



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Werônica de Souza Rocha

Vacina contendo isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*  
para avaliação da resposta imunológica em fêmeas ovinas

Petrolina/PE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Werônica de Souza Rocha

Vacina contendo isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*  
para avaliação da resposta imunológica em fêmeas ovinas

Trabalho apresentado a Universidade  
Federal do Vale do São Francisco –  
UNIVASF, Campus Ciências Agrárias,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da  
Costa

Petrolina/PE

2016

R672v Rocha, Werônica  
Vacina contendo isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*  
para avaliação da resposta imunológica em fêmeas ovinas/Werônica de  
Souza Rocha. -- Petrolina, 2016.  
X; 54f.: il. 16 cm.

Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciência  
Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus  
Ciências Agrárias, Petrolina, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa.

Referências.

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* x. 2. Vacina. 3.  
Lectina. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São  
Francisco

CDD 615.372

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir alcançar mais um objetivo, me dando vida e saúde para tornar tudo isso possível.

Minha família por me dar sempre o apoio necessário, pelos ensinamentos constantes e por todo amor. Meu esposo pelo apoio, atenção e paciência. Meus amigos que fizeram dessa caminhada mais leve.

Agradeço ainda ao meu orientador prof. Mateus Matiuzzi pelos ensinamentos e orientação, ao prof. Rodolfo Peixoto e prof. Wagner Félix pela dedicação em meu auxílio.

Sou imensamente grata a todos os meus amigos, os de perto, os de longe e especialmente aos amigos do Laboratório de Microbiologia pela amizade, auxílio e descontrações do dia a dia.

Agradeço a UNIVASF por ceder o espaço para realização do meu trabalho, à FACEPE pela concessão da bolsa, ao CNPq pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto, ao Laboratório de Bioquímica do CCA da UNIVASF e à UFBA, na pessoa de Maria da Conceição (Ceíça), pelo auxílio no desenvolvimento de atividades.

Gostaria ainda de agradecer a secretária do CPGCA Rosângela (Rosinha) pelo carinho, cuidados e prestatividade de sempre.

Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

## RESUMO

A ovino-caprinocultura é uma área que vem apresentando um forte crescimento no Brasil nas últimas décadas, com um rebanho constituído por 17.668.063 e 9.386.316 cabeças, respectivamente. Com o crescimento dos rebanhos, vem aumentando também a incidência das doenças bacterianas. Para o combate a essas enfermidades, tem-se estudado a utilização de vacinas. A constituição destas vacinas podem variar entre DNA, células bacterianas mortas, as bacterinas, e células bacterianas vivas, pela toxina inativada, os toxóides, do *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ou pela associação destes componentes, utilizando ou não algum tipo de adjuvante. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi elaborar uma vacina à base de células bacterianas de *C. pseudotuberculosis*, avaliar a resposta imunológica com base na técnica da atividade bactericida do soro de fêmeas ovinas vacinadas, avaliando ainda a atividade hemaglutinante no extrato de *C. pseudotuberculosis*. Para o alcance desses objetivos foram utilizadas as seguintes metodologias: os isolados utilizados para elaboração da vacina foram isolados de caprinos pertencentes as cidades de Petrolândia e Jatobá, PE, isolados e cultivados na bacterioteca do laboratório de microbiologia e imunologia animal da Univasf. Os animais após vacinados, passaram por coletas de sangue semanais e com o soro obtido através destas coletas foi realizada a atividade bactericida. O extrato obtido dos três isolados, foi colocado em contato com hemácias de coelho para avaliar a atividade hemaglutinante no extrato, a qual foi avaliada visualmente. Foi possível observar que após a vacinação, o sistema imunológico dos animais respondeu de forma positiva, sendo possível observar do aumento da atividade bactericida do soro desses animais, diminuindo a contagem de UFC/mL com o passar das coletas, fato este que está relacionado com a ativação do sistema de defesa dos animais, conhecido como sistema complemento. O ensaio de hemaglutinação utilizando hemácias de coelho foi positivo para função biológica da proteína com o extrato proteico, indicando presença de lectinas no conjunto de proteínas do *C. pseudotuberculosis*.

Palavras-Chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, vacina, lectina.

## ABSTRACT

The sheep-goat is an area that has shown strong growth in Brazil in recent decades, with a herd consisting of 17,668,063 and 9,386,316 heads, respectively. With the growth of herds, it has also increased the incidence of bacterial diseases. To combat these diseases, we have studied the use of vaccines. The constitution of these vaccines may vary between DNA killed bacterial cells, bacterins, and live bacterial cells, the inactivated toxin toxoids of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, or the combination of these components, with or without some type of adjuvant. Thus, the objective of this study was to develop a vaccine based on bacterial cells of *C. pseudotuberculosis*, evaluate the immune response based on the technique of bactericidal activity of serum from vaccinated sheep females still evaluating the hemagglutination activity in extract *C. pseudotuberculosis*. To achieve these objectives, the following methodologies were used: the isolates used for the preparation of the vaccine were isolated from goats belonging to the towns of Petrolândia and Jatoba, PE, isolated and cultured in bacterioteca microbiology laboratory animal and Immunology UNIVASF. The animals vaccinated after, underwent weekly blood samples and serum obtained through these collections was held bactericidal activity. The extract obtained from three isolated, was put in contact with rabbit red blood cells to evaluate the hemagglutination activity in the extract, which was assessed visually. It was observed that after vaccination, the immune system of animals responded positively and are recording increased bactericidal activity of the serum of these animals, reducing the CFU / mL count over the collections, a fact that is related to activation of the animal defense system known as the complement system. The hemagglutination assay using rabbit erythrocytes was positive for biological function of the protein with the protein extract, indicating the presence of lectins on the set proteins of *C. pseudotuberculosis*.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, vaccine, lectin.

## LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Gráfico 1. Média de contagem de UFC/mL na avaliação da atividade bactericida do soro de fêmeas ovinas vacinadas com bacterina preparada com <i>C. pseudotuberculosis</i> – Soro tratado termicamente, A. Soro não tratado termicamente, B.....	34
Figura 1. Visualização da atividade hemaglutinante na presença do extrato proteico de <i>C. pseudotuberculosis</i> e hemácias de coelho.....	38
Figura 2. Cromatografia de afinidade de lectina extraída de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias obtidas para UFC/mL ( $\times 10^6$ ) na avaliação da atividade bactericida do soro de fêmeas ovinas vacinadas e não vacinadas com bacterina preparada com isolados de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	35
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI- Brain Heart Infusion

g- grama

h- hora

kDa- QuiloDalton

kHz- Quilodalton

L- Litro

M- Molar

mg- Miligrama

min- Minuto

mL- Mililitro

nm- Nanomêtro

OD- Densidade óptica

rpm- Rotação por minuto

TSA- Tryptic Soy Agar

TSB- Tryptic Soy Broth

UFC- Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Importância econômica da criação de caprinos e ovinos.....	12
2.2 Linfadenite caseosa.....	13
2.2.1 Etiologia e aspectos epidemiológicos .....	13
2.2.2 Patogenia.....	15
2.2.4 Mecanismos de defesa contra linfadenite caseosa.....	16
2.2.5 Sinais clínicos.....	17
2.2.6 Controle e profilaxia.....	18
2.2.7 Utilização de vacinas no controle da linfadenite caseosa.....	19
2.2.8 Utilização de cromatografia de afinidade.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de resposta contra <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	24
4.2 Animais utilizados .....	24
4.3 Seleção dos isolados a serem utilizados no preparo das vacinas.....	24
4.4 Preparo das vacinas.....	24
4.5 Vacinação dos ovinos.....	25
4.6 Avaliação clínica dos animais.....	26
4.7 Extração de proteínas de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	26
4.8 Atividade hemaglutinante.....	26
4.8.1 Coleta e preparo das hemácias.....	26
4.8.2 Detecção de atividade hemaglutinante no extrato.....	27
4.9 Atividade bactericida do soro.....	27
4.10 Cromatografia de afinidade.....	28
4.10.1 Extração de proteínas de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	28
4.10.2 Purificação da lectina por cromatografia de afinidade.....	29

5. ANÁLISE ESTÁTICA.....	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6.1 Teste de ELISA.....	31
6.2 Vacinação .....	31
6.3 Atividade bactericida do soro.....	32
6.4 Atividade hemaglutinante.....	36
6.5 Cromatografia de afinidade em coluna D-manose ligante.....	37
7.CONCLUSÃO.....	41
8. ANEXOS.....	42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

## 1- INTRODUÇÃO

A ovino-caprinocultura é uma área que vem apresentando um forte crescimento no Brasil nas últimas décadas, com um rebanho constituído por 17.668.063 e 9.386.316 cabeças, respectivamente. Enquanto que no Nordeste o número desses animais é de cerca de 8.109.672 caprinos e 10.126.799 ovinos, destacando-se no submédio do São Francisco, os Estados da Bahia e Pernambuco apresentam-se como grandes produtores. Os municípios de Casa Nova, Uauá, remanso e Juazeiro no Estado da Bahia, destacam-se por sua produção, já no Estado de Pernambuco, as cidades de Floresta, Custódia, Sertânia e Petrolina também possuem números significativos do rebanho do estado (IBGE, 2014).

Reconhecida como uma atividade de extrema importância para a economia brasileira e em plena expansão, a caprino-ovinocultura participa do desenvolvimento socioeconômico do Nordeste e em especial da região Semiárida. Nos últimos anos mudanças no sentido de melhorar e consolidar a cadeia produtiva têm sido realizadas, visto que o semiárido possui em sua essência criações voltadas para a subsistência. Apesar de existirem alguns entraves para o seu crescimento associados em grande parte às condições climáticas, essa atividade vem despertando a atenção de governantes, técnicos e produtores, com aumento de pesquisas na área de produção animal até o beneficiamento dos seus produtos, melhorando a organização dos produtores, as tecnologias de manejo nutricional, reprodutivo e genético, para aumentar a demanda e principalmente a qualidade do negócio como um todo (SEBRAE, 2005; VIDAL et al., 2006).

Apesar do tamanho dos rebanhos nessas regiões e de sua participação na renda familiar, a sua produtividade ainda é baixa, devido a diversos fatores, como a irregularidade das chuvas, causando escassez de alimentos e manejo sanitário inadequado ou ausente. No entanto, nos últimos anos ressalta-se melhoria nos sistemas de criação dos pequenos ruminantes em função do aumento da demanda de carne e leite pelo mercado consumidor (PEDROSA et al., 2003).

Sá et al., 2013, observaram uma elevada incidência de lesões características de linfadenite caseosa e consequente isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos provenientes dos abatedouros das cidades de Petrolina / PE e Juazeiro / BA, Brasil. Nesse mesmo estudo, destacaram a comum ocorrência de lesões generalizadas características da linfadenite caseosa que acomete os animais desta região.

Dentre as enfermidades que ocorrem por falta de adoção do manejo sanitário, destaca-se a Linfadenite Caseosa (LC) popularmente conhecida como mal do caroço. Esta enfermidade crônica é causada pelo agente *Corynebacterium pseudotuberculosis* e caracteriza-se por abscessos externos e internos. Como consequência da infecção, o animal apresenta enfraquecimento geral e baixa produção de carne e leite, chegando a causar a morte. Cerca de 90% das propriedades caprinas do sertão do estado de Pernambuco apresentam a forma clínica da doença (ALENCAR, 2010). O *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente causador da linfadenite caseosa em caprinos e ovinos, sendo responsável por significativas perdas econômicas na ovinocaprinocultura mundialmente, podendo acometer também a espécie equina (GUEDES, et al., 2015).

O objetivo do presente trabalho foi elaborar uma vacina à base de células bacterianas de *C. pseudotuberculosis*, avaliar a resposta imunológica com base na técnica da atividade bactericida do soro de fêmeas ovinas vacinadas, avaliando ainda a atividade hemaglutinante no extrato de *C. pseudotuberculosis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância econômica da criação de caprinos e ovinos

Ao longo de décadas, a caprinovinocultura foi considerada uma atividade marginal ou de subsistência na região Nordeste do Brasil, normalmente com baixa produtividade e realizada por produtores desprovidos de capital financeiro e de recursos tecnológicos. Entretanto, atualmente, a produção destes pequenos ruminantes caracteriza-se como uma atividade de grande importância cultural, social e econômica para a região, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento do Nordeste (COSTA, R. G. et al., 2008).

A produtividade dos sistemas de criação é de extrema importância e nesse contexto é necessário pesquisar formas de aumentar os índices produtivos da caprino-ovinocultura (BOUTONNET, 1999; MORRIS, 2009).

De acordo com Moraes Neto et al. (2003), a caprinovinocultura representa uma boa alternativa de trabalho e renda, visto a produção de alimentos de alto valor nutricional (leite, carne e vísceras), bem como de pele de excelente qualidade, além da adaptabilidade dos animais aos ecossistemas locais. Embora, segundo os autores, em virtude do elevado grau de incertezas e riscos, a pecuária nordestina torna-se dependente de uma reformulação dos modelos tradicionais de planejamento e administração. Logo, torna-se necessário, inicialmente, um conhecimento prévio dos sistemas de produção, atualmente utilizados no Semiárido nordestino, de maneira a verificar os principais problemas existentes, e numa etapa posterior solucioná-los, permitindo um desenvolvimento sustentável da atividade na região (Castel et al., 2003).

Segundo Souza et al., (2015), a escolha certa da raça para criação variando entre regiões, depende de vários fatores, tais como a finalidade, o mercado, a localização, o clima, as características de adaptação dos animais e o nível tecnológico adotado pelos produtores.

Segundo Filgueira (2009), o manejo sanitário dos caprinos e ovinos é precário, a mortalidade de animais, independente do regime de criação é alta, principalmente de jovens. Mesmo em propriedades destinadas a produção de leite, muitas vezes, não existe uma preocupação rigorosa quanto a higiene e qualidade do leite, aumentando as perdas por problemas sanitários.

Para a transição e consolidação da caprino-ovinocultura como agronegócio, é necessário buscar o ganho coletivo, sensibilizar os envolvidos nos diferentes segmentos da cadeia produtiva. Organizar, articular e integrar satisfatoriamente todos esses segmentos, objetivando fornecer ao consumidor final uma carne de qualidade, com regularidade de oferta através da produção em escala a um preço competitivo, evitando o aparecimento de doenças infecciosas (SAMPAIO et al., 2009).

## 2.2 Linfadenite caseosa

### 2.2.1 Etiologia e aspectos epidemiológicos

A linfadenite caseosa é distribuída em todo o mundo tendo sua distribuição entre rebanhos de caprinos e ovinos, embora em algumas regiões a sua prevalência pode estar sub notificada. A disseminação desta enfermidade em todo o mundo provavelmente ocorreu por meio da importação de animais infectados (GUIMARÃES et al., 2011).

Distribuída em grande parte do mundo, a LC é encontrada na América do Norte e América do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Europa, Ásia e África (ARSENAULT et al., 2003). Souza et al. (2011), observaram a prevalência e a distribuição de lesões da LC em ovinos no município de Mulungu (Paraíba) e encontraram 15,9% de lesões macroscópicas semelhantes à LC. Em estudo no sertão de Pernambuco, Alencar et al. (2010) visitaram 150 propriedades, observando a presença de abscessos cutâneos, sugestivos de LC em 92,5% das propriedades estudadas. No estado do Ceará, Pinheiro et al. (2000), analisaram 127 propriedades, verificando que a ocorrência de LC é de 66,9%.

O agente causador desta enfermidade é a bactéria *C. pseudotuberculosis*, que foi descrita pela primeira vez por Nocard em 1888, em um caso de linfangite bovina. Este microrganismo além de causar a linfadenite caseosa, tem sido relatado em outras enfermidade por ele produzidas em diversas espécies, tais como a linfangite ulcerativa dos equinos, abscessos superficiais em bovinos, suínos, cervos e animais de laboratório. O patógeno também já foi isolado de búfalos, veados, porco espinho, lhamas e camelos (DORELLA et al., 2006).

O *C. pseudotuberculosis* caracteriza-se como um bacilo Gram-positivo pleomórfico, pequeno, irregular, imóvel, aeróbico, intracelular facultativo de macrófagos, fermentativo e não formador de esporos. As colônias possuem aspecto esbranquiçado e são rodeadas por zona estreita de hemólise completa, medindo 0,5 a 0,6  $\mu\text{m}$  por 1 a 3  $\mu\text{m}$ , podendo apresentar aspecto cocóide, de clavas ou bacilos, mostrando-se isolado ou formando grupamentos irregulares. Em esfregaços, aparecem corados individualmente, em pares ou em paliçadas e em grupos angulares semelhantes a letras chinesas (HOLT et al., 1994; QUINN et al., 1994).

Os abscessos quando rompidos drenam conteúdo caseoso, espesso de coloração branca, ou esverdeada, com consistência pastosa, que contém grande quantidade de microrganismos viáveis, podendo sobreviver por meses no ambiente (BELCHIOR, 2006; MCKEAN et al., 2007).

Peel et al., (1997), relataram dez casos de linfadenite caseosa em pacientes humanos na Austrália. Em todos os casos os pacientes mantinham contato com pequenos ruminantes, estes, por sua vez, eram portadores da enfermidade, afirmando assim seu caráter zoonótico. Uma das formas que selecionaram para controlar essa transmissão foi a vacinação dos animais que conseqüentemente diminuiria a transmissão para os seres humanos.



### 2.2.2 Patogenia

A partir da infecção por via oral, respiratória e ou contaminação de feridas, a bactéria sofre a fagocitose, por intermédio dos neutrófilos e macrófagos (PATON et al., 2003). Um dos fatores que favorecem a infecção por *C. pseudotuberculosis* é o tipo de vegetação existente onde as plantas atuam como causadoras de ferimentos na pele de caprinos e ovinos (Riet et al., 2007).

Após a fagocitose o microrganismo mantém-se viável no interior celular e é sequestrado principalmente para os linfonodos regionais, principalmente os pré-currais, pré-escapulares ou sub-mandibulares, induzindo a formação de múltiplos piogranulomas (SMITH, 2003 e PUGH, 2004), que podem coalescer e formar grandes abscessos (PATON et al., 2003). A disseminação do microrganismo do linfonodo regional para outros órgãos e tecidos depende da virulência da linhagem, da carga bacteriana infectante e quadro clínico do animal (BELCHIOR, 2006). A bactéria atinge outros órgãos alvo incluindo pulmão, fígado, rins e encéfalo, determinando a forma visceral grave da doença através da disseminação via linfohemática (MCKEAN et al., 2007).

Existe uma camada lipídica no *C. pseudotuberculosis* que representa uma proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos, permitindo também aderência dos microrganismos promovendo uma citotoxicidade local (Radostits et al., 2002). Além disso, esta camada permite a sobrevivência da bactéria por longos períodos no meio ambiente (Baird e Fontaine, 2007).

A produção de uma exotoxina denominada fosfolipase D (pld), também está ligada a virulência desse microrganismo. Sabe-se que, nos estágios iniciais de infecção, ela aumenta a sobrevivência e a multiplicação do *C. pseudotuberculosis* (QUINN et al., 1994; MEYER et al., 2002). A enzima fosfolipase D (pld), que possui ação de exotoxina glicoproteica ou citotoxina capaz de hidrolisar a esfingomielina, atua no enfraquecimento das membranas celulares (HODGSON et al., 1999). Com isso, acredita-se que a produção dessa toxina está intimamente ligada à capacidade de disseminação bacteriana no hospedeiro, além de atuar no auxílio a

bactéria no escape da fagocitose por neutrófilos (D'AFONSECA et al., 2008; YOZWIAK & SONGER, 1993).

Sá et al. (2013) em um dos seus estudos, observaram que dos 168 isolados de *C. pseudotuberculosis* provenientes de caprinos e ovinos, utilizando a técnica de PCR, confirmaram a presença do gene da fosfolipase D (PLD) em todas as amostras.

A fosfolipase D é uma exotoxina responsável pela disseminação do patógeno dentro do hospedeiro, além de atuar no aumento da permeabilidade vascular local (CARNE; ONON, 1978). Seu papel na virulência foi confirmado quando uma cepa modificada geneticamente para exotoxina mostrou-se incapaz de causar a linfadenite caseosa (WALKER et al., 1994; SIMMONS; HODGSON; STRUGNELL, 1997; SIMMONS et al., 1998).

O aumento da adaptabilidade das cepas em diferentes hospedeiros, podem ser influenciados pelas ilhas de patogenicidade e fatores de virulência. Esta característica está associada à absorção de ferro, carbono e magnésio atenuando as condições de sobrevivência das bactérias sob condições de estresse (RUIZ et al., 2011).

### 2.2.3 Mecanismos de defesa contra linfadenite caseosa

Em resposta a infecções, o sistema imune inato responde rapidamente à invasão de algum agente patogênico. Um importante componente dessa resposta imediata é o sistema complemento. Este, é composto por uma complexa rede de comunicação no qual há uma interação entre proteínas de reconhecimento de padrões, proteases, proteínas séricas, receptores e reguladores (TIZARD, 2014).

Por meio de diferentes vias, as proteínas do sistema complemento podem ser ativadas, fazendo com que algumas dessas moléculas se liguem de forma covalente à superfície de microorganismos invasores, estas, uma vez ligadas, podem levar à lise celular. Em animais saudáveis não infectados, o sistema complemento permanece inativo, sendo ativado por meio de padrões moleculares associados a patógenos na superfície de agentes infecciosos ou por anticorpos ligados a antígenos (TIZARD, 2014).

O *C. pseudotuberculosis* tem a capacidade de estimular a imunidade celular por conta da sua natureza intracelular facultativa, assim como a imunidade humoral, que é principalmente devido à produção do PLD (STING et al., 2012).

Pode haver padrões anormais da ativação do sistema caso haja deficiência de qualquer componente proteico. Enquanto que a ausência de um dos componentes iniciais das diferentes vias ou dos componentes formadores do complexo lítico de membrana (MAC) pode levar a ativação deficiente, a ativação exacerbada do complemento em local e momento indesejados, incrementando o processo inflamatório, pode ser causada pela deficiência dos componentes regulatórios (ABBAS, A.K. et al., 2000).

Em resposta a estímulos anormais, como microrganismos persistentes, anticorpos contra antígenos próprios ou complexos imunes depositados em tecidos, o sistema complemento também pode ser ativado. Os efeitos inflamatórios ou líticos do complemento nestas doenças infecciosas ou autoimunes, podem contribuir significativamente para a patogenia da doença, sendo que, a ativação do complemento se dá por três vias principais: clássica, alternativa e das lectinas (ABBAS, A.K. et al., 2000; PRODINGER, W.M. et al., 2003).

Para ativação da via das lectinas, há o envolvimento de moléculas de reconhecimento de padrões solúveis que reconhecem carboidratos na superfície de microorganismos. Essas lectinas, por se ligarem aos microorganismos, ativam as proteases, que por sua vez, ativam o sistema complemento (TIZARD, 2014).

#### 2.2.4 Sinais clínicos

A linfadenite caseosa é marcada por um processo inflamatório nos linfonodos, caracterizado pela formação de abscessos com conteúdo purulento, de aspecto caseoso e amarelado. Os linfonodos aumentam de volume, que com a evolução, tornam-se flutuantes. Os pré-parotídeos e pré-escapulares, são os linfonodos acometidos com maior frequência, sendo que, os linfonodos bronquiais e mediastínicos também podem apresentar abscessos. Quando a LC acomete os pulmões, causa quadros respiratórios como tosse crônica, quando nos linfonodos

mesentéricos leva ao emagrecimento progressivo do animal (SANTA ROSA, 1996; RIBEIRO, 1997).

Al-Gaabary et al. (2009) no estudo realizado, observaram que os sinais clínicos de linfadenite caseosa em ovinos e caprinos se manifestaram em forma de abscessos dos gânglios linfáticos superficiais com tamanhos variáveis e em locais diferentes, tanto abscessos fechados quanto abertos com conteúdo purulento, algumas lesões apresentavam queda de pelo no local. Alguns animais infectados mostraram emagrecimento progressivo.

Nos casos crônicos com lesões viscerais, o animal apresenta hipoproteïnemia e anemia e estes abscessos podem ser localizados em qualquer órgão. A forma da doença que possui maior gravidade, é a visceral, visto que o diagnóstico clínico é muito difícil. Esta forma clínica da LC muitas vezes leva à debilidade do animal, disseminação de abscessos no organismo, condenação de vísceras e carcaças, podendo levar ainda o animal à morte (SANTA ROSA, 1996).

A doença causa a redução no rendimento da carne, lã, leite, pele, diminuição da eficiência reprodutiva, atraso no crescimento, menor ganho de peso, descarte precoce de animais e comercialização dos animais por valor inferior ao praticado no mercado, além de ser caracterizada pela formação de lesões necróticas encapsuladas caseosa (SOUZA et al., 2011).

#### 2.2.5 Controle e profilaxia

Um dos métodos de controle da linfadenite caseosa mais eficientes até o momento em pequenos ruminantes são a identificação dos animais infectados e sua remoção do rebanho (BINNS, 2002). Deve-se evitar dentro dos estábulos objetos que possam provocar lesões cutâneas (VALE, 2003). Deve-se proceder a higienização e desinfecção de agulhas, material cirúrgico, alicates de tatuagem e todo objeto utilizado no manejo dos animais (WILLIAMSON, 2001). Todos os animais que apresentarem lesões cutâneas deverão ser isolados até que tenham seu diagnóstico elucidado (SENTURK, 2006).

Além de todos os cuidados tomados com desinfecção do ambiente e segregação de animais infectados, a cuidadosa seleção na aquisição de novos animais para o plantel, são medidas importantes na profilaxia da doença em ovinos e caprinos (BINNS, 2007). *In vitro*, o *C. pseudotuberculosis* é sensível a vários antimicrobianos usados na rotina veterinária, incluindo fármacos dos grupos dos beta-lactâmicos e derivados (MOURA, 2010; QUINN, 1994). Porém, o microrganismo é refratário no tratamento *in vivo* (MOURA, 2010; VALLI, 2007). Este fato está relacionado com a espessa cápsula de tecido conjuntivo que reveste os abscessos (WILLIAMSON, 2001) além do denso conteúdo caseoso presente no interior dos piogranulomas dificultando a ação dos antimicrobianos (BAIRD, 2007). Por se apresentar como um microrganismo intracelular obrigatório, sua viabilidade intracelular é outro fator de virulência que limita a ação dos antimicrobianos convencionais (RADOSTITS, 2006). Como parte do tratamento, é sugerida a extirpação cirúrgica dos abscessos e ou linfonodos externos (VALE, 2003).

Contudo, é necessário o estabelecimento de medidas profiláticas como a adoção de medidas sanitárias que permitam manter a prevalência da LC em níveis aceitáveis, além de um rigoroso controle da introdução de animais na propriedade (GUIMARÃES et al., 2011).

#### 2.2.6 Utilização de vacinas no controle da linfadenite

Existem duas formas de imunização de animal contra infecções. A imunização passiva que se dá por meio da administração de anticorpos pré-produzidos em um animal saudável fornecendo proteção imediata, apesar de resultar em uma imunidade de curta, e a outra forma é a imunização ativa, que se utiliza de vacinas compostas por organismos vivos ou inativados, produzindo também a imunidade, apesar do desenvolvimento lento, apresenta uma longa duração (TIZARD, 2014).

Em sua grande maioria, as vacinas vivas estimulam uma resposta imune mais eficaz quando comparadas com as vacinas compostas por organismos inativados. Porém, as elaboradas com microorganismos inativados tentem a maior

seguridade. Tanto em humanos quanto em animais, a vacinação é a forma mais segura e eficaz para o controle das doenças infecciosas (TIZARD, 2014).

Com o intuito de aumentar a eficiência de algumas vacinas, principalmente as que são compostas por organismos inativados que possuem baixa antigenicidade ou antígenos purificados, frequentemente tem-se adicionado substâncias conhecidas como adjuvantes vacinais. Estes, tem a capacidade de aumentar a velocidade ou a intensidade de resposta do corpo às vacinas, permitindo reduções na quantidade de antígenos injetados, sendo também essenciais no estabelecimento de uma memória prolongada contra antígenos solúveis (TIZARD, 2014).

Moussa et al. (2016) observaram que a vacinação experimental de ovinos contra linfadenite caseosa, composta de rPLD e células inativadas de *C. pseudotuberculosis*, diminuiu claramente a prevalência e número de abscessos que se formou secundário a infecção experimental por *C. pseudotuberculosis* nos animais. Quando comparados os grupos de animais vacinados e não vacinados, o primeiro grupo mostrou uma diferença entre 80-87% na redução do aparecimento de abscessos.

Droppa et al. (2016) desenvolveu em seu estudo uma vacina à base de proteína recombinante CP40 (rCP40) com um adjuvante (completo de Freund ou saponina) e realizou o ensaio de imunização em modelos de rato fêmea, avaliando sua eficácia. Os resultados indicaram que a proteína CP40 recombinante induziu uma resposta imunológica específica em ratos que foi capaz de proporcionar uma proteção após desafio, independentemente do adjuvante usado na formulação.

Segundo Eggleton (1991) o controle desta enfermidade deve ser feito principalmente através do diagnóstico precoce e pela utilização de vacinas. A constituição destas vacinas podem variar entre DNA, células bacterianas mortas, as bacterinas, e células bacterianas vivas, pela toxina inativada, os toxóides, do *C. pseudotuberculosis*, ou pela associação destes componentes, utilizando ou não algum tipo de adjuvante (FONTAINE et al., 2006; COSTA et al., 2011).

Em 1972 foram iniciados os primeiros experimentos que avaliaram a eficácia das vacinas (CAMERON et al., 1969). O pesquisador Jolly em 1995, iniciou os

estudos sobre proteção dos animais contra o agente causador da linfadenite caseosa, mostrando o envolvimento de toxóide na proteção.

Através de uma cepa atenuada de *C. pseudotuberculosis*, Ribeiro et al., (1991) produziram uma vacina que quando utilizada sem adjuvante mostrou resultados significantes em caprinos, vindo a ter 83% de imunoproteção. Eggleton et al., (1991) utilizando toxóide purificado obteve um nível semelhante de proteção com antígenos derivados de sobrenadante de cultura.

Hodgson et al. (1992) mostraram que a infecção de ovelhas com cepas avirulentas de *C. pseudotuberculosis* com a retirada do gene da fosfolipase D, também teve a capacidade de induzir a imunidade o que demonstra a evidência de que além da fosfolipase, outros antígenos também contribuem para a proteção.

Walker et al. (1994) observou que era possível obter células produtoras de anticorpos no local da infecção, sendo possível identificar antígenos importantes para a produção de vacinas. Estes pesquisadores isolaram uma proteína secretada de 40kDa, que, usada como vacina associada a hidróxido de alumínio, estabeleceu uma resposta protetora em 82% dos ovinos vacinados e reduziu em 98% as lesões nos pulmões.

No período de 1992-1996 Stanford et al., (1998), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia de uma vacina contendo células de *C. pseudotuberculosis* associado a um dipeptídeo muramil (MDP), sendo ele um imunoadjuvante originalmente isolado a partir de fragmentos da parede celular bacteriana. Essa vacina mostrou manter os títulos de anticorpos elevados em relação aos cordeiros do grupo controle por um período de 12 meses.

Por apresentar atividade intracelular, o *C. pseudotuberculosis*, faz com que vacinas forneçam baixa proteção ao rebanho que, para se proteger dessa bactéria a imunidade deve ser celular (COLLETT, 1994).

### 2.2.7 Utilização da cromatografia de afinidade

Em 1903, a cromatografia entra nos métodos de separação e seu posterior desenvolvimento e evolução ocorre em 1930. Uma técnica que tem a finalidade de separar compostos como, por exemplo, proteínas, que tem a capacidade de se ligar

não covalentemente e reversivelmente a moléculas específicas conhecidas como ligantes, é a cromatografia de afinidade. Diferindo-se das técnicas de cromatografia clássica, este método consegue separar a proteína com base em uma única propriedade bioquímica. Nesse tipo de cromatografia, o ligante está ligado covalentemente a matriz, devendo ele ser quimicamente inerte. A depender da proteína a ser purificada, várias matrizes e ligantes podem ser usadas (VOET E VOET, 1995).

Existe um grupo de proteínas que possui como característica principal a capacidade especial de ligar-se a carboidratos, que atua na primeira linha de defesa contra agentes patogênicos, este grupo é conhecido como lectinas. Atuando nas funções biológicas básicas, incluindo regulamentar, adesivar, defesa contra patógenos, prevenção da autoimunidade e muitos outros, eles estão presentes em cada organismo (JUN, 2014).

Em um organismo, um número de diferentes lectinas está normalmente presente em várias isoformas, chamadas isolectinas (VAN DAMME et al., 1998). As lectinas, em seus diferentes tipos, distinguem-se de acordo com a sua estrutura geral. Merolectinas contém um único domínio de ligação de carboidrato, hololectinas são compostos de dois ou mais domínios de tais e chimerolectinas contém domínios adicionais, não-lectina, geralmente tem função catalítica (Peumans & Van Damme, 1995). Todos os organismos produzem lectinas que atuam com várias funções biológicas e que podem reconhecer e ligar-se a carboidratos específicos de forma reversível (JUN, 2014).

A maioria das lectinas tem múltiplos sítios de ligação que podem ser úteis em associações de entrecruzamento com glicoreceptores específicos na superfície da célula. Possuindo ainda um papel de moléculas de reconhecimento e interações de molécula-célula, célula-célula e estão envolvidas em processos celulares, incluindo adesão, migração, diferenciação, proliferação e apoptose. Além de que, muitas lectinas induzem respostas fisiológicas diversas em vários organismos e possuem propriedades de imunomoduladores (Perillo et al., 1998; Sharon & Lis, 1989).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar aspectos relacionados à estímulos imunológicos mediante vacinação de ovelhas contra *C. pseudotuberculosis*, bem como determinar o papel destes fatores na implementação de medidas de controle envolvendo a vacinação dos animais.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Elaborar e avaliar o efeito de uma vacina de células bacterianas de *C. pseudotuberculosis* em fêmeas ovinas SRD;
- Avaliar a atividade bactericida do soro dos animais vacinados;
- Determinar a atividade hemaglutinante no extrato de proteínas de *C. pseudotuberculosis*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de resposta contra *C. pseudotuberculosis*

O teste de ELISA para detecção da resposta frente à infecção por *C. pseudotuberculosis*, foi realizado como um teste de triagem para a escolha dos animais a serem utilizados no desenvolvimento do experimento. Esse teste seguiu descrições de Vale et al. (2003) e Binns et al. (2007).

### 4.1 Animais utilizados

Foram utilizadas 12 fêmeas ovinas da raça Santa Inês. Formou-se dois grupos, sendo G1 (n=06): ovinos positivos para a presença de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* no teste de ELISA e G2 (n=06): ovinos negativos para presença de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis*, também através do teste de ELISA. A utilização dos animais foi aprovada junto ao comitê de ética (anexo 1).

### 4.3 Seleção dos isolados a serem utilizados no preparo das vacinas

Os isolados de *C. pseudotuberculosis* (n=3) a serem utilizados no preparo das vacinas, foram escolhidos de acordo com o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida com condições desnaturantes (SDSPAGE, 12%) das proteínas extraídas (AMANSO, 2015). Essa metodologia seguiu descrições de Laemmli (1970).

### 4.4. Preparo das Vacinas

Com base nos perfis eletroforéticos apresentado pelos isolados na SDS-PAGE 12% em estudo anterior, foi possível selecionar três isolados para o preparo

da vacina. Inicialmente, as cepas de *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas em meio AS a 37°C por 48h. Após o crescimento, uma suspensão das colônias em solução salina (NaCl 0,15M) esterilizada foi preparada e a quantidade de bactérias foi estimada em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) comparando-se uma diluição da suspensão com a escala 4 de Mac Farland, por método turbidimétrico. Além deste método, determinou-se a concentração bacteriana por espectrofotometria, no comprimento de onda 580nm, com densidade óptica de 1,730 nm. Em seguida, foi adicionado 10% desta suspensão bacteriana em solução salina em 100mL de BHI caldo para cultivo em shaker (180 rpm) a 37°C por 24 h.

Posteriormente, foi adicionado 0,6 % de formol na cultura vacinal para inativação e novamente foi colocada em shaker (180 rpm) a 37°C overnight. Uma alíquota da cultura tratada foi semeada em meio BHI e Tioglicolato e incubadas à 37°C por 48h para confirmar a inativação das células bacterianas. Após confirmação da inativação, foi adicionada a bacterina 15% de hidróxido de alumínio como adjuvante. Posteriormente, a bacterina foi semeada em placa de Petri contendo meio de cultura BHI e incubada a 37°C por 48 horas para verificar a sua segurança. Logo após, a bacterina foi mantida a 4°C, conforme metodologia de Grabowski et al. (2004).

#### 4.5. Vacinação dos ovinos

Dos dois grupos G1 (n=06): ovinos positivos para a presença de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* no teste de ELISA e G2 (n=06): ovinos negativos para o mesmo teste, apenas os animais do G2 foram vacinados, os animais do G1, foram utilizados como controles positivos e também foram avaliados quanto a atividade bactericida do soro. A vacinação foi feita no primeiro dia do início do experimento, momento 1 (M1) e repetida 30 dias após. As coletas iniciaram no primeiro dia do experimento (M1) e as demais foram feitas semanalmente até que se completasse um total de nove semanas (M1- M9). Os animais pertencentes ao grupo 2 foram vacinados com duas doses de 1mL da bacterina produzida, por via subcutânea no

lado direito do pescoço. Este experimento seguiu descrições de Fontaine et al. (2006).

#### 4.6. Avaliação clínica dos animais

A avaliação clínica dos animais seguiu descrições de Vale et al. (2003) e Baird & Malone (2010). O exame envolveu a palpação e inspeção visual dos linfonodos superficiais na cabeça, pescoço e corpo.

#### 4.7 Extração de proteínas de *C. pseudotuberculosis*

Os isolados bacterianos foram cultivados em 200mL de BHI (Brain Heart infusion) e incubados a 37°C por 72 h, sob agitação em shaker (150 rpm). As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm por 30 min, 7°C). Foram ressuspensas com 10mL de NaCl (0,15 M) gelado, levando a centrifugação (4.000 rpm por 5 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi utilizado. Em tubo falcon, para cada 1mL do sobrenadante foram utilizados 20mL da solução (NaCl 0,15M e 1% de SDS), deixando-o sob agitação lenta durante 4 h. Após este período, realizou centrifugação (5.000 rpm por 30 min a 7°C). Após esta etapa, o precipitado foi descartado e realizada a diálise do sobrenadante com intuito de retirar o excesso de SDS. Logo após, as proteínas foram armazenadas para posterior utilização no teste de atividade hemaglutinante (PODGORSKYI, et al., 2011).

#### 4.8 Atividade hemaglutinante

##### 4.8.1 Coleta e preparo das hemácias

As amostras de sangue foram coletadas assepticamente de coelho branco da raça Nova Zelândia. As hemácias foram lavadas em NaCl (0,15 M) por quatro vezes (1000 x g, 4°C, 20 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (polpa de hemácias) foi utilizado para preparar a solução de hemácias a 2%.

#### 4.8.2 Detecção de atividade hemaglutinante no extrato

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 50 µL de NaCl 0,15 M, sendo ainda acrescentados 50 µL de extrato total apenas no primeiro poço, para realizar a diluição seriada nos poços seguintes. Após diluição, adicionou-se, em todos os poços, 50 µL da suspensão de eritrócitos 2% de coelho. O controle negativo consistiu de 50 µL da solução NaCl 0,15 M mais 50 µL da solução de hemácias 2%, sendo o controle positivo, composto por 50 µL da solução de NaCl 0,15 M mais 50 µL da solução de hemácias e 50 µL de Jacalina (lectina da *Artocarpus heterophyllus*). Após 1h de repouso à 25°C, a atividade hemaglutinante foi avaliada visualmente, sendo o título expresso em Unidade de Hemaglutinação (UH.mL<sup>-1</sup>), que corresponde ao inverso da maior diluição da amostra que apresente nítida aglutinação (MOREIRA, 1977).

#### 4.9 Atividade bactericida do soro

Os soros de animais vacinados e infectados naturalmente por *C. pseudotuberculosis* foram obtidos por coleta asséptica do sangue em tubos vacutiner sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas (4.000 rpm por 10 min) e o soro obtido foi armazenado a 4°C até sua posterior utilização.

As bactérias utilizadas na atividade foram provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, sendo os mesmos isolados utilizados para elaboração da vacina. Foram cultivados em caldo BHI a 37°C, durante 24h de incubação. Após este período, a suspensão bacteriana foi lavada e centrifugada a 5000 rpm durante três minutos em solução de tampão fosfato estéril (PBS), com pH 7,4, três vezes até à remoção completa do BHI. A suspensão bacteriana foi diluída em PBS estéril a uma concentração de  $1 \times 10^8$  UFC, de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland. Observando ainda a DO num comprimento de onda de 546nm, obtendo-se um valor de 0,065 (Vandepitte et al., 1993).

Foram utilizados dois grupos dos “pools” dos soros de cada momento, um grupo com soro descomplementado, no qual passou por um tratamento térmico à 56°C por 30 min e outro grupo com soro sem tratamento térmico. Aos soros de ambos os grupo contidos em microtubos, numa alíquota de 500µL, foram acrescentados 500µL da suspensão bacteriana na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC, posteriormente, essa solução foi levada à estufa à 37°C por 1h. Após o período na estufa, foram feitas diluições seriadas, retirando o conteúdo de cada microtubo transferindo-o para um tubo de ensaio com 9 mL de solução salina. Estas diluições iniciaram na concentração de  $10^{-1}$  até alcançar a  $10^{-5}$ . Feitas as diluições, foram retirados 1mL de cada tudo e adicionados à placas de Petri, que por sua vez receberam o meio BHI ágar, estando ele morno, sendo realizada a técnica de “pour-plate”, procedimento realizado em duplicata. As placas foram levadas à estufa 37°C por 48h e posteriormente foi feita a contagem de colônias e dado o valor de UFC/mL. No grupo controle, foi plaqueada a solução de bactéria com solução salina (RAO *et al.*, 2006 – Modificado).

#### 4.10 Cromatografia de afinidade

##### 4.10.1 Extração de proteínas de *C. pseudotuberculosis*

Os isolados utilizados na vacina foram semeados em BHI caldo e incubados à 37°C por 72h. Durante o período de incubação, foi feita a espectrofotometria do cultivo de 12 em 12 horas para observar o pico de crescimento dos microrganismos.

Após este período, as células foram coletadas por centrifugação nas condições de 500rpm por 15 min à 4°C, em tubos de 50mL. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em tampão citrato fosfato pH 6,5, 0,1M com NaCl 0,5M. Obtendo um volume final de 20mL. Foi adicionado 3% de Tween 80, agitado vagarosamente deixando-o em contato com a amostra durante 30 min. Após esse tempo, foi realizado o choque térmico mergulhando a amostra durante 1 min no nitrogênio líquido e posteriormente imergindo-a em banho maria 37°C até o descongelamento da amostra. Esse

procedimento foi repetido por 5 vezes. Em seguida, foram adicionadas micro pérolas de vidro e realizado o processo de *high speed friction* em 10 sessões de 1 min cada, com intervalo de 30 segundos entre cada uma delas em banho de gelo.

Após esse processo, adicionou-se 10% de glicerol à amostra. Após a adição, as células foram expostas ao banho ultrassônico com frequência ultrassônica de 42 kHz durante 5 ciclos de 1,5 minutos, adicionando gelo à cuba. Posteriormente, foi adicionado a lisozima 20µg/mL deixando em contato por 4 horas e posterior centrifugação por 30 minutos à 4°C em uma velocidade de 13.000 g. Sendo então elaborada uma nova metodologia para extração de proteínas de *C. pseudotuberculosis*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado para posterior utilização na cromatografia.

#### 4.10.2 Purificação da lectina por cromatografia de afinidade

A lectina foi isolada a partir da extração de proteínas das bactérias, utilizando um procedimento de cromatografia em dois passos. Antes de dar início ao processo, a coluna cromatográfica foi equilibrada com tampão PBS 0,1M com pH 7,4.

Para iniciar o processo, a amostra foi filtrada em micromembrana (0,22µm). O conteúdo foi colocado em recirculação durante 2 horas com o auxílio da bomba peristáltica nas seguintes condições: velocidade de 3,0 rpm, coletor 4,5 minutos e 1,5 mL por tubo. Após o período de recirculação, adicionou-se o tampão de eluição PBS pH 7,4, 0,1 M para remover quaisquer proteínas que não se ligam especificamente à manose, obtendo então o pico 1 (P1). Foi feita a leitura da DO dessa eluição em espectrofotômetro num comprimento de onda de 280 nm. Em seguida, para obtenção da concentração de lectina purificada adicionou-se o tampão de eluição glicina pH 2,6, 0,1M. Com a adição da glicina, a lectina que estava ligada à coluna foi desfeita sua ligação, coletada e também observada a DO num comprimento de onda de 280 nm, obtendo então o pico 2 (P2).

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores obtidos de UFC/mL foram comparados entre os grupos (soro tratado e não tratado termicamente – soro de animais vacinados e não vacinados), utilizando-se o teste T para amostras independentes e entre os tempos experimentais pela análise de variância para medidas repetidas. Para análise dos dados, foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 para Windows.



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Teste de ELISA

Dos 24 animais avaliados no teste de ELISA, 16 mostraram-se positivos para presença de anticorpos anti-*C.pseudotuberculosis* (66%). Dos 16 animais positivos ao teste, 6 foram selecionados para compor o grupo positivo (G1) e, dos demais animais negativos ao teste, num total de 8, 6 foram selecionados para compor o grupo negativo (G2).

### 6.2 Vacinação

A bacterina produzida com os três isolados de *C. pseudotuberculosis*, foi devidamente elaborada e aplicada aos animais negativos ao teste de ELISA conforme proposto na metodologia. Os animais não apresentaram reações adversas no local da vacinação. A cada semana do experimento, foram coletadas amostras de sangue dos animais em estudo, de forma asséptica, com as quais, ao avaliar a resposta imunológica dos animais, foram obtidos resultados satisfatórios.

Em 1988, Ribeiro et al. formularam uma vacina inativada a partir de uma cepa tendo como adjuvante o gel de fosfato de alumínio. Foram observados nesse estudo, valores de proteção de 50 a 77%, onde a recomendação era vacinar os animais depois de quatro meses de idade, pois antes disso os anticorpos advindos do colostro inativariam a vacina.

Através de uma cepa atenuada de *C. pseudotuberculosis*, Ribeiro et al., (1991) produziram uma vacina que quando utilizada sem adjuvante mostrou resultados significantes em caprinos, vindo a ter 83% de imunoproteção. Enquanto Eggleton et al., (1991) utilizando toxóide purificado obtiveram dados semelhantes de proteção com antígenos derivados de sobrenadante de cultura. Porém, outros estudos levaram pesquisadores a observarem que para uma ideal proteção contra linfadenite caseosa, era necessária a associação de sobrenadante de cultura e

fragmentos celulares, toxóides associados com células, para ótima proteção (BURRELL, D. H. 1983)

### 6.3 Atividade bactericida do soro

O aumento da atividade bactericida do soro detectado após a vacinação, com conseqüente diminuição da contagem de UFC/mL (Gráfico1 - 1a e 1b), mostra o aumento de proteínas séricas de proteção que normalmente ocorre após uma infecção natural, tais como em surtos de doenças, ou em infecções artificiais, tais como após a vacinação e desafio (BILLER-TAKAHASHI, J. D. et al., 2013). Pode-se observar que houve uma maior atividade bactericida no grupo quando utilizado o soro não tratado termicamente quando comparado com o soro tratado ( $P < 0,05$ ). Essa diferença entre os dois grupos pode ser observada a partir do momento 5 (M5), que por sua vez, está relacionada com uma semana após a segunda dose da vacina. O mesmo se repete para avaliação dentro do grupo do soro não tratado termicamente ao longo dos 9 momentos de coleta (M1-9), no qual a partir do M5, houve um aumento da atividade bactericida do soro ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre o grupo do soro tratado termicamente ao longo dos nove momentos (M1-9). Das 5 diluições, foi selecionada a  $10^{-3}$  para a análise estatística, visto que, esta diluição apresentou as melhores contagens de UFC/mL, entre 30 e 300.

Isso está relacionado ao fato de o soro tratado não possuir mais o complemento que antes havia, pois, com o tratamento térmico há a descomplementação do soro. Concordando com o que disse Collett (1994), para se proteger dessa bactéria a imunidade deve ser celular. Em geral, quando uma vacina é aplicada em várias doses significa que, a cada dose, há um aumento progressivo da defesa do organismo. Afirmando o que disse Eggleton (1991), o controle desta enfermidade deve ser feito principalmente através do diagnóstico precoce e pela utilização de vacinas.

Comparando os dois grupos de soro de animais vacinados com animais não vacinados, porém infectados naturalmente, também observou-se que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os dois grupos a partir do M5, sendo que o

soro dos animais vacinados apresentou maior atividade bactericida (Tabela 2). Afirmando o que disse Baird e Fontaine (2007), a vacinação é considerada também como ação de profilaxia e reduz a ocorrência de linfadenite caseosa e abscessos no rebanho em até 70%.

Gráfico 1. Média de contagem de UFC/mL na avaliação da atividade bactericida do soro de fêmeas ovinas vacinadas com bacterina preparada com *C. pseudotuberculosis* – Soro tratado termicamente, A. Soro não tratado termicamente, B.

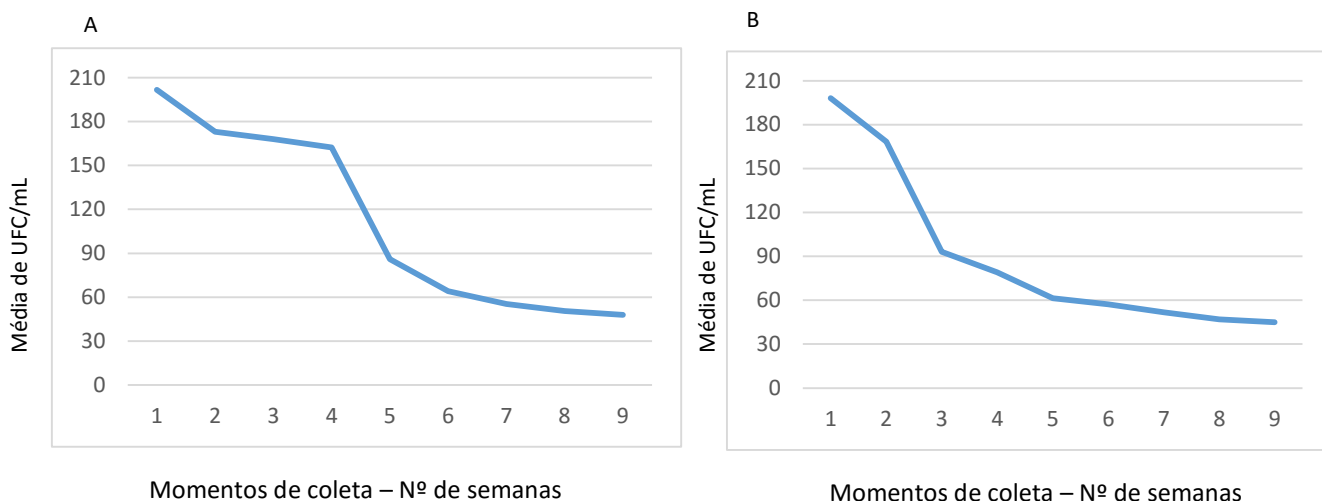


Tabela 1. Médias obtidas para UFC/mL ( $\times 10^6$ ) na avaliação da atividade bactericida do soro de fêmeas ovinas vacinadas e não vacinadas com bacterina preparada com isolados de *C. pseudotuberculosis*

	<b>Animais vacinados – soro não tratado termicamente</b>	<b>Animais vacinados – soro tratado termicamente</b>
	<b>Médias UFC/mL</b>	<b>Médias UFC/mL</b>
<b>M1</b>	0,198 <sup>Aa</sup>	0,152 <sup>Aa</sup>
<b>M2</b>	0,168 <sup>Aa</sup>	0,109 <sup>Aa</sup>
<b>M3</b>	0,093 <sup>Aa</sup>	0,102 <sup>Aa</sup>
<b>M4</b>	0,079 <sup>Aa</sup>	0,093 <sup>Aa</sup>
<b>M5</b>	0,061 <sup>Aab</sup>	0,079 <sup>Aab</sup>
<b>M6</b>	0,057 <sup>Aab</sup>	0,066 <sup>Aab</sup>
<b>M7</b>	0,051 <sup>Aab</sup>	0,066 <sup>Aab</sup>
<b>M8</b>	0,047 <sup>Aab</sup>	0,062 <sup>Aab</sup>
<b>M9</b>	0,045 <sup>Aab</sup>	0,061 <sup>Aab</sup>
	<b>Animais não vacinados – soro não tratado termicamente</b>	<b>Animais não vacinados – soro tratado termicamente</b>
	<b>Médias UFC/mL</b>	<b>Médias UFC/mL</b>
	0,168 <sup>Aab</sup>	0,181 <sup>Aab</sup>

A letra M significa os momentos semanais de coleta;

Para cada momento, valores seguidos por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ( $P > 0,05$ );

Para cada grupo, valores seguidos por letras minúsculas iguais não diferem entre si ( $P > 0,05$ );

As respostas imunológicas também podem ser controladas pela ação dos linfócitos T reguladores (Treg). Citocinas como interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) são secretados pelos Tregs (TIZARD, 2014).

O agente patogênico pode influenciar na liberação de citosinas inflamatórias tais como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 e Fator  $\alpha$  (IL-6) e, que são proteínas sintetizadas pelo fígado, encéfalo ou células do sistema imunológico que atuam em reparação de tecidos, homeostase e modulação da atividade do sistema de defesa inato e adquirido (Bayne e Gerwick, 2001; Magnadottir et al, 2011).

Existe ainda o sistema imune adaptativo, que é um sistema sofisticado que pode reconhecer invasores, responder à sua invasão, de forma que, num próximo contato com o microorganismo invasor, a sua resposta seja mais rápida e eficaz, havendo a ativação de diversas vias intracelulares no desencadeamento da resposta imune inata pelo reconhecimento de receptores de reconhecimento

padrão. A ativação dessas vias pode influenciar a capacidade do animal de montar respostas imunes adaptativas (TIZARD, 2014).

Regulador da inflamação pela secreção de uma citocina chamada IL-17, os linfócitos Th17 também compõe outra subpopulação de linfócitos T. Os linfócitos T CD4+ diferenciam-se em linfócitos Th17 quando são expostos a IL-6 mais TGF- $\beta$ . Os linfócitos Th17 são potentes indutores da inflamação aguda e desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro. Eles são linfócitos convencionais pequenos que são abundantes da superfície das mucosas. A presença desses linfócitos nesses tecidos da superfície é regulada pela microbiota intestinal. As células dendríticas e os macrófagos ativados por PAMPs microbianos através de TLR2 secretam IL-23. A IL-23 promove a sobrevivência e a ativação de linfócitos Th17. Estes secretam IL-17 e IL-22. O IFN- $\gamma$  suprime o desenvolvimento de linfócitos Th17 inibindo a inflamação mediada por IL-17 (TIZARD, 2014).

Existem seis membros na família do IL-17 (IL-17A a IL-17F), sendo que, o IL-17A e IL-17F são os mais importantes membros da família. A IL-17A está envolvida no desenvolvimento de autoimunidade, inflamação e alguns tumores, já a IL-17F está envolvida, principalmente, na defesa da mucosa. A IL-17A é um homodímero de 35 kDa produzida pelos linfócitos Th17. As células endoteliais e os macrófagos parecem ser os principais alvos dessas citocinas, uma vez que a IL-17A ou IL-17F mais TNF- $\alpha$  podem estimulá-los a produzir moléculas pró-inflamatórias. Isso inclui quimiocinas CXC, G-CSF, GM-CSF, IL-1 e IL-6, mediadores inflamatórios, tais como proteínas de fase aguda e proteínas do sistema complemento, e defensinas antibacterianas (TIZARD, 2014).

A IL-17 atua na regulação do acúmulo de neutrófilos na inflamação aguda sendo crucial para coordenar as defesas do hospedeiro contra muitos fungos e bactérias. Os linfócitos Th17, por exemplo, exercem um papel importante na defesa contra patógenos como *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter rodentium*, *Salmonella enterica*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Candida albicans*. Acredita-se que os linfócitos Th17 ajam desencadeando a inflamação e recrutando células inflamatórias precocemente na infecção, levando à rápida erradicação do patógeno (TIZARD, 2014).

Existem vários protocolos para avaliar a atividade bactericida do soro, porém, o procedimento adotado neste trabalho se mostrou eficiente e de menor complexidade quando comparado com outros trabalhos. A metodologia utilizada por Chen e Ainsworth (1992) para avaliar a morte bacteriana, utilizou uma suspensão de macrófagos em vez de soro, onde as células atuaram da mesma maneira como o soro, reduzindo a quantidade de UFC e promovendo a redução em seus números nas placas. A vantagem deste estudo é devido ao uso de soro como um agente para a destruição das UFC, dado que todo o processo de preparação de células é trabalhoso e delicado.

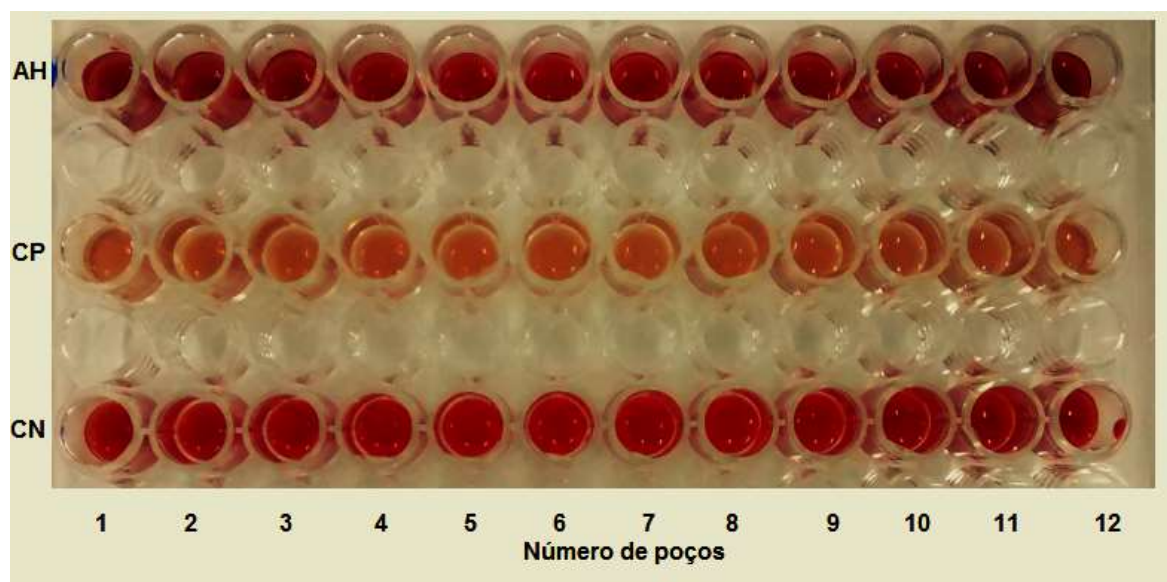
#### 6.4 Atividade hemaglutinante

Com relação a detecção e caracterização da presença de lectinas nas células de *C. pseudotuberculosis*, o ensaio de hemaglutinação foi positivo. Isto indica a função biológica da proteína no extrato proteico, apontando a presença de lectinas em *C. pseudotuberculosis*. Nas linhagens bacterianas, as lectinas estão envolvidas na fixação destes microrganismos aos tecidos dos hospedeiros e nos mecanismos de infecção (INOUE et al., 2003).

O ensaio de hemaglutinação é um método simples e fácil de obter dados semi-quantitativos sobre a ligação de açúcar e especificidade de uma lectina. Uma lectina ativa, aglutina eritrócitos por reconhecer um hidrato de carbono na superfície celular e a formação de uma rede de ligação cruzada em suspensão (JUN, 2014)

Um composto presente no extrato, apresentou capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados, que é uma característica exclusiva das lectinas. A atividade hemaglutinante nos eritrócitos foi detectada visualmente através da formação, após uma hora de incubação, de uma malha ou rede de hemácias que cobria o fundo e os lados dos poços (figura 1). Por outro lado, foram considerados negativos os poços onde se visualizava um botão compacto de células no fundo do poço.

Figura 1. Visualização da atividade hemaglutinante na presença do extrato proteico de *C. pseudotuberculosis* e hemácias de coelho.



AH – Amostra + hemácias; CP – Controle positivo; CN – Controle negativo

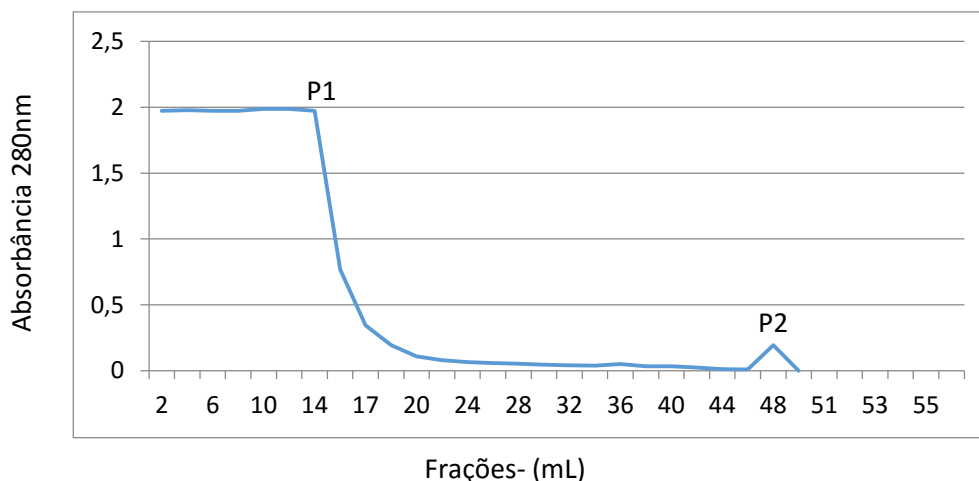
Os resultados obtidos demonstram a presença de proteína com capacidade de hemaglutinar eritrócitos nos isolados de *C. pseudotuberculosis*. A capacidade de uma proteína de se ligar a carboidratos e aglutinar eritrócitos se constitui na característica fundamental para que esta seja definida como lectina (SHARON & LIS, 1990). Sendo assim, concluímos que nos isolados de *C. pseudotuberculosis* utilizados neste experimento, existem proteínas capazes de reconhecer os receptores presentes na membrana dos eritrócitos de coelho ligando-se a estes e promovendo a aglutinação celular.

#### 6.5 Cromatografia de afinidade em coluna D-manose ligante

Após confirmar a presença de lectina pelo teste da HA, foram extraídas as proteínas totais dos isolados e utilizada técnica de cromatográfica para o isolamento de lectina a partir do extrato bruto de acordo com a afinidade específica de ligação a carboidratos, neste caso, lectina que se liga à D-manose, no cromatograma pode-se observar a presença de dois picos, o P1 que representa

todas as proteínas que não se ligaram manose, e o P2 que representa a lectina que antes ligada a D-manose, foi eluída (gráfico 3).

Figura 2. Cromatografia de afinidade de lectina extraída de *C. pseudotuberculosis*



A cromatografia de afinidade, técnica mais comumente utilizada, baseia-se na habilidade das lectinas se ligarem especificamente a suportes polissacarídicos através dos seus sítios específicos para ligações não covalentes. A proteína desejada pode ser obtida com alto grau de pureza (YE e NG, 2002) pela eluição com uma solução contendo um competidor (OLIVEIRA et al., 2002). As matrizes de afinidade podem ser selecionadas de acordo com a especificidade da lectina a carboidratos.

As lectinas são componentes do sistema complemento, que, quando estimulada, sua via é ativada. Existem 3 vias de ativação: a via Clássica, dependente de anticorpo; a via das Lectinas e a via Alternativa, ambas independentes de anticorpo (TIZARD, 2014).

A Lectina ligante da manose (MBL) e as ficolinas, compõem as lectinas ativadoras dessa via. Não se ligando às glicoproteínas de mamíferos, as MBL tem a capacidade de ligar-se a bactérias, fungos, protozoários parasitas e vírus pela ligação com a manose ou *N*-acetilglucosamina presente na parede das células



microbianas. Uma vez que estabelecida essa ligação, a MBL ativa a MASP-2, uma protease sérica, sendo ela associada à MBL. Consequentemente, a MASP-2 irá agir no componente C4 do complemento, clivando-o em C4a e C4b, originando um grupo carbonil reativo, este, liga o C4b de maneira covalente à superfície do microorganismo. C2, outro componente do sistema complemento, se liga ao C4b para formar o complexo C4b2, o C2 ligado anteriormente é clivado MASP-2 para gerar C4b2b. O C4b2b ligado à superfície microbiana é uma protease que atua na quebra do C3 para gerar C3a e C3b expondo o grupo tioéster no C3b. A ativação do C3b pelo C4b2b é o passo principal pois cada complexo C4b2b pode gerar até 200 moléculas de C3b. Uma vez que estas reações são geralmente confinadas ao microambiente próximo das superfícies microbianas, o C3b recentemente formado, diferentemente, irá se ligar aos microorganismos próximos. A ligação do C3b então liga o C5 e o cliva em C5a e C5b. Essa cascata do complemento poderá então continuar a eliminar microorganismos com os complexos terminais do complemento. Sendo que, os anticorpos, isoladamente, opsonizam as bactérias. Os anticorpos e os componentes do sistema complemento podem realizar a opsonização das bactérias ou destruí-las diretamente por meio do complexo terminal (TIZARD, 2014).

Lectinas são proteínas amplamente versáteis e quando purificadas, devido a sua especificidade de ligação a carboidratos, têm demonstrado um papel interessante em modelos médicos e biológicos, sendo assim consideradas importantes ferramentas na compreensão da sinalização e modulação da resposta biológica (GOSH et al., 1999; CECHINEL et al., 2001; LOPES et al., 2005; DAS et al., 2007; KHIL et al., 2007; SONG, et al., 2007).

Farrokhi et al. (2016) em um dos seus estudos, avaliaram os níveis séricos de MBL em pacientes com distúrbios neurológicos auto-imunes, incluindo: esclerose múltipla, síndrome de Guillain-Barre e miastenia gravis, avaliando a correlação entre a concentração sérica média de MBL com a gravidade e outras características clínicas dos pacientes. No qual observaram que o nível plasmático de MBL aumentou significativamente em pacientes com as enfermidades avaliadas em comparação com o grupo controle, composto por pessoas saudáveis. Além

disso, o nível plasmático de MBL estava diretamente correlacionado com a gravidade destas doenças neurológicas autoimunes. Os resultados sugeriram que a ativação do complemento mediado por MBL contribuiu com a gravidade da patogenia das enfermidades, sugerindo que a via da lectina pode estar envolvida em várias fases da resposta imunológica.

Por ativarem o sistema complemento dos indivíduos, o uso dessas lectinas na elaboração de vacinas vem sendo estudado há algum tempo em diversas áreas da saúde e se faz necessário maior ampliação destes estudos e aplicações desta técnica para elucidar seus mecanismos e avaliar sua eficácia.

ANDERSEN (1994), avaliou o efeito de uma vacina produzida à partir de proteínas extraídas do *Mycobacterium tuberculosis*. Camundongos foram vacinados e posteriormente desafiados com uma suspensão do *M. tuberculosis*. Foi então avaliada a sua resposta imunológica e observado que a vacina conferiu proteção significativa para os animais vacinados em questão.

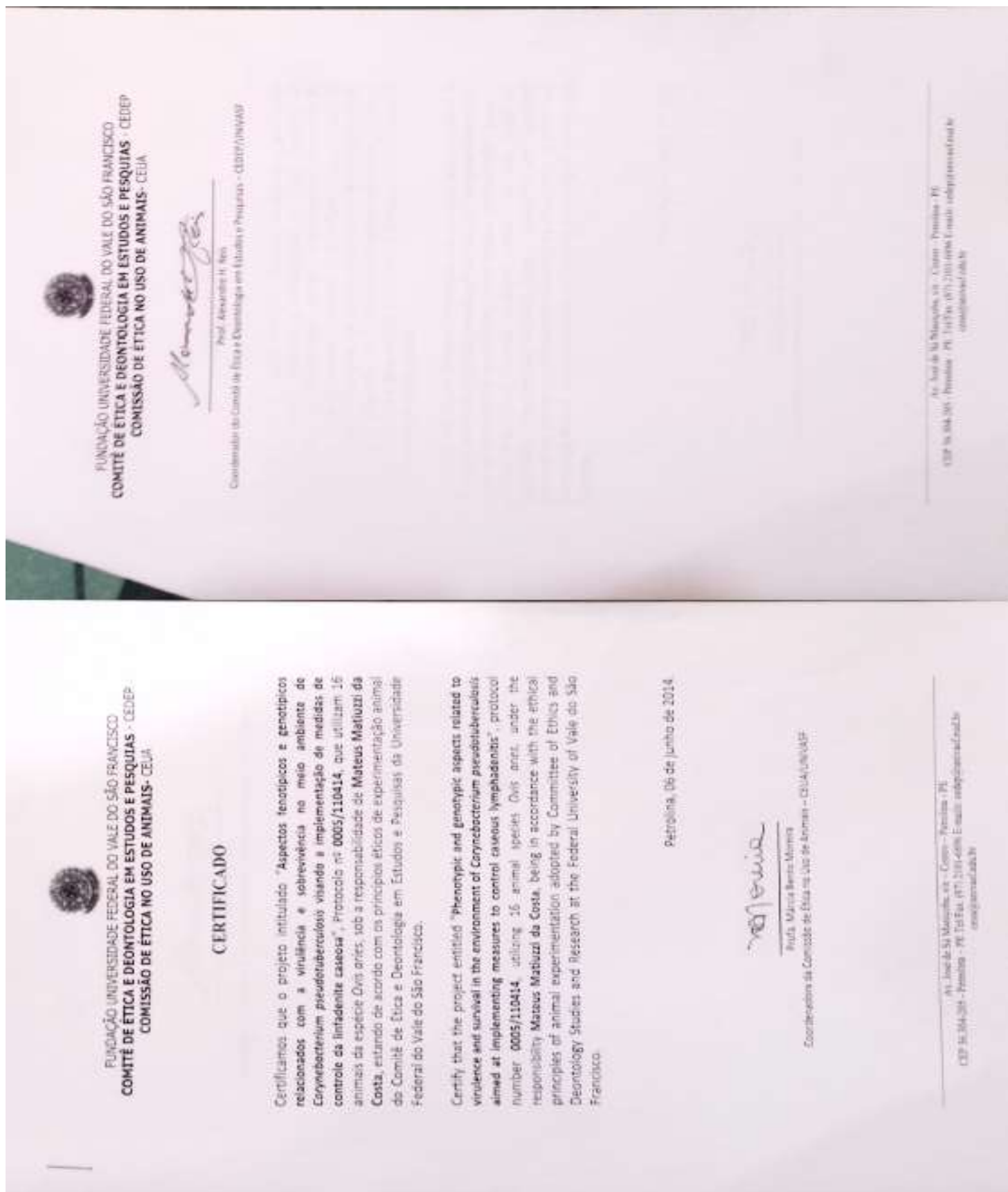
NOGUEIRA et al. (2010), demonstram a existência de uma nova lectina secretada a partir de *M. tuberculosis*, que é encontrada em pacientes durante a infecção ativa pela tuberculose. Estas observações sugeriram que a SMTL-13, lectina estudada, foi caracterizada como um potencial biomarcador eficaz no diagnóstico / tratamento, bem como alvo de imunização. A este respeito, nota-se que os antígenos segregados podem ser utilizados como testes de diagnóstico, bem como serem candidatos a potenciais vacinas e utilizados em ensaios clínicos recorrentes.

Esse foi o primeiro estudo que conseguiu realizar com sucesso a extração de proteínas do *C. pseudotuberculosis*, isolados estes que foram utilizados na elaboração de uma vacina, e demonstrou a presença da proteína lectina, isolando-a através da técnica de cromatografia de afinidade, a qual será utilizada em estudos futuros como base para elaboração de métodos de imunização.

## 6 . CONCLUSÃO

A vacina elaborada foi capaz de conferir proteção nos animais testados devido a atividade bactericida do soro desses animais. Os isolados de *C. pseudotuberculosis* utilizados apresentam lectina, que é capaz de estimular o sistema imunológico dos animais.

## 8. ANEXOS



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K. et al. Effector mechanisms of humoral immunity. In: Cellular and molecular immunology, 4<sup>a</sup>ed, **Philadelphia**: W.B Saunders Company, 2000.

ALENCAR, S. P. et al. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco, **Ciência animal**, v.11, n. 1, p. 131-140, 2010.

AL-GAABARY, Magdy H.; OSMAN, Salama A.; OREIBY, Atef F. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1, p. 116-121, 2009.

AMANSO, S. A. Enzima superóxido dismutase em isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtidos de pequenos ruminantes. Petrolina, 2015.

ANDERSEN, Peter. Effective vaccination of mice against Mycobacterium tuberculosis infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2536-2544, 1994.

ARSENAULT, J. et al. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Prev. Vet. Med.** v. 59, p. 67-81, 2003.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**. n. 137, p. 179-210, 2007.

BAIRD, G. J.; MALONE, F. E. Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA TESTING. **Veterinary Record**, v. 166, p. 358-362, 2010.

BAYNE, C.J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Dev. Comp. Immunol.**, v.25, p.725-743, 2001.

BELCHIOR, S.E; GALLARDO, A; ABALOS, A; JODOR, N; JENSEN, O. Actualizacion sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. Rev Vet Argent. 23: 258-78, 2006.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. et al. Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1745-1751, 2013.

BINNS, S. H.; BAILEY, M.; GREEN, L. E. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. **The Veterinary record**, v. 150, n. 9, p. 263-268, 2002.

BINNS, S. H.; GREEN, L. E.; BAILEY, M., Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 169-179, 2007.

BOUTONNET, J.P. Perspectives of the sheep meat world market on future production systems and trends, **Small Ruminant Research**, v. 34, p. 189-195, 1999.

BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis vaccine. N. S. W. **Vet.Proc.** n.1, p.53-57, 1983

CAMERON, C. M.; J. L. MINNAAR; M. R. PURDON. Immunising properties of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cell walls. **Onderstepoort J. Vet. Res.** n.36, p.211- 216, 1969.

CARNE, H. R.; ONON, E. O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. **Nature, Londres**, v.271, p.246-248, Jan. 1978.

CASTEL, J.M., Y. MENA, M. DELGADO-PERTNEZ, J. CAMUÑEZ, J. BASALTO, F. CARAVACA, J.L. GUZMANGUERRERO AND M.J ALCALDE. Characterization of semi-extensive goat production systems in southern Spain. **Small Rumin. Res.**, 47. pp. 133-143, 2003.

CECHINEL, Y. M. N. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity from *Crattylia mollis* lectin in mice. In: **VI PHARMATEC**, Anais, Recife, 1: 167-168, 2001.

CHEN, D.; AINSWORTH, A. Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel cat fish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **J. Fish Dis.**, v.15, p.295-304, 1992.

COLLETT, M. G.; BATH, G. F. e CAMERON, C. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa. **Oxford University Press**, v. 2, p.1387-1395, 1994.

COSTA, M. P. et al. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice **BMC Research Notes**, v. 4, n. 243 p. 2-10, 2011.

COSTA, R. G. et al. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do estado da Paraíba, Brasil. **Archivos de zootecnia**, v. 57, n. 218, p. 195-205, 2008.

D'AFONSECA, V. et al. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 252-260, n. 1, 2008.

DAS, T.; MALLICK, S. K.; PAUL, D.; BHUTIA, S. K.; BHATTACHARYYA, T. K.; MAITI, T. K. Microcontact printing of Concanavalin A and its effect on mammalian cell morphology. **Journal of Colloid and Interface Science**, 314: 71-79, 2007.

DE SÁ GUIMARÃES, Alessandro et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **IIOAB J**, v. 2, p. 33-43, 2011.

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

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

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

EGGLETON, D. G. et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Aust. Vet. J.**, n. 68, p. 317-319, 1991.

FARROKHI, Mehrdad et al. Mannose-binding lectin mediated complement pathway in autoimmune neurological disorders. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, 2016.

FILGUEIRA, T.M.B.; AHID, S.M.M. SUASSUNA, A.C.D.; SOUZA, W.J. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na Região da chapada do Apodi. **Revista Verde**, v. 4, n.2, p. 64-67, 2009.

FONTAINE, M. C. et al. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, p. 5986-5996, 2006.

GHOSH, Sujata et al. Saracin: a lectin from *Saraca indica* seed integument induces apoptosis in human T-lymphocytes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 371, n. 2, p. 163-168, 1999.

GRABOWSKI, L. D.; LAPATRA, S. E.; CAIN, K. D. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, n. 10, p. 573-581, 2004.

GUEDES, Maria T. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses: clinical, microbiological and prevention aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 701-708, 2015.

GUIMARÃES, A. D. et al. Caseus lymphadenitis: epidemiology, diagnosis and control. **The IIOAB Journal**, v. 2, n. 2, p. 33-44, 2011.



HODGSON, A. L. M.; J. KRYWULT; L. A. CORNER; J. S. ROTHEL; A. J. RADFORD. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infect. Immun.** 60:2900-2905, 1999.

HOLT, J. G. et al. Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In: Holt J. G.; Krieg N. R.; Sneath P. H. A.; Staley J. T. (Eds). **Bergeys's Manual of Determinative Bacteriology**, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados agregados – Sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default>>. Acesso em 27 jan. 2016.

INOUE, K. et al. Structural analysis by X-ray crystallography and calorimetry of a haemagglutinin component (HA1) of the progenitor toxin from *Clostridium botulinum*. **Microbiology**, [S.l.], v. 149, n. 12, p. 3361 – 70, Dec. 2003.

JOLLY, R.D. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. **N. Z. Vet. J.**, v. 13, p. 141–147, 1965.

JUN HIRABAYASHI (ed.), *Lectins: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1200, DOI 10.1007/978-1-4939-1292-6\_4, © **Springer Science+Business Media** New York 2014

KHIL, LEE-YONG; KIM, WI; LYU, SUYUN; PARK, WON BONG; YOON, JI-WON; JUN, HEE-SOOK. **Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells**. *World Journal of Gastroenterology*, 13 (20): 2811-2818, 2007.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOPES, F. C. et al., Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38: 935 – 941, 2005.

MAGNADOTTIR, B.; AUDUNSDOTTIR, S.S.; BRAGASON, B.T.H. *et al.* The acute phase response of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Humoral and cellular responses. ***Fish Shellfish. Immunol.***, v.30, p.1124-1130, 2011.

MCKEAN, Sandra C.; DAVIES, John K.; MOORE, Robert J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43 C. ***Research in microbiology***, v. 158, n. 3, p. 279-286, 2007.

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

MORAES NETO, O.T., A. RODRIGUES, A.C.A. ALBUQUERQUE E S. MAYER. Manual de capacitação de agentes de desenvolvimento rural (ADRs) para a Caprinovinocultura. **SEBRAE/PB**. João Pessoa. p 114, 2003.

MOREIRA, Renato De Azevedo; PERRONE, João Consani. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. ***Plant Physiology***, v. 59, n. 5, p. 783-787, 1977.

MORRIS, S. T. Economics of sheep production, ***Small Ruminant Research***, v.86, p. 59-62, 2009.

MOURA, C. L. F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. ***Revista de Ciências Médicas e Biológicas***, v. 1, n. 1, p. 105-115, 2010.

MOUSSA, Ihab M. et al. Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. ***Saudi Journal of Biological Sciences***, 2016.

NOGUEIRA, Lucas et al. Mycobacterium tuberculosis Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. ***European journal of immunology***, v. 40, n. 3, p. 744-753, 2010.

OLIVEIRA, José TA et al. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 3, p. 301-310, 2002.

PAN, S., TANG, J. & GU, X. (2010). Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Vol. 133, No. 2-4, pp. 154- 164, 0165-2427, 2010.

PATON, M. W. et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian veterinary journal**, v. 81, n. 1-2, p. 91-95, 2003.

PEDROSA, K. Y. F et al. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na zona noroeste do Rio Grande do Norte. **Caatinga**, v. 16, n. ½, p. 17-21, 2003.

PEEL, Margaret M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 185-191, 1997.

PERILLO, N. L., MARCUS, M. E. & BAUM, L. G. (1998). Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **Journal of Molecular Medicine**, Vol. 76, No. 6, pp. 402-412, 0946-2716, 1998.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. (1995). Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Vol. 109, No. 2, pp. 347-352, 0032- 0889, 1995.

PINHEIRO, R.R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.52, n.5, p.534-543, 2000.

PODGORSKYI, V. S. et al. The properties of lectins and cells surface biopolymers of non-pathogenic corynebacteria. **Biopolymers & Cell**, v. 27, n. 1, 2011.

PRODINGER, W.M. et al. Complement. In: Paul, WE. **Fundamental Immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, p. 1077-1103, 2003.

PUGH GD. Sheep and goat medicine. New York: Elsevier; 2004.

QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY B, CARTER GR. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. In: Quinn PJ. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe. p.881-4, 1994.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 648p, 1994.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas por bactérias. In: RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 653-655, 2002.

RADOSTITS, Otto M. et al. (Ed.). **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Elsevier Health Sciences, 2006.

RAO, Y.V.; DAS, B.K.; JYOTYRMAYEE, P.; CHAKRABARTI, R. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeorohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immunol.**, v.20, p.263-273, 2006.

RIBEIRO, O. C. et al. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 26, p. 461-465, 1991.

RIET-CORREA, FRANKLIN et al. Doenças Bacterianas linfadenite caseosa. In: **Doenças de ruminantes e Equinos**. 3<sup>a</sup> ed. Vol. 1, Santa Maria: Pallotti, p. 347-351, 2007.

RUIZ, J. C. et al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1-16, 2011.

SÁ, Maria da CA et al. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1319-1324, 2013.

SÁ, Maria da Conceição Aquino de et al. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. **Genetics and molecular biology**, v. 36, n. 2, p. 265-268, 2013.

SAMPAIO, B. et al. A Economia da Caprinocultura em Pernambuco: Problemas e Perspectivas, **Revista de Economia**, v. 35, n. 2, p. 137-159, Editora UFPR, 2009.

SANTA ROSA, J. Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle. 1ª ed. Brasília/Sobral: **EMBRAPA**, 167-170p, 1996.

SEBRAE – Análise Mercadológica: Ovinocaprinocultura / UAM/ Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2005.

SENTURK, S; TEMIZEL, M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Vet Rec.** 159: 216-7, 2006.

SHARON, N. & LIS, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. **Science**, Vol. 246, No. 4927, pp. 227-234, 0036-8075, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB J**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SIMMONS, C. P. et al. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, Victoria, v.66, n.2, p.474-479, Feb. 1998.

SIMMONS, C. P.; HODGSON, A. L. M.; STRUGNELL, R. Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, Victoria, v.65, n.8, p.3048- 3056, Aug. 1997.

SMITH PB. Large animal internal medicine. 4th. St Louis: Mosby; 2003.

SONG, S. K.; MOLDOVEANU, Z.; NGUYEN, H. H.; KIM, E. H.; CHOI, K. Y.; KIM, J. B.; MESTECKY, J. Intranasal immunization with influenza virus and Korean

mistletoe lectins (MLI) in oncology: Current State of Clinical Research. **Onkologie**, 25 (4): 374-380, 2007.

SOUZA, B. B.; BENICIO, A. W. A.; BENICIO, T. M. A. Caprinos e ovinos adaptados aos trópicos. *J Anim Behav Biometeorol* v.3, n.2, p.42-50, 2015.

SOUZA, M. F. et al. Linfadenite caseosa em ovinos deslançados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, 2011.

STANFORD, K.; BROGDEN, K. A.; MCCLELLAND, L. A.; KOZUB, G. C.; AUDIBERT, F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines, *Canadian journal of veterinary research*. n. 62, p.38–43, 1998.

STING, Reinhard et al. Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats in Baden-Wuerttemberg (Germany) and seroreactions on antigens used for newly developed enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). **Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift**, v. 125, n. 1-2, p. 67-75, 2011.

TIZARD, Ian. **Imunologia veterinária**. 9. Ed Elsevier Brasil, 2014. p. 559-591.

VALE, V. et al. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 2, 2003.

VALLI, V.E; PARRY, B.W. Caseous lymphadenitis. In: Juby KVF, Kennedy PC, Palmer N, editors. *Pathology of domestic animals*. 5th ed. San Diego: Academic Press; v. 3, p. 238-40, 2007.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. Handbook of plant lectins: **Properties and biomedical applications**, John Wiley & Sons, 978-047-196-445-2, New York, 1998.

VANDEPITTE, J.; ENGBAEK, K.; PIOT, P. *Métodos básicos de laboratório em bacteriologia clínica*. **Organização Mundial de Saúde**, Genebra, p,122, 1993.

VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., FREEZE, H. H., STANLEY, P., BERTOZZI, C. R., HART, G. W. & ETZLER, M. E. (EDS.). *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory **Press**, 978-087-969-770-9, New York, 2008.

VIDAL, M. F. et al. Análise econômica da produção de ovinos em lotação rotativa em pastagem de capim Tanzânia (*Panicum maximum* (JACQ)), **RER**, v. 44, n. 4, p. 801-818, 2006.

VOET, D. & VOET, J. G. *Biochemistry (Second Edition)*, John Wiley & Sons, 0- 471-58651-X, New York, 1995.

WALKER, J. et al. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infect. Immun**, n. 62, p. 2562-2567, 1994.

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

YAN, Q., ZHU, L., KUMAR, N., JIANG, Z. & HUANG, L. (2010). Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with antiproliferative activity. **Food Chemistry**, Vol. 122, No. 3, pp. 589-595, 0308-8146, 2010.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. **Life sciences**, v. 70, n. 10, p. 1129-1138, 2002.

YOZWIAK, M. L.; SONGER, J. G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 392-397, 1993.