXjoUkyfh6Ox2LwGF7k_J1VAhkkt-oJZn4jvr1i6OxDCXL_gj24fRTfD4. Acessado em março de 2023.
- Andersson, C. (2000). **Production and delivery of recombinant subunit vaccines** (Doctoral dissertation, Bioteknologi). Disponível em: <https://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A8775&dsid=255>. 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.
- Baird, G. J.; FONTAINE, M. C. Corynebacterium pseudotuberculosis and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179–210, nov. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17826790/>. Acesso em março de 2023.
- Barbosa, E. F. L. (2016). **Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por Corynebacterium pseudotuberculosis em pequenos ruminantes no estado de Goiás**. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/6007>. Acessado em abril de 2023.
- BARNABÉ, N. D. C., Alves, J. R. A., de Farias, A. E. M., Alves, F. S. F., Faccioli-Martins, P. Y., Pinheiro, R. R., ... & Alves, C. J. (2020). **Assessment of Caseous lymphadenitis in goats in a slaughterhouse in the Brazilian semi-arid region and estimates of economic losses due to carcass condemnation**. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1125069>. Acesso em março de 2023.
- Bastos, B.L., Loureiro, D., Raynal, J.T., Guedes, M.T., Vale, V.L.C., Moura-Costa, L.F., Guimarães, J.E., Azevedo, V., Portela, R.W. & Meyer, R. (2013). Association Between Haptoglobin And Igm Levels And The Clinical Progression Of Caseous Lymphadenitis In Sheep. **Bmc Veterinary Research**. 9(1). P. 254. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-9-254>. Acessado em março de 2023.

Bastos, B.L., Portela, R.W.D., Dorella, F.A., Ribeiro, D., Seyffert, N., Castro, T.L. De P., Miyoshi, A., Oliveira, S.C., Meyer, R. & Azevedo, V. (2012). *Corynebacterium Pseudotuberculosis: Immunological Responses In Animal Models And Zoonotic Potential*. **Journal Of Clinical & Cellular Immunology**. 01(S4). P. 1–15. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285983332_Corynebacterium_pseudotuberculosis_Immunological_responses_in_animal_models_and_zoonotic_potential. Acessado em março de 2023.

Carmo, F.B., Guimarães, A.S., Pauletti, R.B., Lage, A.P., Gonçalves, V.S.P., Meyer, R., Portela, R.W., Miyoshi, A., Azevedo, V., Gouveia, A.M.G. & Heinemann, M.B. (2012). Prevalência De Anticorpos Contra A Linfadenite Caseosa Em Criações Comerciais De Ovinos No Distrito Federal, Brasil. **Arquivos Do Instituto Biológico**. 79(2). P. 293–296. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/950142>. Acessado em março de 2023.

Cezar, M. F., Souza, B. B. D., Souza, W. H. D., Pimenta Filho, E. C., Tavares, G. D. P., & Medeiros, G. X. (2004). Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico semi-árido nordestino. **Ciência e Agrotecnologia**, 28, 614-620. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/qwhxJcQt3rK3fGbmjtyCP4G/?lang=pt>. Acessado em março de 2023.

Corrêa, J. I., Stocker, A., Trindade, S. C., Vale, V., Bastos, B., Raynal, J. T., ... & Meyer, R. (2018). Expression of six possible virulence factors of *C. pseudotuberculosis* in murine macrophage. **PUBVET**, 12(12). Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193055066>. Acesso em março de 2023.

Cruz, G. R. B., de Barros, J. R. L., dos Santos, D. G., de Lima, A. M., & da Silva, A. C. R. (2019). Aspectos sanitários na produção de caprinos e ovinos de produtores familiares no Semiárido Paraibano. **Revista Conexão UEPG**, 15(2), 129-134. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR2019I00007>. Acesso em março de 2023.

da Silva, A. P. M. **Respostas termorreguladoras e comportamentais de ovinos da raça morada nova no Semi-Árido Brasileiro**. Disponível em: https://www.ppgz.ufrpe.br/pt-br/dissertacoes?field_ano_value=&page=21. Acessado em março de 2023.

de Farias, A. E. M., Alves, J. R. A., Alves, F. S. F., Pinheiro, R. R., Faccioli-Martins, P. Y., Lima, A. M. C., ... & Alves, C. J. (2019). Seroepidemiological characterization and risk factors associated with seroconversion to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in goats from Northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 51, 745-752. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30421374/>. Acesso em março de 2023.

de Pinho, R. B., de Oliveira Silva, M. T., Bezerra, F. S. B., & Borsuk, S. (2021). Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 105, 2287-2296. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33651132/>. Acessado em março de 2023.

de Sá, M. D. C. A., Rocha Filho, J. T. R., Rosa, D. S., de Sá Oliveira, S. A., Freire, D. P., Alcantara, M. E., ... & Meyer, R. (2018). Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: Revisão. **Pubvet**, 12, 133. Disponível em: <http://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/982>. Acessado em março de 2023.

Dorella, F.A.D., Gustavo, L., Acheco, C.P., Liveirab, S.C.O., Iyoshia, A.M. & Zevedoa, V.A. (2006). *Corynebacterium Pseudotuberculosis*: Microbiology, Biochemical Properties, Pathogenesis And Molecular Studies Of Virulence. **Veterinary Research**. 37(2). P. 201–218. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16472520/>. Acessado em março de 2023.

Dorneles, J., Madruga, A. B., Neto, A. C. P. S., Rizzi, C., Bettin, É. B., Hecktheuer, A. S., ... & Dellagostin, O. A. (2020). Protection against leptospirosis conferred by Mycobacterium bovis BCG expressing antigens from Leptospira interrogans. **Vaccine**, 38(51), 8136-8144. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X20314067>. Acessado em março de 2023.

Droppa-Almeida, D., Vivas, W.L.P., Kelly, K., Silva, O., Rezende, A.F.S., Simionatto, S., Meyer, R., Lima-Verde, I.B., Delagostin, O., Borsuk, S. & Padilha, F.F. (2016). Recombinant Cp40 From *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Confers Protection In Mice After Challenge With A Virulent Strain. **Vaccine**. 34(8). P. 1091–1096. Disponível em: [Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Vaccine.2015.12.064](http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Vaccine.2015.12.064). Acessado em março de 2023.

Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2007). Identifying candidate subunit vaccines using an alignment-independent method based on principal amino acid properties. **Vaccine**, 25(5), 856-866. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X06010164?casa_token=-GitEH9xTkYAAAAA:B5ofr1o1PlkVHKRJ0JH-xTnTwcMLyFmLEAYfYGihBAFObAIZYsS3hwLrEHOJ3pEXd2zqG4F2E9df. Acessado em março de 2023.

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

Faria, W. G. (2010). **Aspectos fisiológicos de ovelhas Santa Inês alimentadas com distintas dietas durante dois períodos climáticos em Pedro Leopoldo–MG**. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, MG. 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.

Feitosa, F. L. F. (2008). **Semiologia veterinária–A Arte do Diagnóstico**. 2ª edição. São Paulo, SP: Editora Roca.

Gerelli, A., Backes, A.P., Walter, I.M., Rosário, P., & Viott, A.D. (2019). **ESTUDO RETROSPECTIVO DE CASOS DE LINFADENITE CASEOSA DIAGNOSTICADOS PELO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA NO PERÍODO DE 2012 A 2017**. Estudos em Medicina Veterinária 2. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/332514935_ESTUDO_RETROSPECTIVO_DE_CASOS_DE_LINFADENITE_CASEOSA_DIAGNOSTICADOS_PELO_LABORATORIO

DE_PATOLOGIA_VETERINARIA_NO_PERIODO_DE_2012_A_2017. Acessado em março de 2023.

Guimarães, A. DE S., Do Carmo, F.B., Pauletti, R.B., Seyffert, N., Ribeiro, D., Lage, A.P., Heinemann, M.B., Miyoshi, A., Azevedo, V. & Guimarães Gouveia, A.M. (2011). Caseous Lymphadenitis: Epidemiology, Diagnosis, And Control. **The Iioab Journal**. 2(2). P. 33–43. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285967469_Caseous_lymphadenitis_Epidemiology_diagnosis_and_control. Acessado em 2023.

Gonçalves, A. N. D. (2017). **Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático (ELISA) pra diagnóstico de Linfadenite caseosa em ovinos e caprinos**. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1087248>. Acessado em abril de 2023.

IBGE (2016). **Pesquisa Pecuária Municipal**. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/tabelas/brasil/2016>. Acessado em março de 2023.

Ítavo, C. C. B. F., Graça Morais, M. D., Ramos, C. L., Ítavo, L. C. V., Tomich, T. R., & Silva, J. A. D. (2011). Green propolis extract as additive in the diet for lambs in feedlot. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40, 1991-1996. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/pxpgmdLH8XrCzFwpTGGFS8x/abstract/?lang=en>. Acessado em março de 2023.

Kaba, J., Nowicki, M., Frymus, T., Nowicka, D., Witkowski, L., Szaluś-Jordanow, O., Czopowicz, M., & Thrusfield, M. (2011). Evaluation of the risk factors influencing the spread of caseous lymphadenitis in goat herds. **Polish journal of veterinary sciences**, 14(2), 231–237. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21721407/>. Acesso em março de 2023.

Leal, K.S., De Oliveira Silva, M.T., De Fátima Silva Rezende, A., Bezerra, F.S.B., Begnini, K., Seixas, F., Collares, T., Dellagostin, O., Portela, R.W., De Carvalho Azevedo, V.A. & Borsuk, S. (2018). Recombinant M. Bovis Bcg Expressing The Pld Protein Promotes Survival In Mice Challenged With A C. Pseudotuberculosis Virulent Strain. **Vaccine**. 36(25). P. 3578–3583. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29759378/>. Acessado em março de 2023.

Martins, E. C., Magalhães, K. A., Souza, J. D. F., Guimarães, V. P., Barbosa, C. M. P., & Holanda Filho, Z. F. (2016). Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura. **Boletim ativos de ovinos e caprinos**, 3(2), 3-6. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1068421>. Acessado em março de 2023.

Marshall, R. T. (1992). **Standard methods for the examination of dairy products**.

Moreira, L. S., Lopes, N. D. R., Pereira, V. C., Andrade, C. L. B., Torres, A. J. L., Ribeiro, M. B., ... & Marchioro, S. B. (2022). The Association of Bacterin and Recombinant Proteins Induces a Humoral Response in Sheep against Caseous Lymphadenitis. **Vaccines**, 10(9), 1406. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36146483/>. Acessado em março de 2023.

Mouhoub, E., Domenech, P., Ndao, M., & Reed, M. B. (2021). The diverse applications of recombinant bcg-based vaccines to target infectious diseases other than tuberculosis: An overview. **Frontiers in Microbiology**, 12, 757858. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34745066/>. Acessado em março de 2023.

Nascimento, I. P., & Leite, L. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **Brazilian journal of medical and biological research**, 45, 1102-1111. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22948379/>. Acessado em março de 2023.

Santana, M., Gomes, J., Rosinha, G., Soares, C., & Coelho, M. (2017). **Imunização com vacina de DNA contra Linfadenite Caseosa e análise da resposta imune em camundongos**. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1080289>. Acessado em abril de 2023.

Silva, J.W., Droppa-Almeida, D., Borsuk, S., Azevedo, V., Portela, R.W., Miyoshi, A., Rocha, F.S., Dorella, F. A, Vivas, W.L., Padilha, F.F., Hernández-Macedo, M.L. & Lima-Verde, I.B. (2014). Corynebacterium Pseudotuberculosis Cp09 Mutant And Cp40 Recombinant Protein Partially Protect Mice Against Caseous Lymphadenitis. **Bmc Veterinary Research**. 10(1). P. 965. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/965>. Acessado em março de 2023.

Souza, M.F., Carvalho, A.Q., Garino Jr, F. & Riet-Correa, F. (2011). Linfadenite Caseosa Em Ovinos Deslanados Abatidos Em Um Frigorífico Da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 31(3). P. 224–230. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0100-736x2011000300007&lng=pt&tlng=pt. Acessado em março de 2023.

Riet-Correa F. 2007. Linfadenite Caseosa, P.347-352. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. (Eds), **Doenças De Ruminantes E Equídeos**. 3ª Ed. Pallotti, Santa Maria

Rodríguez Domínguez, M. C. (2020). **Obtención y caracterización de las proteínas recombinantes PLD y CP40, factores de virulencia de Corynebacterium pseudotuberculosis ovis con potencial inmunogénico**. Disponível em: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/110109>. Acessado em março de 2023.

Walker, J., Jackson, H. J., Eggleton, D. G., Meeusen, E. N., Wilson, M. J., & Brandon, M. (1994). Identification of a novel antigen from Corynebacterium pseudotuberculosis that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and immunity**, 62(6), 2562-2567. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8188379/>. Acessado em março de 2023.