



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

Gabriel Freitas de Macedo

**Padronização do teste ELISA indireto utilizando a proteína recombinante cp09720 de
Corynebacterium pseudotuberculosis para o diagnóstico de Linfadenite Caseosa em
caprinos**

MOSSORÓ

2023

Gabriel Freitas de Macedo

Padronização do teste ELISA indireto utilizando a proteína recombinante cp09720 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico de Linfadenite Caseosa em caprinos

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

Orientadora: Profa. Dra. Isadora Louise Alves da Costa Ribeiro Quintans.

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.

M141p Macedo, Gabriel Freitas de.
Padronização do teste ELISA indireto utilizando a proteína recombinante cp09720 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico de Linfadenite Caseosa em caprinos / Gabriel Freitas de Macedo. - 2023.
37 f. : il.

Orientadora: Isadora Louise Alves da Costa Ribeiro Quintans .
Monografia (graduação) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia, 2023.

1. diagnóstico Sorológico. 2. esterase recombinante. 3. caprinos. I. , Isadora Louise Alves da Costa Ribeiro Quintans, 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.

Gabriel Freitas de Macedo

**Padronização do teste ELISA indireto utilizando a proteína recombinante cp09720 de
Corynebacterium pseudotuberculosis para o diagnóstico de Linfadenite Caseosa em
caprinos**

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

Defendida em: 11/ 10/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Isadora Louise Alves da Costa Ribeiro Quintans (UFERSA)
Presidente

Prof. Dr. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra (UFERSA)
Membro Examinador

Ms.C. Bárbara Monique de Freitas Vasconcelos (UFERSA)
Membro Examinador

*Dedico este trabalho à Maria de Fátima e
a Roberto de Macedo (In Memoriam).*

AGRADECIMENTOS

A força criadora de toda matéria, e detentora do tempo e espaço: obrigado pela existência...

À minha querida mãe, que desde o início desse projeto acreditou em mim e me apoiou com ações em minha decisão.

À meu querido pai; que residirá eternamente em meu coração.

À minha irmã Tábita Nakyra, que acreditou neste projeto.

À minha orientadora Isadora Louise que acreditou trabalho e gentilmente me guiou durante esse este projeto.

À UFERSA pela bolsa PICI concedida no último ano.

Aos membros da banca Francisco Silvestre, Ana Carla, Mara Thais e Bárbara Freitas, por acrescentarem a este trabalho e pelo conhecimento que me foi passado.

A equipe do Laboratório de Imunologia e Vacinologia Aplicada (LAVIA), especialmente Lenise Mota e Mônica Helen. E a equipe do Laboratório de Engenharia Genética, Genômica e Proteômica (LEGPRO), especialmente Lara Vitória por todo o conhecimento compartilhado.

Aos docentes que, humanamente e organicamente, inspiraram e motivaram a mim e a muitos outros a seguir adiante.

E as minhas amigas e amigos que iluminaram meus dias durante este projeto, assim como as diversas mãos que me foram estendidas ao decorrer do caminho.

ÉPIGRAFE

“Toda criança começa como uma cientista nata, e então nós arrancamos isso delas.”
Carl Sagan.

“A ciência e a vida cotidiana não podem – e não devem – ser separadas.”
Rosalind Franklin.

RESUMO

A caprinocultura registrou 12 milhões de cabeças no Brasil em 2023 e desempenha um papel importante para economia do país, fornecendo produtos diversos, porém enfrentam patogenias, como a linfadenite caseosa (LC) causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* (CP), que compromete cerca de 6,09% da produção. O método sorológico ELISA indireto é utilizado na detecção de LC, mas obter especificidade e sensibilidade confiáveis são um desafio. O uso de proteínas recombinantes no ensaio de ELISA indireto vem sendo empregado com o propósito de aprimorar a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos, sendo padronizadas diferentes proteínas. Portanto, este trabalho buscou a padronização e sensibilização do método ELISA indireto utilizando a proteína recombinante CP09720 de CP. A expressão heteróloga utilizou o plasmídeo recombinante pAE/*cp01850*. Sua purificação foi realizada com cromatografia de afinidade ao níquel e quantificação com método BCA (ácido bincônico). A identidade da proteína foi comprovada utilizando a técnica de SDS-PAGE. A padronização do teste ELISA indireto com a proteína rCP09720 foi realizada com o método *Checkerboard titration*. Foram utilizados um total de 80 amostras, 40 positivas e 40 negativas para LC. Foi obtida uma quantidade correspondente a 6,9 mg/L da esterase recombinante de tamanho correspondente a 35 kDa. A curva ROC resultou em ponto de corte de 0,06550, acurácia de 0,752, sensibilidade de 62,5% e especificidade de 70%. Estes resultados sugerem, que estudos adicionais devem ser realizados para aumentar o potencial da esterase CP09720 na detecção de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no teste ELISA indireto para detecção de LC em caprinos.

Palavras-chave: Diagnóstico Sorológico, esterase recombinante, caprinos.

ABSTRACT

Goat farming registered 12 million heads in Brazil in 2023 and plays an important role in the country's economy, providing diverse products, but faces pathogens such as *Corynebacterium pseudotuberculosis* (CP), which causes caseous lymphadenitis (CL) and affects around 6.09% of production. The indirect ELISA serological method is used in the detection of LC, but reliable specificity and sensitivity are challenging. The use of recombinant proteins has been used in the indirect ELISA test for standardization and validation of different proteins in search of ideal sensitivity and specificity. Therefore, this work aimed the standardization and validation of the recombinant protein CP09720 for detection of CL using the indirect ELISA method. Heterologous expression of the protein was obtained using the recombinant plasmid pAE/cp01850. The protein purification was carried out with nickel affinity chromatography and quantified with the BCA (bicinchoninic acid) method. The identity of the protein was confirmed using SDS-PAGE. The standardized indirect ELISA test with the rCP09720 protein was performed using the checkerboard titration method. A total of 80 samples were used, 40 positive and 40 negative for CL. An amount corresponding to 6.9 mg/L of recombinant esterase of size corresponding to 35 kDa was obtained. The ROC curve resulted in a cut-off point of 0.06550, accuracy of 0.752, sensitivity of 62.5% and specificity of 70%. It is recommended that further studies be conducted to increase the potential of CP09720 esterase in the indirect ELISA test for detection of LC in goats to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Keywords: Serological Diagnosis, recombinant esterase, goats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – **Método *checkerboard titration* em placa de 96 poços.** Nas colunas foram testadas as diferentes concentrações da proteína rCP09720, e nas linhas as diferentes concentrações de soro caprino. A concentração de anticorpo foi fixada em 1:10.000.....26
- Figura 2 – **Método *checkerboard titration* em placa de 96 poços.** A concentração da proteína rCP01850 foi fixada em 2µg/mL, e foram testadas diferentes concentrações do soro caprino nas colunas, seguindo o padrão de branco, positivo e negativo para cada concentração, e nas linhas diferentes concentrações do anticorpo conjugado.....26
- Figura 3 – **SDS-PAGE 12% contendo as eluições da proteína rCP09720 após purificação** poço 01: proteína CP09720 purificada como parâmetro, poço 02: vazio, poço 03: eluição 10% indicando presença de esterase recombinante, poço 04: eluição 20% indicando presença. Poço 05: eluição 30% indicando presença. demais poços não apresentaram presença de rCP09720.....28
- Figura 4 – **Curva ROC do ELISA indireto utilizando a proteína rCP09720.....29**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LC	Linfadenite caseosa
LB	Luria Bertani
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DO	Densidade Óptica
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
PLD	Fosfolipase D
ROC	Receiver Operating Characteristic

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
©	Copyright
®	Marca registrada
μ	Micro
mL	Mililitro
mg	Miligrama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1. A Linfadenite Caseosa.....	16
2.1.1. Sinais clínicos da Linfadenite Caseosa	16
2.1.2. O agente etiológico <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	17
2.1.3. Métodos de transmissão da Linfadenite Caseosa	18
2.1.4. Diagnóstico clínico e microbiológico da Linfadenite Caseosa.....	18
2.1.5. Diagnóstico sorológico da Linfadenite Caseosa	19
2.2. A proteína rCP09720 aplicada no diagnóstico sorológico por ELISA indireto	20
2.3. Ensaios imunoenzimáticos e a variação imunológica em resposta ao <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	21
3. HIPÓTESES.....	21
4. JUSTIFICATIVA.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. OBJETIVO GERAL.....	22
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. MATERIAIS E MÉTODOS	22
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura no Brasil encontra-se em constante crescimento, com uma produção de mais de 12 milhões de cabeças em 2022, sendo bastante significativa para a economia rural e o estado da Bahia seu maior produtor (IBGE, 2020). A atividade contribui com diversos produtos de importância econômica, tais como carne, leite, lã e couro (EMBRAPA, 2022). Porém, dentre os fatores que afetam negativamente essa cultura estão as causas patogênicas, e entre elas a linfadenite caseosa (LC), causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (EMBRAPA, 2022). Esta doença, de alcance global, muitas vezes é subnotificada, pois há países que não relatam a presença de casos, afetando as estatísticas e consequentemente as medidas para prevenção e controle da doença (Guimarães *et al.*, 2011).

A LC é considerada uma doença crônica por afetar a produção por longos períodos, o que ocasiona perdas em diversos produtos oriundos da caprinocultura, tais como a qualidade da lã, carne, couro e leite (Guimarães *et al.*, 2011). O consumo de carcaças e órgãos de animais infectados é proibido, somado ao índice de infecção que chega à 50% dos animais de uma produção, que acarreta em comprometimento e consequente perdas, comprometendo aproximadamente 6,09% da produção (Barnabé *et al.*, 2020). A doença se caracteriza pela inflamação dos linfonodos e consequente formação de abscessos, levando à condenação da carcaça do animal (Guimarães *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2011). A perda de peso também está entre os sintomas decorrentes da infecção (Oreiby, 2015).

O comprometimento da capacidade reprodutiva das fêmeas também é uma consequência da infecção (Souza *et al.*, 2011), o que se torna um problema visto que as fêmeas são majoritariamente afetadas pela forma clínica da doença, chegando a 62,86%, quando comparados a taxa de infecção de caprinos machos, que chega a 37,14% (Barnabé, 2018).

Dois grandes fatores impactam na identificação e no consequente tratamento dos casos de linfadenite caseosa: a presença de casos subclínicos e a ineficiência de tratamentos antibióticos (Sá *et al.*, 2018). Além disso, a principal medida empregada no controle da doença reside em medidas preventivas, como a melhora das técnicas de assepsia, isolamento dos animais infectados, já que formulações vacinais não oferecem cobertura vacinal total contra a doença (Barnabé, 2018). A busca por diagnósticos precisos sorológicos no diagnóstico sorológico da linfadenite caseosa se mostra uma opção como medida de prevenção da doença, porém mesmo com testes já padronizado e validados com alta

especificidade para ovinos, a variação de espécie impede que a sensibilidade e especificidade sejam aplicados no mesmo parâmetro (Hoelzle *et al.*, 2022) tornando necessária a prospecção por padronizações eficazes em métodos de detecção da linfadenite caseosa em caprinos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A Linfadenite Caseosa

A LC é uma doença infecciosa de alcance global, que pode acometer mais 30% da produção de caprinos em estados brasileiros como Piauí (33,7%), Rio Grande do Norte (33,2%) e Paraíba (28,9%) (EMBRAPA, 2020).

A LC é definida como uma patologia crônica, ou seja, que acomete animais por períodos acima de seis meses (Silva *et al.*, 2018). Também é classificada como zoonose ocupacional, que afeta majoritariamente criações de caprinos e ovinos, mas que pode chegar a infectar outros animais, como porcos, búfalos e veados, e até mesmo humanos (Guimarães *et al.*, 2011). Esta doença se caracteriza por condicionar o animal a um estado debilitante, trazendo prejuízo aos produtos oriundos da caprinocultura tanto em quantidade quanto em qualidade (Guimarães *et al.*, 2011). A LC afeta os níveis da produção de leite e compromete a qualidade da carne destinada ao consumo (Guimarães *et al.*, 2011).

Por se tratar de uma doença infectocontagiosa e subclínica, a LC traz grandes preocupações para a caprinocultura (EMBRAPA, 2020), visto que pode acometer os rebanhos de forma silenciosa. Quando a doença se apresenta somente internamente é chamada de linfadenite visceral, dificultando o diagnóstico clínico da doença, que ocorre através da observação de sintomas cutâneos típicos como granulomas em linfonodos e tecido subcutâneo (Dorella *et al.*, 2006). Entretanto, na forma visceral os sintomas só se manifestam tardiamente, quando os órgãos internos já estão comprometidos e as então bactérias migram para as regiões periféricas do animal (Faccioli-Martins *et al.*, 2018). A falta de um diagnóstico precoce eficaz leva à disseminação da doença de forma silenciosa (SÁ *et al.*, 2018). Sendo assim, é necessário melhorar a eficácia dos métodos de diagnóstico para identificação adequada da forma subclínica.

2.1.1. Sinais clínicos da Linfadenite Caseosa

A característica principal da LC se dá pela inflamação dos linfonodos, seguido da formação de granulomas esbranquiçados que tendem a aumentar seu volume com o desenvolvimento da doença (SÁ *et al.*, 2018). Os processos inflamatórios associados à formação de granulomas podem resultar em lesões na forma de abscessos caseosos e que

podem, ou não, apresentar purulência em sua forma clínica (Guimarães *et al.*, 2011). A LC resulta em lesões cutâneas que ocorrem em decorrência de infecção pela bactéria patogênica *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mas não são de exclusividade desse agente infeccioso, podendo ocorrer devido a infecção por outras bactérias (Silva *et al.* 2018). Além dos sintomas cutâneos associados a LC também há sintomas silenciosos, que leva o animal a um estado debilitante como a perda de peso e diminuição na produção de leite, majoritariamente associada ao quadro visceral da doença (Oreiby, 2015).

A LC pode se apresentar nas formas cutânea e/ou visceral, e um mesmo indivíduo pode portar as duas formas (Guimarães *et al.*, 2011). As lesões não se limitam apenas aos linfonodos, tornando-se sistêmicas à medida que se acometem também os demais órgãos do corpo, como pulmões, baço, rins, e até mesmo o sistema nervoso central (Souza *et al.*, 2011).

2.1.2. O agente etiológico *Corynebacterium pseudotuberculosis*

O agente infeccioso *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva, não encapsulada, fimbriada e que não gera esporos (Guimarães *et al.*, 2011). Os principais fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis* resultam de adaptações moleculares na superfície celular da bactéria (Souza *et al.*, 2011), tais como alteração na quantidade de ácido micólico associado à parede celular bacteriana (Oreiby, 2015). Estas modificações dificultam o controle da infecção pelo sistema imune do hospedeiro (Guimarães *et al.*, 2011). Além da presença disso, as bactérias secretam uma forte exotoxina com propriedade leucotóxica, a fosfolipase-D, impedindo que a bactéria seja fagocitada por macrófagos, levando ainda à morte dessas células (Rezende *et al.*, 2017). Devido ser um patógeno intracelular facultativo (Yitagesu *et al.*, 2020), *C. pseudotuberculosis* se mantém dentro da célula quando fagocitado, onde consegue realizar sua replicação celular (Dorella *et al.*, 2009). A exotoxina fosfolipase D realiza sua ação leucotóxica em ciclos sucessivos de fagocitose e lise dos macrófagos (Souza *et al.*, 2011).

Há duas variantes (biovariedades) para *C. pseudotuberculosis*: *equi*, que infecta principalmente equinos e *ovis*, responsável pela infecção de caprinos e ovinos (Guimarães *et al.*, 2011). É possível distinguir as cepas a partir da realização do teste de redução de nitrato, já que o biovar *equi* realiza a redução do nitrato, enquanto o biovar *ovis* é nitrato redutase negativo (Rosinha *et al.*, 2018).

2.1.3. Métodos de transmissão da Linfadenite Caseosa

São diversos os métodos de transmissão da LC. Os principais vetores biológicos da doença são os próprios animais, que infectam os demais ao seu redor através das secreções nasais resultantes do extravasamento dos abscessos e fezes. Além disso, também contaminam o ambiente como fontes de água, alimentos (Muthukumar, S. *et al.*, 2020; Guimarães *et al.*, 2011).

A contaminação por *C. pseudotuberculosis* pode ser particularmente perigosa nos casos subclínicos, em que não é possível identificar o animal infectado, pois a transmissão da bactéria pode ocorrer de forma silenciosa através da respiração do animal, que age como um difusor da doença por falta de diagnóstico (Ruiz *et al.*, 2020). Embora tenha sido comprovado que as infecções pulmonares resultam em uma menor taxa de disseminação da doença em comparação com casos em que a presença epidérmica dos abscessos é clinicamente evidente, este modo ainda contribui para sua transmissão (Guimarães *et al.*, 2011). De forma semelhante, diferentes espécies de moscas também foram descritas como vetores para disseminação da *C. pseudotuberculosis*, embora em menor escala (Guimarães *et al.*, 2011).

Regiões de clima árido ou semiárido, que possuem vegetação seca, contribuem para a ocorrência de pequenos incidentes, que por sua vez podem levar ao aparecimento de escoriações em animais (Silva *et al.*, 2018). Além disso, a ingestão de plantas cactáceas pode resultar em ulcerações orais, que podem servir como porta de entrada para o patógeno (Silva *et al.*, 2018). Devido à grande facilidade de disseminação da doença de forma imperceptível, fica evidente a importância do uso de testes de diagnósticos em programas de controle da doença, como método preventivo.

2.1.4. Diagnóstico clínico e microbiológico da Linfadenite Caseosa

O método mais empregado no diagnóstico da LC é a identificação dos sintomas clínicos da doença, que se dão a partir da inflamação dos linfonodos, e a posterior formação de abscessos resultantes da infecção (Guimarães *et al.*, 2011). Porém, nem sempre o abscesso é formado na infecção por *C. pseudotuberculosis* (Silva *et al.*, 2018), tornando o diagnóstico clínico insuficiente.

O diagnóstico clínico pode ser associado a métodos como ultrassonografias e radiografias torácicas, que podem revelar a presença de abscessos internos quando há o

desenvolvimento do quadro subclínico da doença, que ocorre quando não há a presença de sintomas visíveis (Guimarães *et al.*, 2011; Oreiby, 2015). Caso contrário, a identificação das lesões internas presentes no quadro subclínico, só ocorrerão no exame pós-morte (Souza *et al.*, 2011).

Além disso, outras bactérias também podem habitar os abscessos proeminentes ou com purulência (Souza *et al.*, 2011), sendo necessário maior precisão para a identificação do agente etiológico *C. pseudotuberculosis*, como por exemplo via caracterização morfológica e molecular.

Atualmente, no diagnóstico da LC o teste microbiológico é o que possui maior precisão, sendo classificado como “padrão ouro” (Ribeiro, 2009). O teste é realizado a partir de isolados obtidos das lesões resultantes da forma clínica. Porém, por se limitar apenas à forma clínica não se torna possível o emprego no diagnóstico dos casos em que há o quadro subclínico da doença (Ribeiro, 2009). A coleta do material biológico pode ser realizada a partir das lesões, ou através de punção aspirativa (Guimarães *et al.*, 2011). Levando em consideração que nem todo abscesso é formado por *C. pseudotuberculosis*, (Silva *et al.*, 2018) a assepsia do local sempre deverá preceder o diagnóstico microbiológico, a fim de determinar o agente responsável pelas lesões diminuindo a quantidade de contaminações (Oreiby, 2015).

2.1.5. Diagnóstico sorológico da Linfadenite Caseosa

Os testes sorológicos consistem na detecção, através do uso do soro do sangue, da presença de anticorpos específicos reagentes aos antígenos, que constituem e produzidas por *C. pseudotuberculosis* (Rodrigues, 2021). Estes marcadores tanto podem estar relacionados à imunidade inata, como anticorpos IgG, quanto relacionados à resposta adaptativa, como o interferon γ (gama), um fator de recrutamento de macrófagos (Oreiby, 2015). Este fator demonstrou potencial para diagnóstico da LC, sendo obtida sensibilidade de 91% e especificidade de 98% em testes do tipo ELISA (Guimarães *et al.*, 2011; Oreiby, 2015).

Atualmente existem diferentes tipos de ensaios sorológicos com diferentes abordagens, que podem usar métodos como extratos de lise celular, de proteínas secretadas ou proteínas recombinantes (Rezende *et al.*, 2016), hemaglutinação indireta, testes de hipersensibilidade e imunodifusão em gel de ágar (Guimarães *et al.*, 2011).

O método de diagnóstico sorológico ELISA (imunoensaio de absorção enzimática) é apontado como um teste relativamente eficiente na detecção de LC quando utiliza extratos

brutos e secreções celulares da *C. pseudotuberculosis* como imunoreagentes (Gonçalves, 2017). Esse método tem como vantagens a facilidade na aplicação, custo-benefício, sensibilidade e especificidade (Gonçalves, 2017; Oreiby, 2015). Já foram realizadas padronizações do teste ELISA indireto utilizando extratos celulares oriundos do cultivo de *C. pseudotuberculosis* onde foram obtidos resultados 93,5% de sensibilidade e 100% de especificidade (Carminati *et al.*, 2003).

Porém, a possibilidade de criar um método sorológico de maior precisão pode residir na pureza e concentração do antígeno utilizado no processo (Rezende *et al.*, 2016). Seguindo essa premissa, realizar testes sorológicos que possuam em sua composição concentrações únicas do antígeno imunodominante, utilizando a produção de proteínas recombinantes como forma de produzir esses antígenos em grande quantidade podem viabilizar sua produção em larga escala (Rezende *et al.*, 2016). A utilização emprego de proteínas recombinantes também tem sido utilizado em imunodiagnósticos para detecção de LC, e pode gerar maior viabilidade e especificidade na produção de testes ELISA indireto na detecção de *C. pseudotuberculosis* (Gonçalves, 2017; Guimarães *et al.*, 2011).

2.2. A proteína rCP09720 aplicada no diagnóstico sorológico por ELISA indireto

O sequenciamento de genomas tem sido uma importante ferramenta de desenvolvimento de imunoensaios, pois possibilita a identificação de genes responsáveis pela síntese de moléculas capazes de acionar respostas imunológicas no hospedeiro (Guimarães *et al.*, 2011). Entre os genes sequenciados de *C. pseudotuberculosis* está o gene cp1002_RS09720, descrito como altamente conservado e responsável pela codificação da proteína esterase CP09720 (Brum *et al.*, 2017). O código da proteína, anteriormente CP1957 foi reanotado para CP09720 (Bezerra *et al.*, 2021). Esterases são enzimas que hidrolisam grupamentos ésteres e tem função lipolítica (Castro, 2018). As esterases são utilizadas nos ensaios de detecção da LC por conter epítomos imunodominantes (Droppa-Almeida *et al.*, 2021). A proteína CP09720 já foi produzida de forma recombinante anteriormente através da expressão em *E. coli*, e empregada em imunoensaios e no desenvolvimento de vacinas de DNA (Rezende *et al.*, 2016).

Através do uso da ferramenta de bioinformática Mature Epitope Density (MED) em um ensaio envolvendo 2097 proteínas distintas de *C. pseudotuberculosis*, foi possível prever *in silico* que a proteína CP0970 apresenta um elevado número de epítomos de proteína madura (Rezende *et al.*, 2016). Isto sugere uma maior probabilidade de gerar resposta no sistema

imune à sua presença, além disso, essa proteína foi classificada em segundo lugar como um dos melhores alvos para aplicações em vacinas e diagnósticos (Rezende *et al.*, 2016).

Rezende e colaboradores (2016) expressaram de forma recombinante a proteína CP09720 e utilizaram como antígeno no método ELISA indireto para detecção de LC. O ensaio foi realizado utilizando soros de ovelhas e demonstrou especificidade de 92,5% e sensibilidade de 85% relativamente elevadas.

A CP09720 também foi utilizada em associação com a fosfolipase-D no diagnóstico da linfadenite caseosa em ovinos utilizando o método ELISA indireto, apresentando 97,5% de sensibilidade e 92% de especificidade (Silva *et al.*, 2019).

2.3. Ensaios imunoenzimáticos e a variação imunológica em resposta ao *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

O modelo animal utilizado afeta no diagnóstico Hoelzle e colaboradores (2013), pois a imunidade pode gerar respostas diferentes devido às especificidades imunológicas de cada espécie.

Portanto é necessária padronização e avaliação do método ELISA indireto utilizando a esterase recombinante 09720 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na identificação da linfadenite caseosa em caprinos e realizar a comparação dos resultados disponíveis até então entre as espécies ovina e caprina para identificar as variações de sensibilidade e especificidade em decorrência das diferentes espécies.

3. HIPÓTESE

A proteína recombinante CP09720 apresentará sensibilidade e especificidade elevadas quando utilizadas no teste sorológico de diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos pelo método ELISA indireto.

4. JUSTIFICATIVA

Em virtude das grandes perdas financeiras ocasionadas pela doença LC, torna-se necessário o desenvolvimento de novos testes diagnósticos com alta sensibilidade e especificidade. Alguns fatores que levam à disseminação da doença são: a ineficácia na

utilização de antibióticos para tratamento da LC, a falta de vacinas que concedam proteção eficaz e duradoura e os problemas de sensibilidade dos testes atuais de diagnóstico da doença, especialmente para a forma subclínica, evidenciando a necessidade de desenvolver métodos diagnósticos de alta precisão para um melhor controle da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Diferentes modelos animais podem gerar diferentes níveis de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da linfadenite caseosa, mesmo quando utilizado o mesmo antígeno. A utilização da proteína rCP09720 apresentou altos níveis de sensibilidade e especificidade em ovinos, portanto o presente trabalho irá investigar sua viabilidade para o diagnóstico em caprinos, onde será utilizado a mesma esterase recombinante. Sendo assim, este trabalho visa a utilização da proteína rCP09720 para diagnósticos sorológicos em caprinos.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar e validar um método de diagnóstico para LC em caprinos utilizando o método ELISA indireto com a proteína recombinante CP09720.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar a proteína rCP09720 de forma heteróloga;
- Padronizar o teste ELISA indireto utilizando a proteína recombinante CP09720 para diagnóstico da LC em caprinos utilizando o método *Checkerboard titration*;
- Analisar o desempenho do teste ELISA indireto utilizando a esterase recombinante CP09720 para o sorodiagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Aspectos éticos

Os procedimentos realizados no presente trabalho foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) sendo 23091.007402/2018-65 seu número de protocolo. Os procedimentos descritos neste trabalho foram executados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

6.2. Obtenção dos soros

Para o presente estudo foram utilizadas amostras do banco de soros do Laboratório de Vacinologia e Imunologia Aplicada (LAVIA). Neste experimento foram utilizados 80 soros, sendo 40 caracterizados como positivos e 40 como negativos. Os parâmetros de escolha dos caprinos utilizados na coleta previamente utilizados no experimento foram baseados nas condições de assepsia, e histórico endêmico de LC das propriedades onde foi coletado no caso dos soros para o controle positivo.

Para o grupo controle negativo, foram coletadas amostras de caprinos sem sinais clínicos de LC, de propriedades com bons parâmetros de assepsia, controle adequado dos casos da doença, e com idade de até 01 ano. Para confirmar a negatividade das amostras foi empregado o ensaio sorológico ELISA indireto, segundo metodologia de Seyffert *et al*, 2010, onde como parâmetro foram utilizados antígenos secretados da cepa 1002 de CP.

Para o grupo controle positivo, foram coletadas amostras de regiões endêmicas de LC onde animais apresentaram sintomas clínicos, como a formação de lesões decorrentes dos abscessos. A caracterização microbiológica foi utilizada para confirmação da positividade, ou seja, presença do patógeno *C. pseudotuberculosis*.

6.3. Expressão e purificação da proteína recombinante CP09720

A expressão da rCP09720 foi realizada com uso da cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star, com o plasmídeo recombinante pAE/cp09720. O plasmídeo utilizado foi obtido e doado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária, localizado na Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Para a etapa de transformação bacteriana foi utilizado o método de choque térmico. O processo foi realizado em um tubo eppendorf 1,5 mL, onde foram adicionados 100 µL de cloreto de cálcio (CaCl₂), a cepa de *E. coli* e 3 µL do plasmídeo pAE/cp09720. Em seguida

foi realizada a transformação por choque térmico, que consistiu em submeter o tubo com a bactéria e o plasmídeo e o cloreto de cálcio, ao resfriamento no gelo durante 15 minutos, seguido da elevação súbita da temperatura em banho-maria a 42 °C por 40 segundos. Após esse período, o tubo retornou ao gelo por 2 min.

Posteriormente foram adicionados 500 µL de meio líquido Luria Bertani (LB), seguido de incubação das células sob agitação a 37 °C por 2 horas. Em seguida, 100 ml do meio LB líquido contendo as bactérias transformadas foi plaqueado em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL). As placas contendo as bactérias foram incubadas a 37 °C por 2 horas.

As células foram centrifugadas por 2 minutos a 7000 rpm em tubos de eppendorf. Em seguida, parte do sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado no sobrenadante residual do eppendorf e em seguida plaqueadas. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa aquecida por 16 h para crescimento das colônias transformadas.

Após selecionadas as colônias recombinantes, foi realizada a produção em larga escala da proteína. Para isso foi preparado um pré-inóculo em tubo Falcon de 50 mL, onde foram adicionados 7 mL de meio LB e uma das colônias transformadas (oriundas do plaqueamento de seleção). O pré-inóculo foi incubado sob agitação por 16 h a 37 °C. Após esse período, 5 mL do pré-inóculo foi utilizado para crescimento em larga escala.

O cultivo em larga escala das bactérias transformadas foi realizado utilizando 5 erlenmeyers com volume de 250 mL cada. Neles foram adicionados 100 mL de meio LB líquido com ampicilina e 1 mL do pré-inóculo, onde foram incubados sob agitação em shaker orbital KASVI (Modelo K14-1215) a 37 °C. Duas horas após o início da agitação no shaker orbital foi realizada a avaliação do crescimento das colônias utilizando um espectrofotômetro UV. Quando a densidade óptica dos cultivos atingiu a faixa entre 0,7 foi realizado a indução da expressão da proteína com 100 µL de isopropil β-D-1-triogalactopiranosida (IPTG), e os cultivos foram colocados sob agitação por mais 3 h, a 37 °C. Após esse período, o cultivo foi transferido para tubos Falcon 50 mL e centrifugado por 15 min. a 7.000 rpm e a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet congelado para processos posteriores. Para o congelamento, o conteúdo dos tubos foi ressuspensionado em 5 mL de tampão PBS 1x gelado, seguido de transferência para novos dois tubos, formando um total de 50 mL. Foi adicionado a cada um dos dois tubos Falcon lisozima em proporção 1:1000, seguido de 15 ciclos de sonicação. Cada ciclo teve duração de 15 s, assim como seus intervalos.

Ao final do procedimento, os tubos foram agitados em câmara fria por 30 minutos e submetidos a uma nova centrifugação a 7000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a

centrifugação o sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspendido em solução de 30 mL de Akta Wash com uréia (NaH₂PO₄, NaCl 0,5 M, 20 mM, Uréia 8 M e Imizadol 5 mM), etapa que condicionou a solubilização das proteínas. Em seguida, os tubos foram novamente agitados em câmara fria por um período de 16 h.

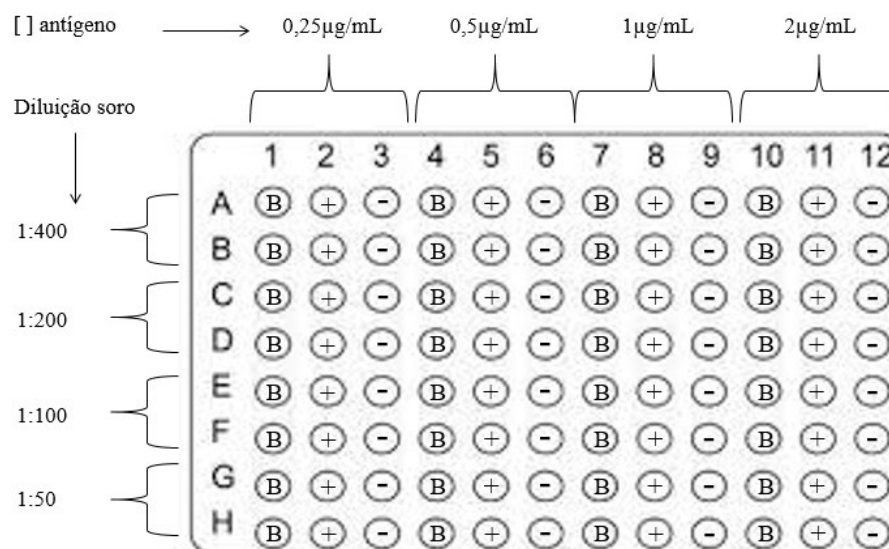
A seguir, os tubos foram centrifugados por 1 h e 30 min, em uma rotação de 10.000 rpm a 4°C. Em seguida foi realizada a filtração do sobrenadante utilizando membranas de 0,45 µm. A purificação da proteína recombinante CP09720 foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando coluna de sepharose com afinidade ao níquel Histrap™ (GE Healthcare). Após a purificação foi realizada a verificação do grau de pureza do material obtido, utilizando gel de SDS-PAGE a 12%. Em seguida, foi realizada diálise das amostras contendo a esterase recombinante CP09720, em tubos SnakeSkin™ 10.000 MWCO (Thermo Scientific). O kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific) foi utilizado para quantificar a concentração das proteínas obtidas. A confirmação da identidade da proteína expressa foi confirmada através de SDS-PAGE a 12%.

6.4. Padronização do método de ELISA indireto utilizando o método *checkerboard titration*

O método *checkerboard titration* (Barral *et al*, 2019) foi utilizado para a identificação das concentrações ideais da rCP09720, do anticorpo conjugado e dos soros a serem utilizados no ELISA. Inicialmente o procedimento seguiu a testagem de diferentes diluições da proteína, em diluições distintas de soro, mas utilizando a mesma concentração do anticorpo conjugado, objetivando encontrar a concentração ideal do antígeno.

Para preparação dos “pools” positivos e negativos de referência para padronização foi utilizada uma mistura de 3 soros positivos e 3 negativos. Já para determinar a concentração ótima da proteína foram testadas as concentrações de 0,25, 0,50, 1 e 2 µg/mL da proteína em tampão carbonato-bicarbonato. A proporção de diluição de soro utilizada foi 1:400, 1:200, 1:100 e 1:50 em PBS-T com 1% de caseína.

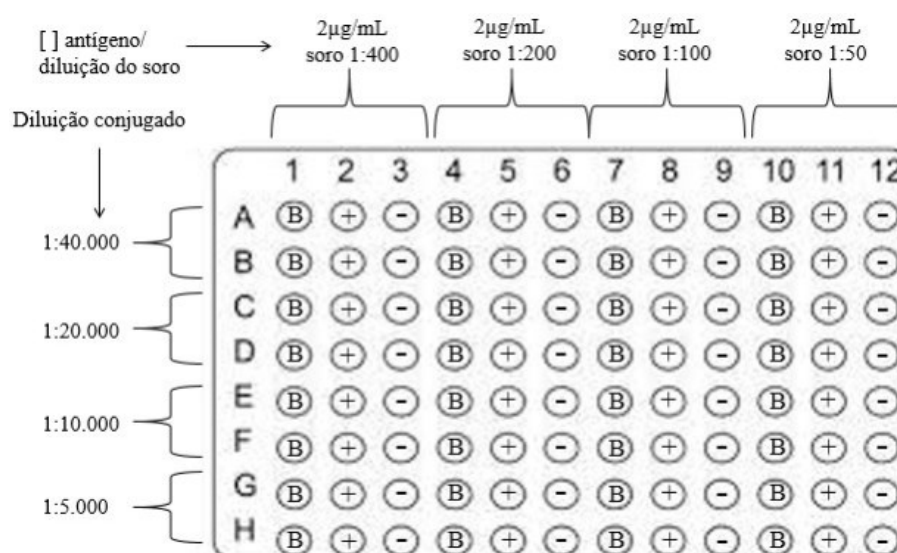
Figura 1: **método *checkerboard titration* em placa de 96 poços**. Nas colunas foram testadas as diferentes concentrações da proteína rCP09720, e nas linhas as diferentes concentrações de soro caprino. A concentração de anticorpo foi fixada em 1:10.000.



Fonte: Soares, 2022.

Após a determinação da melhor concentração do antígeno (rCP09720), as associações de diferentes concentrações do soro com o de anticorpo conjugado foram testadas nas proporções 1:40.000, 1:20.000, 1:10.000 e 1:5.000.

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



Fonte: Soares, 2022.

6.5. Análises estatísticas

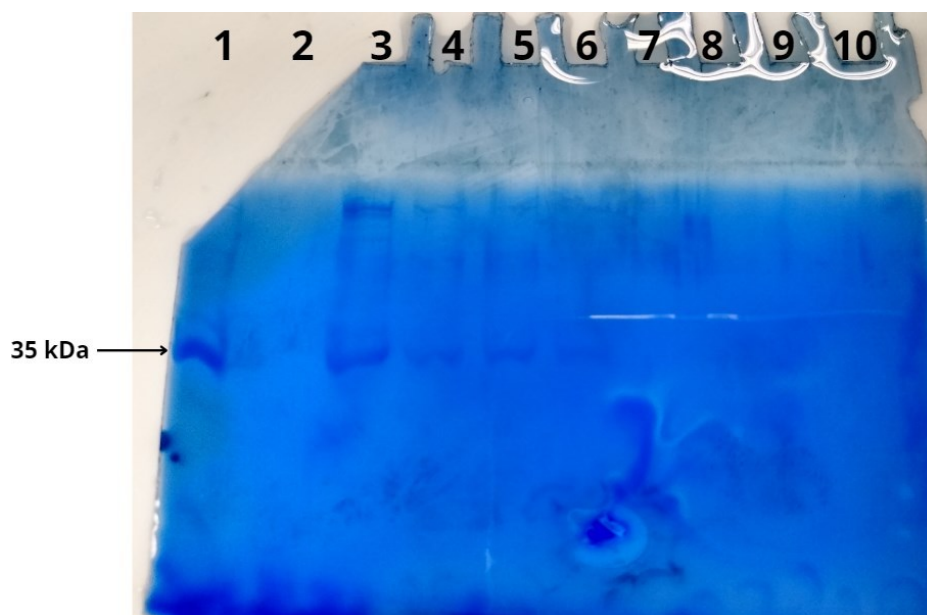
O ponto de corte da curva padrão, assim como o delineamento dos valores de especificidade e sensibilidade foram obtidos com base no perfil de absorbância obtidos no teste ELISA indireto, sendo considerado a média $\pm$ o desvio padrão. Também foi realizada a análise da curva ROC (*Receiver Operating characteristic*) pelo software SPSS v. 12.0 (IBM). Para medir a precisão do imunoensaio foi utilizada a área delineada abaixo da curva gerada no gráfico.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a expressão foi obtida uma quantidade correspondente a 6,9 mg/L da esterase recombinante de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Uma expressão anterior de rCP09720 foi realizada por Silva e colaboradores (2019), onde obtiveram o valor inferior de proteína recombinante, correspondente a 6 mg/L após a purificação. Brum e colaboradores (2017) também obtiveram 6 mg/L, ou seja, a mesma quantidade de proteína purificada que Silva. Portanto os valores obtidos no presente estudo após purificação se demonstraram satisfatórios, pois estiveram acima da média da expressão obtida por outros estudos. A quantidade de proteína obtida foi suficiente para o estudo em questão.

A técnica de SDS-PAGE confirmou a identidade da proteína expressa e purificada através do seu peso molecular que correspondente a 35 kDa (Figura 03).

Figura 03 - SDS-PAGE 12% contendo as eluições da proteína rCP09720 após purificação poço 01: proteína CP09720 purificada como parâmetro, poço 02: vazio, poço 03: eluição 10% indicando presença de esterase recombinante, poço 04: eluição 20% indicando presença. Poço 05: eluição 30% indicando presença. demais poços não apresentaram presença de rCP09720.



Fonte: Arquivo pessoal.

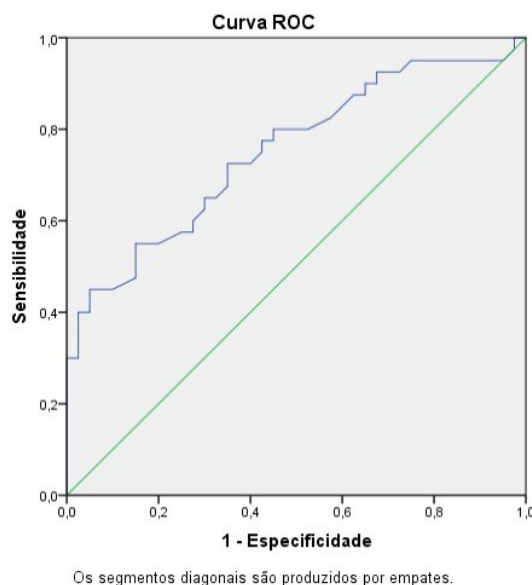
Como resultado da padronização do diagnóstico sorológico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos, utilizando o método *Checkerboard titration*, foram obtidas as melhores concentrações de proteína, soro e anticorpo.

A melhor concentração obtida na padronização da 09720 como antígeno foi 1 µg/mL. Na etapa de padronização do soro foi selecionada 1:100 como melhor concentração. A melhor concentração obtida na padronização dos anticorpos, realizada simultaneamente com a de soros, foi de 1:10.000.

O ponto de corte, ou *cut-off*, foi descrito por Zerbinati e colaboradores (2007) como avaliador da sensibilidade em função da especificidade, e é utilizado para delimitar o limite em que amostras são consideradas positivas, acima do valor estabelecido. Os resultados obtidos pelo teste ELISA indireto com os soros utilizados para formular a curva ROC (figura 02) resultaram em um ponto de corte de 0,06550. Como mencionado anteriormente, um valor alto de ponto de corte é desejado, tendo em vista que animais positivos podem ser falsamente detectados como negativos. Rezende e colaboradores (2016) obtiveram um ponto de corte (0,063) muito próximo do valor obtido neste trabalho (0,06550).

A partir do ponto de corte foi estabelecido o valor de acurácia do teste. A acurácia leva em consideração os resultados verdadeiros totais, tanto negativos quanto positivos, sobre o valor de amostras totais e resultou em um valor de acurácia de 0,752, que corresponde a 75,2%.

Figura 04 - Curva ROC do ELISA indireto utilizando a proteína rCP09720



Fonte: Autoria própria

Já a sensibilidade (ou recall) corresponde a taxa de verdadeiros positivos sob as amostras totais, e atingiu a marca de 62,5%, ou seja, consegue certificar verdadeiramente os verdadeiros positivos com uma taxa de 62,5%, e indica a precisão do teste em detectar a

presença de anticorpos que reagem contra a proteína em questão, e consequentemente detectar o animal infectado de fato.

A especificidade, que é a taxa de identificação dos verdadeiros negativos, atingiu uma taxa de 70%. Uma especificidade alta é importante para conferir precisão dos resultados, evitando que os testes sejam diagnosticados falsamente como positivos.

O uso de diferentes proteínas recombinantes empregadas no método ELISA indireto já é utilizado para diagnóstico da linfadenite caseosa por outros pesquisadores, sendo empregados tanto em diagnósticos ovinos quanto caprinos. Entre as proteínas utilizadas estão rPLD (fosfolipase D) e rCP01850 (Rezende, 2019; Bezerra, 2021). Sting e colaboradores demonstraram a possibilidade de atingir altas porcentagens de sensibilidade (98%) e especificidade (99%) em sorodiagnóstico de linfadenite caseosa utilizando proteínas recombinantes (Sting *et al.*, 2012)

O presente trabalho buscou a padronização e validação de somente uma proteína recombinante, pois de acordo com Rezende e colaboradores (2016) e Oreiby (2015) a utilização de antígenos de forma individual pode resultar em maiores índices de especificidade e sensibilidade nos testes diagnósticos, o que justifica a utilização da CP09720 recombinante de forma individual.

Os valores de especificidade e sensibilidade obtidos foram abaixo dos valores obtidos por Rezende (2016), que utilizaram a proteína rCP09720, a mesma utilizada neste trabalho, para sorodiagnóstico de LC com soros ovinos, obtendo valores de especificidade de 92,5%, sensibilidade de 85%, e um ponto de corte de 0,881, revelando altos índices de especificidade e relativamente altos índices de sensibilidade.

Utilizando a CP01850 recombinante de forma individual na detecção de LC em caprinos soares (2022) atingiu valores de 94,3% de sensibilidade de 100% de especificidade, além do ponto de corte 0,10425. Estes valores foram acima dos valores obtidos neste trabalho.

Os dados obtidos neste trabalho realizado com caprinos corroboram com as afirmações de Hoelzle e colaboradores (2013), que afirmam que diferentes espécies diferentes reagem de forma diferente a infecção causada por um mesmo patógeno. É possível que, a especificidade do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de cada modelo afete a resposta imune na produção de anticorpos para diferentes antígenos bacterianos (Hoelzle *et al.*, 2013), como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tais diferenças na resposta também impactam na formação de anticorpos que são produzidos, e que consequentemente neutralizam antígenos específicos (Hoelzle *et al.*, 2013).

Acredita-se que esses dados obtidos colaborem com os achados de Hoelzle e colaboradores (2022), compactuando com sua afirmação de que mesmo cepas de uma mesma espécie de patógeno podem produzir diferentes respostas imune a depender da espécies de animais, variando pelo modelo animal infectado. Tais dados direcionam a perspectiva de formulações de diagnósticos voltados a espécies específicas.

Sendo assim, os valores obtidos demonstram que a proteína recombinante CP09720 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* não obteve o mesmo desempenho obtido por Rezende (2016) e Soares (2022) em ovinos e caprinos, devido as diferenças nas sensibilidades e especificidades em diferentes espécies.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização e validação do ELISA utilizando a esterase recombinante CP09720 em soros caprinos revelou valores de sensibilidade (identificação de verdadeiros positivos) e especificidade (identificação de verdadeiros positivos) abaixo dos valores obtido por pesquisadores como Soares (2022) na padronização de uma proteína recombinante individual em caprinos. Tais índices são relevantes, pois conferem confiança na detecção de doenças por imunodiagnósticos, e são parâmetros que precisam ser pré-estabelecidos como altos para assegurar a viabilidade e reprodutibilidade do teste em escala comercial. Os valores obtidos do ELISA indireto utilizando a rCP09720 em ovinos foram superior aos resultados obtidos em caprinos. Acredita-se que a diferença seja resultante de diferenças nas respostas imune de cada modelo animal, sendo necessários mais estudos para o desenvolvimento de testes de imunodiagnósticos com maiores valores de especificidade e sensibilidade em caprinos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNABÉ, N. N. da C. **Avaliação de perda econômica por linfadenite caseosa em caprinos abatidos no semiárido brasileiro**. 2018. 46f. (Dissertação de Mestrado em Ciência Animal), Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande - Patos - Paraíba - Brasil, 2018. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/8858>>. Acesso em abril de 2022.

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

BARRAL, T. D. et al. A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1313–1323, 9 jul. 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/334326193_A_panel_of_recombinant_proteins_for_the_serodiagnosis_of_caseous_lymphadenitis_in_goats_and_sheep>. Acesso em outubro de 2023.

BEZERRA, F. S. B. et al. Saponin-adjuvanted recombinant vaccines containing rCP00660, rCP09720 or rCP01850 proteins against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Vaccine**, v. 39, n. 18, p. 2568-2574, 2021. Acesso em dezembro de 2022.

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**, v. 66, n. 5, p. 635-642, 2017. Acesso em abril de 2022.

CARMINATI, R. et al. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **R. Ci. méd. biol., Salvador**, v. 2, n. 1, p. 88-93, jan./jun. 2003. Acesso em outubro de 2022.

CASTRO, F. F. de. **Caracterização da lipase ligada ao micélio e da esterase secretada de *Aspergillus westerdijkiae***. 2018. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá, 2018, Maringá, PR. Acesso em janeiro de 2022.

RODRIGUES, F. de A. Imunização ante vacinação. **Brazilian Journal of Development**, 7(3), 21473–21480. Disponível em: < <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-047>>. Acesso em março de 2021.

DORELLA, F. A. et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert review of vaccines**, v. 8, n. 2, p. 205-213, 2009.

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

DROPPA-ALMEIDA, D. et al. Epítomos imunodominantes de proteína putativa *Corynebacterium pseudotuberculosis* apresentam interações com TLR-2 in silico. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 29655-29670, 2021.

DROPPA-ALMEIDA, D. et al. Desenho vacinal por imunoinformática e avaliação da proteção em um modelo animal para linfadenite caseosa. **Semana de Pesquisa e Extensão da Universidade Tiradentes - SEMPESq-SEMEX**, n. 19, 2018. Disponível em: <https://eventos.set.edu.br/sempesq/article/view/7195>. Acesso em: 12 mai. 2022

EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. **Linfadenite Caseosa (LC)**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/zoossanitario-linfadenite>. Acesso em: 20 abr. 2020.

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

GONÇALVES, A. N. D. **Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático (ELISA) pra diagnóstico de Linfadenite caseosa em ovinos e caprinos**. 2017. 65f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2017

GUIMARÃES, A. S., et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **The IIOAB Journal**, 2, 33-43. Jan. 2011. Disponível em: <
https://www.researchgate.net/publication/285967469_Caseous_lymphadenitis_Epidemiology_diagnosis_and_control > Acesso em

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **PPM - Pesquisa de Pecuária Municipal**. Disponível em:
<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>. Acesso em: 25 abr. 2022.

MOYA, C. F. et al. Impacto da Linfadenite Caseosa em caprinos em um criatório da região de Guarapuava/PR. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, 21(9), 13295–13303. (2023). <https://doi.org/10.55905/oelv21n9-152>. Acesso em abr. 2022

MUTHUKUMAR, S. et al. Outbreak of caseous lymphadenitis in an organized goat farm. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. SP-8(3): 09-11 2020. Acesso em: abr. 2022.

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

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

RIBEIRO, D. **Análise comparativa de métodos de diagnóstico para linfadenite caseosa em ovinos sintomáticos e assintomáticos**. 2009. 53 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/92211>>.

REIS, C. G. R. et al. Development of an ELISA using the recombinant protein CP1957 of *Corynebacterium pseudotuberculosis* for diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep. In: BMC Proceedings. BioMed Central, 2014. p. 1-2.

ROSINHA, G.M.S. et al. Avaliação da virulência de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em camundongos BALB/c. **Embrapa Gado de Corte-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2018.

RUIZ, H. et al. The relevance of caseous lymphadenitis as a cause of culling in adult sheep. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1962, 2020.

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

SEYFFERT, N. et al. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], 2010.v. 88, n. 1, p. 50–5.

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

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

SILVA, R. M. et al. Nem todo abscesso em pequenos ruminantes é causado por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1902-1908, 2018.

SOARES, M. E. C. **Padronização de ELISA indireto utilizando a proteína rCP01850 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico da Linfadenite Caseosa em caprinos**. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal Rural do Semi Árido. Mossoró, P. 35. 2022.

SOUZA, M.F. et al. Linfadenite Caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.3, p.224-230, 2011.

YITAGESU, E. et al. Survival Analysis of Clinical Cases of Caseous Lymphadenitis of Goats in North Shoa, Ethiopia. **Veterinary Medicine International**, v. 2020 1–8.

ZERBINATI, J. et al. Produção e padronização de um antígeno para um teste ELISA indireto no diagnóstico da linfadenite caseosa em soros caprinos. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v. 5, n. 3, p. 285-293, 2007.