

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO
IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DIAGNÓSTICO DE
LINFADENITE CASEOSA EM OVINOS E CAPRINOS**

Aline Najara Domingos Gonçalves

CAMPO GRANDE, MS

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
(ELISA) PARA DIAGNÓSTICO DE LINFADENITE CASEOSA EM
OVINOS E CAPRINOS**

Development of an immunoenzymatic test (ELISA) for diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats

Aline Najara Domingos Gonçalves

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Grácia Maria Soares Rosinha

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS

2017

Dedico este trabalho à minha mãe, Selma, e à minha avó Benedita que, muitas vezes, doaram-se e renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer-lhes que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível, graças ao amor, apoio e dedicação que as senhoras sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram a agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. Ao meu pai, Gilmar, e ao meu pai de coração, Edivaldo, aos meus irmãos Kauê e Cássio. Graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados; as vitórias foram conquistadas; e as alegrias, divididas. Ao meu esposo, Edimilson, pela paciência e compreensão, durante essa longa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder o dom da vida e saúde, permitindo assim, que eu siga meus sonhos, por me trazer forças, mesmo nas adversidades e tribulações e por me amar.

À minha família, que é o alicerce mais forte da minha existência e que me permitiu ser o que sou, dando força afetiva, impulsionando-me em, absolutamente, todos os momentos. Mãe e vó Dita, tenho certeza de que nada seria possível sem as senhoras - Graduação, Mestrado e, tampouco, Doutorado. Aos meus primos, desculpa pela ausência, mas obrigada pelo incentivo.

Ao meu esposo, obrigada pela sua força, dedicação, compreensão e confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida.

Às minhas amigas Marry e Anna Lê, por todas as vezes que me ajudaram na obtenção dos artigos, por todas as vezes que rimos juntas, por nos ajudarmos sempre, por serem luz em minha vida e por nossa amizade, que foi além das paredes do laboratório e assim permanecerá.

À Goretti, não apenas técnica do LEGA, mas também minha amiga. Obrigada pelo seu auxílio sempre que precisei!

Aos amigos Cleber, Matheus, Juliana, Nayana, Jennyfer e Livia, pela amizade e apoio. Vocês moram em meu coração!

Aos colegas que passaram pelo Laboratório de Engenharia Genética Animal, ao longo desses anos de Doutorado.

Aos meus colegas da Agraer, que sempre me deram palavras de incentivo, no decorrer dessa caminhada, em especial, à Eliane, mesmo não integrando mais a equipe. Deixei-lhe “na mão” por várias vezes, porque precisava estudar, mas sei que compreende e se orgulha do meu esforço.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Grácia Rosinha, não somente por sua compreensão com as transições que aconteceram, nos últimos dois anos do curso, pela oportunidade concedida, por acreditar em meu trabalho e não desistir de mim, mas, sobretudo, por sua competência teórica e seus ricos ensinamentos, durante todo o Doutorado.

À Dr.^a Lenita Ramires, pelos ensinamentos e paciência, por toda a ajuda que me deu, ao longo dessa jornada.

Ao Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, pela contribuição na otimização da sequência do gene *xal* e nos custos de síntese e clonagem deste, realizados pela Empresa *Genone Biotechnologies*.

Ao pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Fernando Reis, por todo apoio e ajuda durante as coletas para obtenção das amostras de soros.

À Prof.^a Dr.^a Cássia Leal, por todo o suporte e auxílio para a execução dos testes bioquímicos realizados na UFMS/FAMEZ.

Ao Gerente Regional da Agraer Campo Grande, Sílvio Vargas, por sua compreensão durante a fase de estágio probatório, por permitir-me as idas à Embrapa para a finalização deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudos.

À FUNDECT, pelo financiamento da pesquisa, concedido para a realização do trabalho.

Ao Programa de Doutorado em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela oportunidade, e a todos os professores que dividiram comigo seus conhecimentos e que fizeram de mim uma profissional melhor.

À Embrapa Gado de Corte, por disponibilizar os laboratórios e pelo convívio com pessoas maravilhosas que ali trabalham.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho ou que, simplesmente, torceram para que eu obtivesse sucesso. A todos, muito obrigada!

“Tem dia que a gente põe vírgula, tem dia que colocamos reticências, tem dia que colocamos ponto final e tem dia que temos a necessidade de virar a página”.

Padre Fábio de Melo

Resumo

GONÇALVES, A. N. D. Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. 65f. 2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* e que acomete ovinos e caprinos. Esta doença é caracterizada por lesões purulentas e caseosas nos gânglios linfáticos e, ocasionalmente, pulmões, baço, rins e fígado. O diagnóstico da LC, normalmente, é baseado em sinais clínicos, no entanto, o teste padrão ouro é o isolamento microbiológico, realizado a partir do material purulento dos abscessos. Faz-se necessário um método que seja capaz de diagnosticar animais doentes, com presença ou não de abscessos externos. Neste contexto, visto os esforços para identificar e controlar a doença, objetivou-se, neste estudo, avaliar o potencial da proteína XA1 recombinante (XA1r) de *C. pseudotuberculosis* como candidata a compor um teste sorológico do tipo ELISA indireto, para o diagnóstico de linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. A sequência do gene *xal*, que codifica a porção hidrofílica da proteína XA1, foi selecionada com o auxílio do programa *Protean* (DNASTAR®). Esta sequência e a construção do plasmídeo de expressão gênica foram sinteticamente confeccionadas pela empresa de biotecnologia *Genone Biotechnologies*. O gene *xal* foi clonado em plasmídeo de expressão em procariotos pET-47b(+). O plasmídeo pet47Bxa1 foi introduzido em célula quimicamente competente de *E. coli* Rosetta-Gami e realizada a expressão gênica XA1r foi purificada por cromatografia de afinidade, em resina metálica com a coluna de agarose níquel, dialisada em PBS, quantificada pelo método de Lowry e armazenada a -20°C. Posteriormente, um teste de ELISA indireto foi padronizado com o uso desta proteína como antígeno sistemático (n= 23), assintomáticos (n= 10) e histórico de LC (n= 10). O banco formado com soros de caprinos foi composto por soros positivos (n=29), negativos (n=19), soros de animais de um rebanho com histórico de LC (n= 15) e outros soros de caprinos com sinais clínicos da doença (n= 29), totalizando 92 soros. O ponto de corte foi feito por meio da curva ROC. O teste de ELISA indireto foi capaz de discriminar animais positivos e negativos, com sensibilidade de 90,9% e especificidade de 72,2%. Foram identificados cinco animais como falso-positivos e três foram considerados falso-negativos. Quando testados os animais dos três grupos - testes assintomáticos, histórico de LC e controle sistemático -, 90,7% foi considerado positivo para LC. O teste de ELISA indireto para diagnóstico de LC em caprinos apresentou sensibilidade de 96,6% e especificidade de 67,2%. O teste de ELISA apresentou um animal falso-negativo e seis falso-positivos. A associação do teste de ELISA indireto, proposto a exames clínicos, foi capaz de diagnosticar como positivos 96,55% dos animais que possuíam sinal clínico da doença, mostrando assim, o potencial da proteína XA1r no reconhecimento de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis*. Os resultados demonstram a potencialidade da proteína XA1r, quando utilizada como antígeno em teste ELISA indireto. Deste modo, este imunoenensaio poderá ser utilizado para o diagnóstico de ovinos e caprinos com LC, auxiliando no controle da doença.

Palavras-chave: Linfadenite Caseosa. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Ovinos. Caprinos. ELISA.

Abstract

GONÇALVES, A. N. D. Avaluation of recombinant antigen of corynebacterium pseudotuberculosis in sorological test for diagnosis of caseosa lymphadenitis in goats and sheep/tese. 65f. 2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

Lymphadenitis Caseosa (LC) is an infectious disease, caused by the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis* and affecting sheep and goats. This disease is characterized by purulent and caseous lesions in the lymph nodes and, occasionally, the lungs, spleen, kidneys and liver. The diagnosis of CL is usually based on clinical signs, however, the gold standard test is microbiological isolation, performed from the purulent material of the abscesses. A method is necessary which is capable of diagnosing diseased animals, with or without external abscesses. In this context, considering the efforts to identify and control the disease, the objective of this study was to evaluate the potential of the recombinant XA1 protein (XA1r) of *C. pseudotuberculosis* as a candidate to compose an indirect ELISA serological test for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. The *xa1* gene sequence, which encodes the hydrophilic portion of the XA1 protein, was selected with the aid of the Protean program (DNASTAR®). This sequence and the construction of the plasmid of gene expression were synthesized by the biotechnology company *Genone Biotechnologies*. The *xa1* gene was cloned into expression plasmid in pET-47b (+) prokaryotes. Plasmid pet47Bxa1 was introduced into a chemically competent *E. Coli* Rosetta-Gami cell and the XA1r gene expression, purified by affinity chromatography, was performed on metal resin with the nickel agarose column, dialyzed in PBS, quantified by the Lowry method and stored at -20°C. Posteriorly, an indirect ELISA test was standardized, using this protein as a systematic antigen (n = 23), asymptomatic (n = 10) and a historic of CL (n = 10). The bank formed by goats sera was composed of positive (n = 29), negative sera (n = 19), sera from animals from a herd with a history of LC (n = 15) and other sera from goats with clinical signs of disease (n = 29), totaling 92 sera. The cut-off point was made using the ROC curve. The indirect ELISA was able to discriminate positive and negative animals, with sensitivity of 90.9% and specificity of 72.2%. Five animals were identified as false-positive and three were considered false-negative. When the animals of the three groups were tested - asymptomatic tests, historic of CL and systematic control -, 90.7% was considered positive for CL. The indirect ELISA test for diagnosis of LC in goats presented sensitivity of 96.6% and specificity of 67.2%. The ELISA test showed one false-negative animal and six false-positive animals. The association of the indirect ELISA test, proposed to clinical exams, was able to diagnose as positive 96.55% of the animals that had clinical signs of the disease, thus showing the potential of XA1r protein in the recognition of antibodies against *C. pseudotuberculosis*. The results demonstrate the potential of the XA1r protein, when used as an antigen in the indirect ELISA test. Thus, this immunoassay can be used for the diagnosis of sheep and goats with LC, helping to control the disease.

Keywords: Lymphadenitis Caseosa. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Sheep. Goats. ELISA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAAF	Citologia Aspirativa com Agulha Fina
CDS	Sequência de Codificação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
ERIC	Sequências Repetitivas Intergênicas de Enterobactérias
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization of the Nation Statistics Division
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LC	Linfadenite Caseosa
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
NO	Óxido Nítrico
ORF	Fase de Leitura Aberta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLD	Exotoxina Fosfolipase D
PNSCO	Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos
RFLP	Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	Ácido ribonucleico
<i>rpoB</i>	β - subunidade RNA Polimerase
Teste VM	Teste do vermelho de metila
Teste VP	Teste Voges-Proskauer
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
TNF-α	Fator Necrose Tumoral- α
TSI	Tríplice Açúcar Ferro
Fe	Ferro

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
μm	Micrômetros
%	Por cento

SUMÁRIO

1		
2	1 INTRODUÇÃO	14
3	1.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS E	
4	MICROBIOLÓGICAS	16
5	1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	18
6	1.2.1 EXOTOXINA FOSFOLIPASE D (PLD) E LÍPIDEOS DA PARECE	
7	CELULAR.....	18
8	1.2.2 ABSORÇÃO DE FERRO.....	19
9	1.3 PATOGENIA E TRANSMISSÃO.....	20
10	1.4 SINAIS CLÍNICOS.....	21
11	1.5 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS.....	22
12	1.6 CONTROLE E PROFILAXIA.....	24
13	1.7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	25
14	1.8 OBJETIVO.....	30
15	1.8.1 OBJETIVO GERAL.....	30
16	1.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
17	REFERÊNCIAS	31
18	Manuscrito 1 - Desenvolvimento de Ensaio Imunoenzimático (Elisa) Indireto na	
19	detecção de anticorpos Anti – <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em	
20	ovinos.....	40
21		
22	Manuscrito 2 - Utilização da proteína Xa1 recombinante como antígeno em teste	
23	de ELISA Indireto para o diagnóstico da linfadenite caseosa em	
24	caprinos.....	54
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		

34 1 INTRODUÇÃO

35

36

37 A caprinocultura e a ovinocultura são atividades praticadas em todos os continentes do
38 mundo, presentes em diferentes ecossistemas com clima e vegetação muito diversos,
39 exercidas tanto em regiões com maior abundância de água e alimentos como em zonas
40 semiáridas (JESUS JÚNIOR et al., 2010).

41 No Brasil, a criação de pequenos ruminantes vem aumentando sua participação no
42 agronegócio e a tendência é de que se mantenha em expansão. O rebanho ovino do país está
43 estimado em 18.410.551 milhões de cabeças, distribuídas em todas as suas regiões, enquanto
44 o efetivo caprino soma cerca de 9.614.722 milhões de animais, sendo que mais de 90% deste
45 total estão concentrados na Região Nordeste do país, segundo o Instituto Brasileiro de
46 Geografia e Estatística - IBGE (2015).

47 A produção de lã, por meio da criação de raças lanadas e mistas, foi o principal
48 objetivo da exploração econômica da ovinocultura, no século XX. Os sistemas produtivos
49 eram desenvolvidos com o intuito de obter a maximização da produção de lã nos rebanhos,
50 enquanto a produção de carne era uma atividade considerada secundária, apenas para o
51 consumo dos estabelecimentos rurais (VIANA; SILVEIRA, 2008).

52 No entanto, a carne ovina deixou de ser um produto apreciado exclusivamente no meio
53 rural do Sul e do Nordeste brasileiro, conquistando consumidores nos centros urbanos e na
54 Região Sudeste. Embora o consumo *per capita* não tenha crescido, o simples fato de ele ter
55 penetrado em mercados mais dinâmicos evidencia uma ampla gama de oportunidades que
56 precisam ser mais bem exploradas, para que a atividade possa atingir todo o seu potencial
57 (NETO, 2010). Em países europeus e Estados Unidos da América (EUA), este tipo de fonte
58 de proteína é visto como um produto diferenciado, sendo apreciado e valorizado pelos
59 consumidores de maior poder aquisitivo, o que torna esse mercado uma alternativa para a
60 exportação pelos países produtores (VIANA, 2008).

61 A caprinocultura na Região Nordeste é caracterizada pelo sistema extensivo de
62 manejo, com a utilização da caatinga nativa como suporte forrageiro, também conhecido
63 como Sistema Tradicional, geralmente, apresentando grandes áreas, cujo rebanho é composto
64 de animais sem raça definida ou por raças nativas (GOULART; FAVERO, 2011). Apesar do
65 baixo nível tecnológico, ainda presente em todo processo produtivo, a caprinocultura de corte,
66 no Brasil, principalmente nesta região, tem apresentado configurações que a colocam numa
67 posição privilegiada no cenário do agronegócio. Isto está respaldado no incremento do
consumo interno, em demandas concretas de exportação de carne e de pele para diversos

68 países, bem como na percepção de oportunidades de negócio que a atividade oferece
69 (SOUSA, 2007).

70 E mesmo com o contingente caprino voltado para a produção de carne e pele, nos
71 últimos anos, a produção leiteira cresceu consideravelmente, tornando-se uma atividade de
72 importância econômica e social, com mais de 153.600 toneladas de leite produzidas ao ano
73 (FAO - *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*
74 *STATISTICS DIVISION*, 2014).

75 Para concretizar as projeções e tendências que envolvem a caprinovinocultura,
76 são necessários investimentos em salubridade. Esse papel é exercido pelo Ministério da
77 Agricultura, por meio do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO),
78 que visa ao fortalecimento da cadeia produtiva dessas espécies, pela adoção de ações de
79 vigilância e defesa sanitária animal (BRASIL, 2016).

80 Ainda que o cenário da produção de pequenos ruminantes, no Brasil, esteja em
81 expansão, a mesma apresenta índices zootécnicos, muitas vezes, insatisfatórios, em
82 decorrência dos desafios de ordem sanitária.

83 Uma enfermidade que causa preocupação nesta cadeia produtiva é a linfadenite
84 caseosa (LC). Esta é uma doença crônica que afeta ovinos e caprinos (AYERS, 1977). O “mal
85 do caroço”, denominação também utilizada para tal enfermidade é caracterizada por produzir
86 lesões crônicas de aspecto caseoso e purulento, observadas principalmente em linfonodos
87 superficiais (SANTOS JÚNIOR; GOMES et al., 2012), enquanto a forma visceral da doença é
88 caracterizada por abscessos em órgãos internos, sendo que estas duas formas podem coexistir
89 (ECKERSALL et al., 2007).

90 A presença de nódulos linfáticos externos e internos acarretam prejuízos na produção,
91 trazendo dificuldades aos animais para a execução de funções simples, como pastejo,
92 reprodução e produção leiteira, além da condenação de carcaças em abatedouros e
93 depreciação da pele, o que leva a grandes perdas econômicas (MOTTA et al., 2010;
94 SOLANET et al., 2011). Os critérios para a condenação de carcaças de ovinos e caprinos em
95 frigoríficos brasileiros estão estabelecidos no artigo 225, da seção IV, de 29/03/1952, no qual
96 é enfatizado que o parâmetro para a condenação é a extensão dos abscessos presentes na
97 carcaça (BRASIL, 1952).

98 Há registros de linfadenite caseosa em vários países, incluindo África do Sul, Estados
99 Unidos, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido e Egito (SEYFFERT et al., 2009;
100 HASSAN et al., 2012). No Brasil, esta enfermidade é considerada endêmica e tem uma
101 prevalência clínica variável entre 5% a 50%, sendo mais comum em caprinos e ovinos

102 deslanados (SOUZA et al., 2011; ANDRADE et al., 2012). Pinheiro et al. (2000) relataram
103 algum sinal clínico de LC em caprinos de 66,9% das propriedades avaliadas no Estado do
104 Ceará, independente da época do ano, período seco ou chuvoso. Em Minas Gerais, foram
105 registradas prevalências de 75,8% em ovinos e 78,9% para caprinos (RUIZ et al., 2011).

106 A identificação da LC é realizada por meio do diagnóstico clínico, no qual se visualiza
107 a presença de abscessos nos linfonodos superficiais do animal (BAIRD; MALONE, 2010).
108 Além deste, deve ser realizado o isolamento e a identificação do agente causador da doença,
109 que é considerado teste padrão ouro, a partir de exame bacteriológico do material caseoso
110 drenado dos abscessos (NASSAR et al., 2014).

111 As provas bioquímicas são métodos bastante simples, utilizados para a realização de
112 diagnóstico diferencial, em relação aos possíveis agentes, que são encontrados no material
113 drenado dos abscessos em linfonodos (EMBRAPA, 2007). Há também uma variedade de
114 métodos baseados em DNA, que têm sido utilizados para determinar e identificar genótipos
115 de *C. pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* em isolados, como PCR Multiplex
116 (PACHECO et al., 2007).

117 A detecção da doença na fase subclínica e/ou a identificação de animais com
118 abscessos internos exigem métodos de diagnóstico alternativos. Com isso, várias pesquisas
119 com testes sorológicos vêm sendo desenvolvidas para a determinação da LC, entre elas:
120 imunodifusão (BURRELL, 1980; RAMLAN et al., 2010); fixação do complemento
121 (SHIGIDI, 1979); soroneutralização e imunodifusão em gel de ágar (RIBEIRO et al., 2011).

122 Particularmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA – *Enzyme-Linked /Immuno*sorbent
123 *Assays*) provou ser um método versátil nos programas de controle e erradicação em rebanhos
124 (DERCKSEN et al., 2000). Estudos envolvendo ELISA indireto, contendo componentes do
125 extrato bruto bacteriano e proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* foram relatados, por
126 serem relativamente eficazes em programas de controle da enfermidade (BINNS et al., 2007).

127
128

129 1.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*: CARACTERÍSTICAS GERAIS E 130 MICROBIOLÓGICAS

131

132 Linfadenite caseosa é uma zoonose causada pela bactéria *Corynebacterium*
133 *pseudotuberculosis*, que pertence ao gênero *Corynebacterium*, filo *Actinobacteria*, também
134 conhecido como *Actinomycetos*. Este filo também compreende os gêneros *Mycobacterium*,
135 *Nocardia* e *Rhodococcus* que, em conjunto, formam um grupo supra gênero, conhecido por
136 suas iniciais como CMNR (OLIVEIRA et al., 2016). A *C. pseudotuberculosis* foi citada, pela

137 primeira vez, por Nocard, em 1885; posteriormente, por Preisz (1891), Lehmann e Neumann
138 (1896), Buchanan (1911) e Bergey (1923), e citada por Benham, Seaman e Woodbine (1962),
139 mas a nomenclatura atual foi adotada em 1948, na 6.^a edição do Bergey's Manual (COSTA et
140 al., 2002).

141 Este microrganismo caracteriza-se por sua forma de cocobacilo, Gram-positivo,
142 pleomórfico, imóvel, desprovido de esporo, medindo entre 0,5-0,8 µm por 1,0-3,0 µm. Pode
143 ser encontrado isolado ou em grupamentos irregulares, apresentando grande quantidade de
144 lipídeos na sua parede celular, particularmente, o ácido corinomicólico. É microaerófilo (5%
145 de gás carbônico), mas tolera condições de aerofilia em meios de cultura (CHIRINO-
146 ZARRAG et al., 2005; MOTTA et al., 2010). A Anaeróbia facultativa cresce melhor a 37 °C,
147 a um pH entre 7,0-7,2. Inicialmente, seu crescimento é esparso sobre a superfície do meio de
148 cultura ágar sangue e, em seguida, torna-se organizado em grupos ou em paliçadas
149 (DORELLA et al., 2006; HASSAN et al., 2012).

150 As colônias desta bactéria são pequenas, brancas e secas, podem ser rodeadas por uma
151 zona de hemólise, após até 48 horas de incubação (MARKEY et al., 2013), essas também
152 podendo desenvolver-se em meios enriquecidos com soro animal (SANTOS JÚNIOR;
153 GOMES, 2012). Em meio líquido, observa-se o turvamento deste, com a presença de uma
154 membrana, provavelmente em função da grande quantidade de lipídios da célula bacteriana,
155 que é uma característica peculiar desse agente (ABREU et al., 2008). Com agitação, desfaz-se
156 a película e há a formação de flocos (EMBRAPA, 2007).

157 Dentro da espécie *C. pseudotuberculosis*, são reconhecidos dois biovars, que são
158 diferenciados pela capacidade ou não em reduzir nitrato a nitrito. O biovar *equi* é tido como
159 nitrato-positivo, enquanto o biovar *ovis*, nitrato-negativo (BELCHIOR et al., 2007; ABREU
160 et al., 2008).

161 O biovar *Ovis* afeta, sobretudo, ovinos e caprinos, causando abscessos superficiais e
162 viscerais, ao passo que o biovar *Equi* afeta preferencialmente cavalos, causando linfangite
163 ulcerativa das extremidades distais, abscessos na porção ventral do tórax e abdome e
164 furunculose (GUIMARÃES et al., 2011). A diferença entre os biovars são estruturais, tais
165 como o número de Sequência de Codificação (CDS), genes ou proteínas, que são muito
166 semelhantes entre cepas de ambos. A patogenicidade destes biovars pode ser explicada pela
167 presença de genes que são espécie-específicos, uma vez que cada agente patogênico parece
168 infectar, preferencialmente, um hospedeiro em particular, causando a distinção dos sinais
169 clínicos da doença (DORELLA et al., 2013).

170

171 1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

172

173 1.2.1 EXOTOXINA FOSFOLIPASE D – PLD E LIPÍDEOS DA APREDE CELULAR

174

175 Quanto aos fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis*, apenas a exotoxina
176 fosfolipase D (PLD) e os lipídeos da parede celular são os mais bem caracterizados. A PLD é
177 uma exotoxina potente, com massa molecular de 31,4 kDa, produzida por esta bactéria e em
178 sido considerada seu principal fator de virulência (DORELLA et al., 2006). Esta possui a
179 capacidade de reduzir a viabilidade de neutrófilos, além do fato de estudos com diferentes
180 amostras de *C. pseudotuberculosis* demonstrarem, de forma convincente, a necessidade dessa
181 exotoxina para estabelecimento da LC (MCKEAN et al., 2007). Esta afirmação é apoiada por
182 evidências experimentais, em que o gene *pld* foi excluído do cromossomo ou inativado por
183 mutação, tornando a bactéria incapaz de causar abscessos nos linfonodos dos animais
184 analisados, principal característica da linfadenite caseosa (BAIRD et al., 2007).

185 A PLD atua como esfingomiélinase, é dermonecrótica, hemolítica, causa supuração e
186 tem ação nas células endoteliais, causando aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e
187 linfáticos, desta maneira, facilitando a invasão bacteriana (ANDRADE et al., 2012). Esta
188 exotoxina desempenha um papel fundamental na infecção, permitindo que o organismo
189 escape do processo de autólise no interior dos macrófagos (JEBER et al., 2016). O seu papel
190 nas infecções de ovinos e caprinos a tornou o principal componente das vacinas patenteadas e
191 disponíveis, ao redor do mundo, além do fato da detecção de anticorpos contra a PLD ser a
192 base específica para muitos testes sorológicos para LC (BAIRD; MALONE, 2010).

193 Outro fator relacionado à virulência é a parede celular típica das corinebactérias, com
194 elevada concentração de lipídeos, o que a torna hidrofóbica e pode contribuir para a sua
195 sobrevivência dentro dos fagócitos, assim como para sua leucotoxicidade, ou seja, esses
196 lipídeos dificultam a fagocitose da bactéria, promovendo toxicidade às células do hospedeiro
197 (ABREU et al., 2008). A característica de sobrevivência de *C. pseudotuberculosis*, por longos
198 períodos no ambiente, mesmo que condicionada à exposição de luz solar ou dessecação,
199 também é associada aos lipídeos da parede celular (QUINN et al., 2005). Esses lipídios são
200 semelhantes ao ácido micólico de *Mycobacterium tuberculosis*, apesar de não apresentar
201 álcool-ácido resistência (COSTA, 2002; HASSAN et al., 2012).

202

203

204

205 1.2.2 ABSORÇÃO DE FERRO

206

207 O Ferro (Fe) é um regulador global, chave do metabolismo celular, o que torna sua
208 aquisição um ponto focal da biologia dos microrganismos patogênicos. Uma vez no
209 hospedeiro, o sucesso ou fracasso na captação de Fe processará impactos que terão resultados
210 em sua na patogênese (LEON-SICAIROS et al., 2015).

211 O ferro é abundante na natureza, mas a quantidade de ferro biologicamente disponível
212 é limitada, uma vez que o Fe (III) é insolúvel em solução aquosa. Além disso, muitos
213 microrganismos não são capazes de absorvê-lo, fazendo-se necessário um quelante
214 transportador de ferro, chamados sideróforos, utilizados para superar a limitação de Fe no
215 ambiente hospedeiro (FUKUSHIMA et al., 2014). Os sideróforos são de baixo peso
216 molecular, têm afinidade de ligação excepcionalmente elevada ao Fe, o que permite que
217 alguns sideróforos roubem ferro das proteínas hospedeiras (PALMER; SKAAR, 2016).

218 Por outro lado, alguns organismos são capazes de sequestrar Fe para limitar sua
219 aquisição por patógenos bacterianos, no entanto, esses agentes patogênicos desenvolveram
220 táticas para ultrapassar a limitação de ferro e elaborar receptores de ferro de elevada
221 afinidade, além de quelantes. Isto acarretou em uma corrida evolutiva na interface hospedeiro-
222 patógeno, envolvendo proteínas de ligação ao ferro hospedeiro e os mecanismos que as
223 bactérias utilizam para roubar ferro (CHOBY; SKAAR, 2016).

224 Por meio da análise da sequência de nucleotídeos de *C. pseudotuberculosis*, na porção
225 final do gene *pld*, foi identificada a presença de três fases de leituras abertas (ORFs),
226 transcritas de forma convergente a este gene. Estas ORFs foram denominadas XA (gene de
227 aquisição de ferro) 1, 2, 3 e 4. As proteínas sintetizadas assemelham-se, em conjunto, a um
228 sistema de transporte da membrana citoplasmática para captação de ferro-sideróforos,
229 pertencentes à superfamília dos transportadores 123. O operon *xa1* representa um importante
230 fator de virulência, além de sua responsabilidade na aquisição extracelular de ferro pela *C.*
231 *pseudotuberculosis*, o que auxilia em sua sobrevivência em ambientes hostis, como o
232 intracelular (DORELLA et al., 2006; SÁ et al., 2013).

233 Os genes *xa1* e *xa2* codificam as proteínas XA1 e XA2, respectivamente, que são
234 proteínas hidrofóbicas. O gene *xa3* codifica a proteína XA3 que apresenta um domínio
235 transportador ABC, que inclui sequências associadas à ligação de ATP; por fim, o gene *xa4*
236 codifica XA4, que é similar à proteína de ligação ao sideróforos-ferro, apresentando domínios

237 conservados da família e sequências de aminoácidos do complexo de ligação ao ferro
238 (BILLINGTON et al., 2002).

239

240 1.3 PATOGÊNEIA E TRANSMISSÃO

241

242

243 Linfadenite Caseosa é uma doença crônica, que afeta ovinos e caprinos (SÁ et al.,
244 2013a), e tem sido relatada em outros animais, como cavalos, lhamas, alpacas, búfalos,
245 veados e camelos (ZAVOSHTI et al., 2012) e, ocasionalmente em bovinos e humanos
246 (CAMARGO et al., 2010).

247 A disseminação da infecção pode ser por via linfática ou pela via sanguínea,
248 independente de sua causa inicial. Após a invasão do microrganismo no hospedeiro, esse
249 migra para a circulação linfática e vai até um linfonodo, onde a lesão pode se desenvolver. A
250 partir daí, passa a ocorrer a formação de pequenos abscessos na área cortical do linfonodo
251 acometido e que, ao juntar-se, dão origem a um único abscesso central (MEYER et al.,
252 2005).

253 Ao sobreviver no interior do macrófago, devido aos componentes de sua parede
254 celular serem capazes de inibir a fusão dos vacúolos fagocíticos com os lisossomos, *C.*
255 *pseudotuberculosis* infecta outros macrófagos e causa a morte destas células do sistema
256 imunológico. A ativação persistente de células T, na tentativa de conter e eliminar o
257 microrganismo, leva à formação de granulomas, os quais tentam bloquear as bactérias e,
258 frequentemente, estão associados à necrose central, chamada de necrose caseosa, causada por
259 produtos dos macrófagos. Os bacilos podem sobreviver por muitos anos e são contidos sem
260 quaisquer consequências patológicas, mas podem ser reativados a qualquer momento,
261 principalmente se a resposta imune não for capaz de controlar a doença (ABBAS et al., 2011).

262 As transmissões podem ocorrer por contato direto com secreções, ou com materiais
263 contaminados pelo conteúdo purulento de abscessos, ou devido a lesões pulmonares sem
264 diagnóstico prévio, responsáveis por descargas nasais que promovem a liberação de bactérias
265 por aerossóis (WILLIAMSON, 2001).

266 As formas de contaminação variam entre as espécies, fato este que reflete as
267 diferenças anatômicas na localização dos abscessos (MOTTA et al., 2010). Nos ovinos, a
268 contaminação da pele, após as tosquiadas e banhos de imersão, representam os principais fatores
269 de risco na transmissão do patógeno, resultando em abscessos em várias regiões do corpo
270 (COSTA, 2002; SOLANET et al., 2011). Em caprinos, a alimentação com forragens

271 grosseiras e pontiagudas, além de abrasões em animais alimentados em canzís, explicam o
272 predomínio dos abscessos na região da cabeça e pescoço (EMBRAPA, 1997; RIBEIRO et al.,
273 2001).

274 Linfadenite caseosa também pode ser introduzida na propriedade durante compras,
275 trocas ou empréstimos, por meio da aquisição de animais assintomáticos que pertenciam a um
276 rebanho infectado (SCHREUDER et al., 1994).

277

278 1.4 SINAIS CLÍNICOS

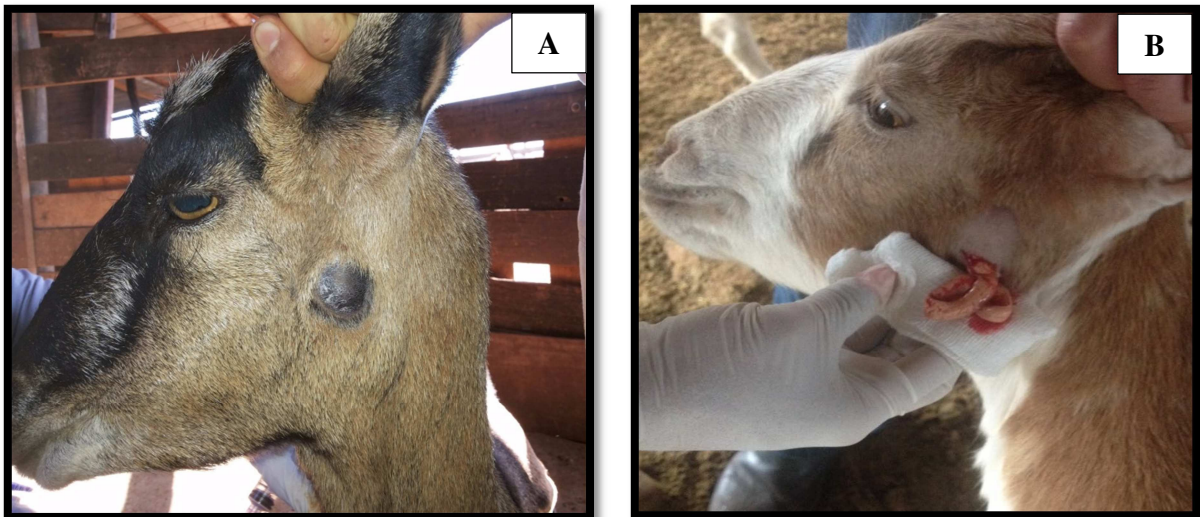
279

280 Linfadenite caseosa é conhecida, popularmente, como “mal do carço”, “síndrome da
281 ovelha magra” ou mesmo “furúnculo ovino”, devido à manifestação clínica da doença
282 (RIBEIRO et al., 2001). Esta enfermidade é caracterizada por abscessos com coloração que
283 varia do branco ao amarelado e/ou esverdeado, inodoro e com consistência inicial pastosa,
284 que finalmente se torna dura e seca, com uma aparência laminada (semelhante a uma cebola
285 cortada transversalmente) (SOUZA et al., 2011). A doença pode apresentar-se de duas
286 formas: superficial e visceral, no entanto, a coexistência dentro de um único hospedeiro é
287 possível (FONTAINE; BAIRD, 2008).

288 A forma externa da LC é caracterizada por abscessos em tecidos subcutâneos e nos
289 linfonodos superficiais retro faríngicos laterais, cervicais superficiais, subilíacos, mamários,
290 mas principalmente submandibular, parotídeo e pré-escapular (Figura 1). Esses linfonodos
291 apresentam aumento de tamanho, ausência de calor local, doloridos e firmes à palpação,
292 tornando-se flutuantes, à medida que a doença evolui. Na forma visceral da doença, as lesões
293 estão presentes, profundamente, dentro dos tecidos do animal. Ela comumente afeta gânglios
294 linfáticos internos (mediastínicos e torácicos) e órgãos como pulmões, fígado, rins e, em
295 menor escala, o baço, medula e sistema reprodutivo (BINNS et al., 2007; PACHECO et al.,
296 2009; GUIMARÃES et al., 2011; ZAVOSHTI et al., 2012).

297 A presença de abscessos internos pode ocasionar a perda de peso crônica, que é mais
298 comum em ovinos, por isso a denominação “síndrome da ovelha magra”. Essas lesões
299 viscerais podem levar à infertilidade, baixo desenvolvimento dos animais, diminuição no
300 número de crias e produção leiteira; nos ovinos, podem ainda afetar na produção de lã
301 (KUMAR et al., 2013). Os animais também podem apresentar intolerância ao exercício,
302 taquipnéia, dispnéia e tosse crônica (RADOSTITS et al., 2002).

303



304
 305 Figura 1. **A.** Caprino com abscesso causado por linfadenite caseosa, no linfonodo pareotídeo.
 306 Abscesso com queda de pelos na área central, em ponto para a realização da drenagem. **B.**
 307 Conteúdo caseoso de coloração branco amarelado sendo drenado do linfonodo mandibular de
 308 um caprino.

309 Fonte: Arquivo pessoal.

310

311 1.5 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS

312

313 O sistema imunológico consiste em imunidade inata e adquirida, as quais protegem o
 314 corpo de uma variedade de microrganismos infecciosos. A imunidade inata é uma resposta
 315 inespecífica e serve como a primeira linha de defesa do hospedeiro, para limitar a infecção em
 316 uma pequena área local. A imunidade adquirida é uma resposta específica e mais poderosa a
 317 um patógeno particular, e é classificada em dois tipos: a resposta do tipo Th1 e Th2, com base
 318 nos diferentes padrões de secreção de citocinas. Evidências sugerem que o equilíbrio Th1/Th2
 319 é de suma importância no combate da infecção (WATANEBE et al., 2004).

320 Por ser um patógeno intracelular facultativo, a imunidade contra *C.*
 321 *pseudotuberculosis* é complexa e envolve, principalmente, a resposta imune celular. As
 322 células cronicamente infectadas parecem ter sua função diminuída, favorecendo a
 323 permanência do patógeno no hospedeiro (SANCHES et al., 2012).

324 Ao invadir o organismo, a bactéria chega aos linfonodos regionais, onde produz a
 325 lesão caseosa característica. A hipótese mais aceita é que a infecção ocorra na pele lesionada
 326 ou íntegra e, a partir daí, chegue aos linfonodos ou a outros órgãos (BURREL, 1981; BATEY,
 327 1986). A patogenia e a imunologia da LC estão interrelacionadas. Após penetração de *C.*

328 *pseudotuberculosis* no hospedeiro, esta é capturada no local por células fagocíticas, os
329 neutrófilos e macrófagos (JOLLY et al., 1966; LAN et al., 1999).

330 Após a fagocitose, o fagossomo funde-se ao lisossomo, contudo, a bactéria continua a
331 multiplicar-se dentro dos fagolisossomos, levando à degeneração e morte celular dos
332 macrófagos (BASTOS et al., 2012). A incapacidade por parte dos macrófagos em eliminar a
333 bactéria pode ser devido, além da presença da camada lipídica da bactéria, à incapacidade
334 destes de produzir óxido nítrico (NO). O NO produzido durante a infecção bacteriana possui
335 propriedades antimicrobianas, capazes de eliminar agentes patogênicos, causando-lhes danos
336 ao DNA, RNA e proteínas (VOSKUIL et al., 2011; SILVA et al., 2014).

337 O sucesso na proliferação deste microrganismo é referente à sua capacidade de
338 sobreviver no habitat hostil de um macrófago, mesmo em face de uma resposta imune
339 específica das células. Como resultado, um pequeno número de bactérias viáveis pode
340 persistir no local da infecção. O granuloma parece suportar o crescimento bacteriano limitado
341 e impede a disseminação da infecção. No entanto, o granuloma também protege a bactéria, a
342 partir da resposta imune, e é provavelmente responsável pela natureza persistente ou latente
343 da infecção. A formação desses piogranulomas é dependente da imunidade adaptativa, que é
344 um processo complexo no caso de infecção por *C. pseudotuberculosis*, que envolve tanto
345 resposta humoral quanto mediada por células (SILVA et al., 2001; BEHAR et al., 2010;
346 BASTOS et al., 2012).

347 Estão envolvidas na resposta do hospedeiro à infecção citocinas inflamatórias, Fator
348 Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Interleucina (IL) 1- β e IL-6, que são expressas no local da
349 infecção e cujas células T estão associadas às citocinas IL-2, IL-4 e interferon- γ (IFN- γ),
350 expressas em nódulos linfáticos (ECKERSALL et al., 2007). Estas citocinas são liberadas por
351 várias células com função imunológica, tais como: queratinócitos, células de Kupffer, mucosa
352 epitelial e a glândula pituitária, mas, particularmente, por macrófagos, em resposta a
353 estímulos internos ou externos (JEBER et al., 2016).

354 O INF- γ estimula a produção de NO pelos macrófagos, que são induzidos a
355 expressarem moléculas apresentadoras de antígenos, o complexo principal de
356 Histocompatibilidade (MHC) das classes I e II, que são essenciais na ativação de células na
357 fase da resposta imune adaptativa (MAYER et al., 2005). A citocina IL-10 é capaz de
358 controlar a síntese de IFN- γ durante a infecção, evitando assim, a sobre-reatividade de Th1.
359 Por outro lado, a IL-12 também pode desencadear mecanismos relacionados à proliferação
360 celular e à produção de IFN- γ . Alguns estudos têm mostrado que o IFN- γ , IL-10 e IL-12 são

361 necessários para controlar infecções persistentes, causadas por parasitas intracelulares (VALE
362 et al., 2016).

363 Linfócitos T CD8+ estão envolvidos na resposta imune adaptativa, vinculada à
364 atividade citotóxica, sendo um mecanismo de proteção que promove a lise dos macrófagos
365 infectados por *C. pseudotuberculosis*. A resposta humoral de animais infectados por esta
366 bactéria, normalmente, é intensa e sua importância deve-se, sobretudo, por impedir a
367 disseminação do local de infecção para outros órgãos (MEYER et al., 2005). Yozwiak e
368 Songer (1993) observaram que a presença de anticorpos anti-fosfolipase D, antes da infecção,
369 exerce um efeito protetor, dificultando a disseminação da bactéria para os linfonodos.
370 Segundo Vale et al. (2003), o desenvolvimento da resposta imune humoral é importante para
371 a defesa imune contra esta bactéria (VALE et al., 2003).

372

373 1.6 CONTROLE E PROFILAXIA

374

375 O tratamento quimioterapêutico para LC é ineficaz, uma vez que as bactérias ficam
376 abrigadas dentro de granulomas e acabam protegidas das drogas antibióticas (COSTA et al.,
377 2011). Os antimicrobianos de escolha para o tratamento dos animais com esta doença são:
378 oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, sulfonamidas-trimetoprim, penicilina, rifampicina,
379 lincomicina, azitromicina, ceftiofur, gentamicina e sulfazotrim, havendo resistência à
380 polimixina (MOTTA et al., 2010; CAMARGO et al., 2010).

381 O principal aspecto relacionado ao controle da LC está no isolamento imediato dos
382 animais afetados e na remoção do material purulento, antes do rompimento do abscesso e
383 consequente contaminação do ambiente. É importante que haja cuidados durante a drenagem
384 cirúrgica dos abscessos e adequada eliminação do conteúdo purulento. Os animais tratados só
385 devem retornar ao rebanho após cicatrização completa da lesão. No caso de animais com
386 abscessos reincidentes, sugere-se que estes sejam eliminados do rebanho (WILLIAMSON,
387 2000; EMBRAPA, 2007),

388 Em relação ao manejo dentro da propriedade, algumas medidas devem ser adotadas
389 para o controle eficaz da doença, como práticas de tosquia dos animais com abscessos
390 aparentes, priorizando animais mais jovens, limpeza e desinfecção de baias, bebedouros e
391 comedouros, e a desinfecção dos instrumentos utilizados no manejo dos animais, como
392 tatuadores, material cirúrgico, agulhas e brincos de orelha, quando reutilizados (EMBRAPA,
393 2007).

394 É importante ressaltar que *C. pseudotuberculosis* pode sobreviver no solo
395 contaminado com pus por até oito meses, em galpões de tosquia por, aproximadamente,
396 quatro meses e na palha, feno e outros fomitês por até dois meses; baixas temperaturas e
397 ambientes úmidos prolongam o tempo de sobrevivência desta bactéria (LUCAS et al., 2009).

398 Como ferramenta na prevenção da LC, o animal pode ter sua imunidade induzida por
399 vários tipos de vacinas, sejam essas baseadas em bactérias vivas e/ou atenuadas,
400 microrganismos inativados (vacinas de primeira geração), extratos de microrganismos e/ou
401 proteínas ou subunidades recombinantes (vacinas de segunda geração), além da disposição de
402 formas baseadas em DNA (vacinas de terceira geração) ou aquelas que utilizam
403 microrganismos recombinantes vivos (SANTOS et al., 2016).

404 A utilização de vacinas de qualidade garante imunização eficiente e a proteção dos
405 animais. Atualmente, existem algumas vacinas comerciais disponíveis no mercado, como as
406 vacinas 1002 e Linfovac, que são compostas por suspensão do *C. pseudotuberculosis* viva
407 atenuada (LABOVET, 2016; VENCOFARMA, 2016) e Glanvac 6, uma vacina que protege
408 contra a LC e as principais clostridioses que acometem pequenos ruminantes, com o
409 diferencial, em relação às anteriores, de poder ser ministrada em fêmeas prenhes
410 (GLANVAC, 2016).

411 Essas vacinas conferem níveis variáveis de proteção, mas seus perfis de segurança
412 permanecem questionáveis, principalmente por conta de seus efeitos colaterais, que são mais
413 intensos em caprinos do que em ovinos. Estes efeitos colaterais incluem a formação de lesões
414 ou abscessos no local da injeção, febre, mal-estar e produção de leite reduzido (ALVES;
415 OLANDER, 1998; RIBEIRO et al., 2014).

416 Apesar da existência de medicamentos e vacinas, a identificação/remoção de animais
417 infectados é o fator-chave para o sucesso das medidas de controle da linfadenite caseosa
418 doença (SANTANA-JORGE et al., 2016).

419

420 1.7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

421

422 O diagnóstico clínico da LC é realizado por meio da identificação e palpação de
423 linfonodos superficiais, em ovinos e caprinos com a presença de abscessos sugestivos
424 (BAIRD; MALONE, 2010). Além deste, devem ser realizados o isolamento e a identificação
425 do agente causador da doença, que é considerado teste padrão ouro, a partir de exame
426 bacteriológico do material caseoso drenado dos abscessos (NASSAR et al., 2014). Com o
427 diagnóstico bacteriológico, é possível distinguir *C. pseudotuberculosis* de outros

428 microrganismos que causam lesões semelhantes, como *Arcanobacterium pyogenes* e
429 *Pasteurella multocida* (DORELLA et al., 2006). Apesar de o isolamento ser o teste padrão
430 ouro, esta técnica demanda tempo ou pode ser inviável, devido ao fato de muitos animais
431 possuírem apenas abscessos internos ou abscessos externos, mas que não romperam, contendo
432 poucas bactérias viáveis (BAIRD; FONTAINE, 2007).

433 No entanto, de acordo com Zavoshti et al. (2012), quando comparados os diagnósticos
434 por culturas e a histopatologia em casos suspeitos de linfadenite caseosa, em todos eles, o
435 exame microscópico deu um diagnóstico mais preciso quando comparado com o exame
436 macroscópico. A caracterização por biotipagem, suscetibilidade antimicrobiana, produção de
437 Fosfolipase D e a genotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado também são
438 possibilidades de detecção da presença de *C. pseudotuberculosis* (CONNOR et al., 2010).

439 As provas bioquímicas são métodos bastante simples, utilizados para a realização de
440 diagnóstico diferencial, em relação aos possíveis agentes encontrados no material drenado, a
441 partir dos linfonodos de animais acometidos (EMBRAPA, 2007). A produção de catalase,
442 urease e indol, motilidade em ágar semissólido, hidrólise da esculina, acidificação de
443 carboidratos, oxidação-fermentação em meio de Hugh e Leifson, redução de nitrato, cultivo
444 em TSI (Tríplice Açúcar Ferro) e ágar citrato de Simmons; testes de Camp, VM/VP
445 (Vermelho Metila/Voges-Proskauer) e oxidase são alguns dos testes bioquímicos utilizados
446 (ANDRADE et al., 2012), além de coloração de Gram e sensibilidade a antibióticos
447 (BELCHIOR et al., (2007).

448 Testes alérgicos cutâneos foram desenvolvidos para o diagnóstico da linfadenite
449 caseosa. Esses testes consistem na inoculação de um alérgeno, designado linfadenina, por via
450 intradérmica e mensuração da espessura da dobra da pele, antes e após a inoculação. Alves e
451 Olander (1999) avaliaram um teste de pele em caprinos vacinados e desafiados com *C.*
452 *pseudotuberculosis*, a partir de um antígeno bruto da bactéria inativada por formalina. Esse
453 resultado indicou que um antígeno específico pode ser usado em caprinos, no diagnóstico da
454 LC como teste de pele. Os testes de hipersensibilidade, como também são chamados, foram
455 um dos primeiros a serem elaborados na forma de testes intradérmicos com inúmeras
456 variações no preparo do antígeno, que culminam em reações que lembram a tuberculina
457 (EMBRAPA, 2014).

458 A Citologia Aspirativa com Agulha Fina (CAAF) é uma alternativa ao diagnóstico
459 citológico e microbiológico de *C. pseudotuberculosis*. Este demonstra ser de fácil execução,
460 baixo custo e reduzida agressão tecidual quando comparado a outras técnicas convencionais,
461 como a histopatologia (RIBEIRO et al., 2001). Tal técnica dá-se através da constatação da

462 presença do microrganismo nos linfonodos com ou sem lesões, sua associação ao cultivo
463 microbiológico do material aspirado dos gânglios linfáticos, possibilitando o aumento da
464 eficiência do diagnóstico citológico (RIBEIRO et al., 2009).

465 A demanda por testes capazes de identificar *C. pseudotuberculosis*, em um
466 determinado hospedeiro na fase subclínica da infecção, incentivou diversas pesquisas,
467 incluindo métodos moleculares de diagnóstico, como a Reação em Cadeia da Polimerase
468 (PCR). A detecção e amplificação dos genes *16S rRNA* e *β-subunidade RNA*
469 *Polimerase(rpoB)* têm sido empregadas para facilitar o diagnóstico diferencial de *C.*
470 *pseudotuberculosis* de outras bactérias que possam estar presentes em amostras de pus
471 (ALGAMMAL, 2016).

472 O gênero *Corynebacterium* compreende mais de 60 espécies, isoladas a partir de seres
473 humanos ou animais domésticos. A introdução de métodos moleculares, incluindo a análise
474 de sequência do gene *16S rRNA*, abriu o caminho para a identificação mais confiável de
475 espécies de *Corynebacterium*. Khamis et al. (2005) comparam os gene *16S rRNA* e uma
476 parcial do *rpoB*, por meio do sequenciamento genético para identificação de isolados de
477 *Corynebacterium*. Este estudo confirmou que o sequenciamento parcial do gene *rpoB* é
478 simples e eficiente para a identificação de corinebactérias e que este pequeno fragmento
479 sequenciado é mais conveniente do que o sequenciamento do gene *16S rRNA*. No entanto, em
480 alguns casos ambíguos, deve ser usado em conjunto com outros testes para a identificação
481 definitiva.

482 Uma grande variedade de métodos baseados em DNA tem sido utilizada para
483 determinar e identificar genótipos de *C. pseudotuberculosis*, *C. Diphteriae* e *C. Ulcerans* em
484 isolados, como PCR Multiplex (PACHECO et al., 2007; TORRES et al., 2013;
485 HERNÁNDEZ- LEÓN et al., 2016) e a PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores para
486 Sequências Repetitivas Intergênicas de Enterobactérias (ERIC-PCR), em amostras de campo
487 oriundas tanto de ovinos como de caprinos, com alta resolução e repetibilidade (DORNELES
488 et al., 2012; DORNELES et al., 2014). Outro método utilizado é a caracterização molecular,
489 por meio da PCR associada com o Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
490 (PCR-RFLP) (ABREU et al., 2008; PAVAN, et al. 2012).

491 Exames sorológicos são importantes para a detecção de abscessos inaparentes, uma vez
492 que animais assintomáticos podem ser fontes de infecção. Vários imunoenaios têm sido
493 utilizados na identificação de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis*, entre eles, o Ensaio de
494 Imunoadsorção Enzimática (ELISA). Dercksen et al. (2000) avaliaram um teste de ELISA
495 para o diagnóstico de LC, em ovinos saudáveis que pertenciam a rebanhos livres da doença e

496 em ovinos cujo diagnóstico foi confirmado por isolamento do agente. O teste de ELISA
497 proposto apresentou uma especificidade de $99 \pm 1\%$ e uma sensibilidade de $79 \pm 5\%$.

498 Malone et al. (2006) também avaliaram o desempenho de um ELISA sanduíche para
499 identificação de ovinos positivos, quando avaliados rebanhos naturalmente infectados. A
500 sensibilidade do teste ELISA para detecção de ovinos positivos para cultura foi de 88%,
501 enquanto sua especificidade foi de 55%. O teste foi capaz de detectar 87,5% dos ovinos que
502 tinham lesões características de LC, mas que estavam restritas apenas a órgãos internos, o que
503 indica um papel valioso do teste sorológico na detecção de animais com CLA clínico e
504 subclínico.

505 Um teste de ELISA indireto foi desenvolvido e padronizado por Carminat et al.
506 (2003), para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. Neste estudo, o secretado de
507 cultura de *C. pseudotuberculosis* foi utilizado como antígeno, além de amostras de soros de
508 caprinos que apresentavam lesões características de linfadenite caseosa, das quais o agente foi
509 isolado e amostras de soros de caprinos não infectados. A sensibilidade e a especificidade do
510 teste foram de 93,5% e 100%, respectivamente.

511 Durante a padronização de um teste de ELISA indireto para diagnóstico de caprinos
512 naturalmente infectados e não infectados, Zerbinati et al. (2007) produziram dois antígenos,
513 denominados BMD e BHI, e confrontaram seus resultados como antígenos potenciais. O
514 estudo da sensibilidade e especificidade verificadas foi de 99,8% e 98,0% para o ELISA
515 indireto BMD e valor de 98,0% para ambas as variantes, quando avaliado o teste utilizando o
516 antígeno BHI. Baseado nesses dados, o antígeno BMD demonstrou maior capacidade de
517 discriminação entre os animais com e sem a doença.

518 Solanet et al. (2011) avaliaram um teste de ELISA indireto, por meio da detecção da
519 resposta imune humoral de ovinos vacinados e/ou desafiados com uma amostra de *C.*
520 *pseudotuberculosis*. Este teste obteve sensibilidade de 98% e especificidade de 100%,
521 permitindo diferenciar animais positivos de negativos e possibilitando verificar a presença de
522 anticorpos pelo período de seis meses, além de ser considerada uma ferramenta útil para
523 diagnóstico de LC, em animais positivos em exames clínicos.

524 Em levantamento seroepidemiológico para determinação da prevalência de LC em
525 rebanhos caprinos, em Minas Gerais/Brasil, Seyffert et al. (2011) utilizaram um teste de
526 ELISA indireto e proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* como antígenos. Por meio
527 deste teste, foi possível verificar que 78,9% dos animais analisados apresentaram resultado
528 positivo para doença e 98% dos rebanhos apresentaram, pelo menos, um animal soropositivo.

529 Comercialmente, estão disponíveis “kits” de ELISA, como o *ELITEST CLA*, um
530 produto comercial da *Hyphen BioMed*, na França, que detecta anticorpos IgG específicos para
531 o agente causal da LC, em soros ovinos e caprinos. Este teste foi utilizado por Hariharan et al.
532 (2015), em Granada, em estudo de prevalência da LC em pequenos ruminantes. Habasha e Al-
533 Badrawi (2016) também fizeram uso deste kit para detectar anticorpos anti-PLD IgG, mas em
534 soros de ovinos em Bagdá e arredores. Foi verificada maior ocorrência da doença em fêmeas
535 e, quanto à faixa etária com maior número de animais diagnosticados com LC, independente
536 do sexo, foi de 3-4 anos.

537 Rebouças et al. (2013) padronizaram um teste de ELISA, utilizando como antígeno o
538 secretado de *C. pseudotuberculosis*. A sensibilidade do teste foi de 89%, enquanto a
539 especificidade, 99%, utilizando o isolamento microbiológico como padrão-ouro. Este teste foi
540 comparado à PCR multiplex e à produção de IFN- γ , sendo que quatro animais foram
541 negativos para a identificação de DNA bacteriano, mas mostraram resultados positivos nos
542 testes de ELISA e IFN- γ . Outros dois ovinos apresentaram resultados discrepantes no ELISA,
543 quando comparados às demais metodologias, sendo que um foi positivo no ELISA, mas
544 negativo nos outros ensaios, e um negativo no ELISA, porém positivo na quantificação de
545 IFN- γ e PCR.

546 Devido às dificuldades em diagnosticar e detectar LC em infecções subclínicas,
547 Ribeiro et al. (2013) descreveram o desempenho de um teste de ELISA indireto para
548 diagnóstico em ovinos assintomáticas, da Região Noroeste do Estado de São Paulo. O teste
549 apresentou sensibilidade de 88% e baixa especificidade de 31%. Além deste teste, foram
550 realizadas a cultura bacteriana e a identificação bioquímica para as amostras de animais
551 assintomáticos, mas que foram positivos no ELISA indireto para confirmação do diagnóstico
552 da LC, sendo 257 identificadas como falsos-positivos.

553 Segundo alguns autores, além do teste sorológico, ainda, é necessária a associação de
554 teste confirmatório, altamente sensível e específico (DERCKSEN et al., 2000;
555 WILLIAMSON, 2001).

556

557

558

559

560

561

562

563 1.8 OBJETIVOS

564

565 1.8.1 OBJETIVO GERAL

566

567 Avaliar o potencial da proteína recombinante XA1, recombinante de *C.*
568 *pseudotuberculosis*, como possível candidata a compor um teste sorológico do tipo ELISA
569 indireto para diagnóstico de linfadenite caseosa em ovinos e caprinos.

570

571 1.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

572

- 573 • Produzir em *Escherichia coli* e purificar a proteína recombinante XA1 de *C.*
574 *pseudotuberculosis* ;
- 575 • Padronizar um protocolo de ELISA indireto para detecção de anticorpos contra *C.*
576 *pseudotuberculosis* em soros de ovinos e caprinos, utilizando como antígeno a
577 proteína XA1;
- 578 • Contribuir com o controle da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes, por meio
579 de um teste de diagnóstico sorológico rápido, sensível e disponível.

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

REFERÊNCIAS

- 597
598
599 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. Imunidade contra microrganismos. In:
600 **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2011, p. 351–352.
601
- 602 ABREU, S. R. O. et al. Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium*
603 *pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária**
604 **Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 28, p.481-487, out. 2008.
605
- 606 ALGAMMAL, A. M. Molecular Characterization and Antibiotic Susceptibility of
607 *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated from Sheep and Goats Suffering from Caseous
608 Lymphadenitis. **Zagazig Veterinary Journal**, Egypt, v. 44, n. 1, p.1-8, jun. 2016.
- 609 ALVES, F. S. F. & OLANDER, H. J. Uso de uma vacina toxóide no controle da linfadenite
610 caseosa em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 2, n.
611 20, p.74-77, ago. 1998.
- 612 ANDRADE, J. S. L. et al. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por
613 *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido
614 paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 32, p.116-120, fev. 2012.
- 615 ANDRADE, J. S. L. et al. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por
616 *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido
617 paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 32, p.116-120, fev. 2012.
618
- 619 AYERS, J. L. . Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis,
620 pathogenesis, and immunity. **Jornal of the American Veterinary Medical**
621 **Association**, Atlanta, n. 114, p. 1251-1254, jul. 1977.
622
- 623 BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine
624 caseous lymphadenitis. **Jornal de Patologia Comparativa**, v. 137, p. 179-210, 2007.
625
- 626 BAIRD, G. J.; MALONE, F. E. Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using
627 clinical examination and regular ELISA testing. **Veterinary Record**, [s.l.], v. 166, n. 12,
628 p.358-362, 20 mar. 2010. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.b4806>.
629
- 630 BASTOS, B. L. *Corynebacterium pseudotuberculosis* : Immunological Responses in Animal
631 Models and Zoonotic Potential. **Journal Of Clinical & Cellular Immunology**, [s.l.], v. 01, n.
632 4, p.1-15, 2012. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9899.s4-005>.
633
- 634 BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian**
635 **Veterinary Journal**, v. 63, n. 9, p. 269–272, 1986.
636
- 637 BEHAR, S. M.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Evasion of innate immunity by
638 *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy?. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.],
639 p.668-674, 2 ago. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2387>.
640
- 641 BELCHIORI, S. E. et al. Diagnóstico de Pseudotuberculosis en ovinos patagónicos. **Revista**
642 **Argentina de Microbiología**, n. 39, p.44-46, jan. 2007.
643

- 644 BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes
645 from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Fems Microbiology Letters**, (208), p.41-45, jan.
646 2002.
- 647 BINNS, S. H.; GREEN, L. E.; BAYLEY, M. Development and validation of an ELISA to
648 detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. **Veterinary**
649 **Microbiology**, p. 169–179, jan. 2007.
- 650
- 651 BRASIL – **Caprinos e Ovinos**. 2016. Disponível em:
652 <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos/saiba-mais>> Acesso em:
653 16 agos. 2016.
- 654
- 655 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **REGULAMENTO DA**
656 **INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL -**
657 **RIISPOA: Inspeção "Post-Mortem"**. 1952. Disponível em:
658 <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/Regulam](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf)
659 [entoInspecaoIndustrial.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf)>. Acesso em: 19 dez. 2016.
- 660 BURRELL, D.H. Caseous lymphadenitis in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 57,
661 p.105-111, mar. 1981.
- 662
- 663 CAMARGO, E.V. et al. Isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no sêmen de um
664 carneiro na região central do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, São
665 Paulo, v. 77, n. 1, p. 139-142, mar. 2010.
- 666
- 667 CARMINATI, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA
668 indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas**
669 **e Biológicas**, Salvador, v. 2, n. 1, p. 88-93, jan./jun. 2003.
- 670
- 671 CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALEIRÓN, C. Bacteriological
672 characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small**
673 **Ruminant Research**, v. 65, n. 1-2, p.170-175, set. 2006. Elsevier BV.
674 <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.06.017>.
- 675 CHOBY, J. E. & SKAAR, E. P. Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial
676 Pathogens. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n.17, p. 3408–3428, ago. 2016.
677 doi:10.1016/j.jmb.2016.03.018.
- 678 CONNOR, K. M. et al. Characterization of United Kingdom Isolates of *Corynebacterium*
679 *pseudotuberculosis* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal Of Clinical**
680 **Microbiology**, Washington, v. 38, n. 7, p.2633-2637, jul. 2000.
- 681
- 682 COSTA, L. F. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite
683 caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 1, n. 1, p.105-
684 115, nov. 2002.
- 685 COSTA, M. P. et al. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*
686 hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced
687 by hsp60 DNA vaccination in mice. **Bmc Research Notes**, v. 2, n. 243, p.1-10, jul. 2011.
688 DOI: 10,1186 / 1756-0500-4-243.
- 689

- 690 DERCKSEN, P. D. et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous
691 lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology** v.75, p. 167-175, 2000.
692
- 693 DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* : microbiology, biochemical
694 properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2,
695 p.201-218, mar. 2006.
- 696 DORELLA, F. A. et al. Progression of ‘omics’ methodologies for understanding the
697 pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* : the brazilian
698 experience. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 6, n. 7, p.1-7,
699 mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201303013>.
700
- 701 DORNELES, E. M. S. et al. Evaluation of ERIC-PCR as Genotyping Method for
702 *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates. **Plos One**, v. 9, n. 6, p.1-10, 5 jun. 2014.
703 Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098758>.
704
- 705 DORNELES, E.M.S. et al. Molecular characterization of *Corynebacterium*
706 *pseudotuberculosis* isolated from goats using ERIC-PCR. **Genetics And Molecular**
707 **Research**, v. 3, n. 11, p.2051-2059, ago. 2012.
708
- 709 ECKERSALL, P. D. et al. Acute phase protein response in an experimental model of ovine
710 caseous lymphadenitis. **Bmc Veterinary Research**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-6, 2007.
- 711 EMBRAPA CNPC. **Linfadenite Caseosa: o Estado da Arte**. 74. Sobral: 2007, 59p.
712
- 713 EMBRAPA CNPC. **Linfadenite Caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e**
714 **controle**. 113. Sobral: 2014, 71 p.
715
- 716 EMBRAPA CNPC. **Linfadenite Caseosa: Patogenia, Diagnóstico e Controle**. 27. Sobral:
717 1997, 16 p.
- 718 FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations. 2014. Disponível em:
719 <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 29 dez. 2016.
720
- 721 FONTAINE, M. C. & BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis, **Small Ruminant Research**.
722 v.76), p.42-48, 2008. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.025>
723
- 724 FUKISHIMA et al., Direct Evidence of Iron Uptake by the Gram-Positive Siderophore-
725 Shuttle Mechanism without Iron Reduction. **ACS Chemical Biology**. v. 9, n9, p. 2092–2100
726 sep. 2014. dx.doi.org/10.1021/cb500319n.
- 727
- 728 GLANVAC. **Agora você conta com uma vacina feita exclusivamente para ovinos e**
729 **caprinos, à altura da qualidade de sua criação**. 2016. Disponível em:
730 <<http://www.glanvac.com.br/bula.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2016.
731
- 732 GOULART, D. F. & FAVERO, L. A. A cadeia produtiva da ovinocaprinocultura de leite na
733 região central do Rio Grande do Norte: estrutura, gargalos e vantagens competitivas. **Revista**
734 **em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.4, n.1, p. 21-36, jan./abr. 2011.
735

- 736
737 GUIMARÃES, A. S. et al. Caseous Lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and
738 control. **The Iioab Journal**, Iioab-india, v. 2, n. 2, p.33-43, jan. 2011.
- 739 GUIMARÃES, A. S. et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **The**
740 **Iioab Journal**, India, v. 2, n. 1, p.33-44, jan. 2011.
741
- 742 HABASHA, F. G.; AL-BADRAWI. Serological detection of caseous lymphadenitis in sheep
743 using elisa in and outside Baghdad. **Basrah journal of veterinary research**, v. 15, n. 4, mai.
744 2016.
745
- 746 HASSAN, S. S. et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*
747 biovar ovis strain P54B96 isolated from antelope in South Africa obtained by rapid next
748 generation sequencing technology. **Standards In Genomic Sciences**, Michigan, v. 7, n. 2,
749 p.189-199, 15 dez. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.4056/sigs.3066455>.
- 750
751 HARIHARAN, H. et al. Serological Detection of Caseous Lymphadenitis in Sheep and Goats
752 Using a Commercial ELISA in Grenada, West Indies. **International Journal of Veterinary**
753 **Medicine: Research & Reports**, v. 2015, 2015. Doi: 10.5171/2015.473459.
- 754
755 HERNÁNDEZ-LEÓN, F. et al. Identification and molecular characterization of
756 *Corynebacterium xerosis* isolated from a sheep cutaneous abscess: first case report in
757 Mexico. **Bmc Research Notes**, v. 9, n. 1, p.1-6, 22 jul. 2016. Springer Nature.
758 <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-016-2170-8>.
- 759
760 IBGE. **Produção da Pecuária Municipal - 2014. Efetivo dos rebanhos em 31.12 e**
761 **variação anual, segundo as categorias - Brasil - 2015-2015**. Disponível em:
762 <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default_xls_brasil.shtm>.
763 Acesso em: 16 jan. 2016.
764
- 765 JEBER, Z. K. H. et al. Influence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on level
766 of acute phase proteins in goats. **Bmc Veterinary Research**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 1-5, 9 mar.
767 2016. Springer Nature. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0675-y>>.
768 Acesso em: 13 dez. 2016.
769
- 770 JESUS JUNIOR, C.; RODRIGUES, L. S.; MORAES, V. E. G. **Ovinocaprinocultura de**
771 **corte - a convivência dos extremos**. 2010. Disponível em:
772 <[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhe](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3108.pdf)
773 [cimento/bnset/set3108.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3108.pdf)>. Acesso em: 13 dez. 2016.
774
- 775 JOLLY, R. D. Experimental infection of convalescent mice with *Corynebacterium ovis*. **New**
776 **Zealand Veterinary Journal**, v. 13, n. 6, p. 48-153, 1965.
777
- 778 KHAMIS, Atieh. Comparison between rpoB and 16S rRNA Gene Sequencing for Molecular
779 Identification of 168 Clinical Isolates of *Corynebacterium*. **Journal Of Clinical**
780 **Microbiology**, v. 43, n. 4, p.1934-1936, abr. 2005.
781

- 782 LABOVET. **Vacina 1002 contra linfadenite caseosa**. 2016. Disponível em:
783 <<http://labovet.com.br/produtos/vacina-1002-contralinfadenite-caseosa/>>. Acesso em: 12
784 dez. 2016.
- 785
786 LAN, D. T. B. et al. Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the
787 development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis*
788 infection in mice. **Journal Veterinary Medical Sciences**, v. 61, p. 1203–1208, 1999.
789
- 790 LEON-SICAIROS et al. Strategies of Intracellular Pathogens for Obtaining Iron from the
791 Environment. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-17, 2015.
792 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/476534>.
- 793
794 LUCAS, R. P. et al. Linfadenite caseosa em ovinos - revisão de literatura. **Revista Científica**
795 **Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 12, p.1-7, jan. 2009.
- 796
797 MALONE, F. E. et al. A serological investigation of caseous lymphadenitis in four flocks of
798 sheep. **Irish Veterinary Journal**, 59 (1), p. 19-21, jan. 2006.
- 799
800 MARKEY, B. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Elsevier, 2012. 902 p
801
- 802 MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Expression of phospholipase D, the major
803 virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple
804 environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology**, p.2203-2211,
805 mar. 2007.
- 806
807 MEYER, R. et al. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with
808 somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary**
809 **Immunology And Immunopathology**, [s.l.], v. 107, n. 3-4, p.249-254, set. 2005. Elsevier
810 BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.05.002>.
- 811
812 MOTTA, R.; CREMASCO, A. C. M.; RIBEIRO, M. G. Infecções por *Corynebacterium*
813 *pseudotuberculosis* em animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 2, n. 17,
814 p.200-213, jun. 2010.
- 815
816 NASSAR, A. F. C. et al. Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis*
817 through microbiological culture and PCR in sheep samples. **Arquivos do Instituto**
818 **Biológico**, [s.l.], v. 82, p.1-6, mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO).
819 <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000692013>.
- 820
821 NETO, A. D. B. Posicionamento estratégico do setor de carnes de caprinos e ovinos no
822 mercado de carnes brasileiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, n.4,
823 p.81-85, dez. 2010.
- 824
825 NEVES, L. F. M. **Carne ovina: cortes e mercado em Belo Horizonte - MG. Parte I de**
826 **II**. 2015. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/carne-ovina-cortes-e-mercado-em-belo-horizonte-mg-parte-i-de-ii-94867n.aspx>>.
827 Acesso em: 11 ago. 2016.
828

- 829 OLIVEIRA, A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be under anagenesis and
830 biovar Equi forms biovar Ovis: a phylogenetic inference from sequence and structural
831 analysis. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-11, 2 jun. 2016. Springer Nature.
832 <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0717-4>
- 833 PACHECO, L. G. C. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium*
834 *pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical
835 samples. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 56, n. 4, p.480-486, 1 abr. 2007.
836 Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46997-0>.
837
- 838 PALMER, L. D. & SKAAR, E. P. Transition Metals and Virulence in Bacteria Lauren D.
839 **Annual Review of Genetics**. v.23 n. 50 p.67–91, nov. 2016 doi:10.1146/annurev-genet-
840 120215-035146.
- 841
- 842 PAVAN, M.E. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep by
843 PCR-restriction analysis using the RNA polymerase β -subunit gene (rpoB). **Research In**
844 **Veterinary Science**, v. 92, n. 2, p.202-206, abr. 2012. Elsevier BV.
845 <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.007>.
846
- 847 PINHEIRO, R.R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo**
848 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 5, p.534-543,
849 out. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352000000500021>.
- 850 QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1.ed. Artemed
851 Editora S.A: Porto Alegre, p. 67-70, 2005.
- 852 RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas por
853 Bactérias. In: **Clínica veterinária - Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos,**
854 **caprinos e eqüinos**. 9.ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p.653-656, 2002.
- 855 RAMLAN M. et al. A comparison for thtection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in
856 sheep na goats between elisa teste and agar gel immunodiffusion. **Malaysian Jornal of**
857 **Veterinary Research**, v. 1, n. 1, p. 9-18, jul. 2010.
858
- 859 REBOUÇAS, M. F. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium*
860 *pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as
861 antigen. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(11) , p. 1296-1302, nov. 2013.
- 862 RIBEIRO, D. et al. An iron-acquisition-deficient mutant of *Corynebacterium*
863 *pseudotuberculosis* efficiently protects mice against challenge. **Veterinary Research**, [s.l.],
864 v. 45, n. 1, p.28-0, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-45-28>.
- 865 RIBEIRO, M. G. et al. Citologia aspirativa no diagnóstico da linfadenite em ovinos. **Pesquisa**
866 **Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 31, p.839-843, out. 2011. 839-843, Out.
867 2011.
868
- 869 RIBEIRO, M.G. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *corynebacterium*
870 *pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São
871 Paulo, v.68, n.1, p.23-28, jan./jun. 2001.

- 872 RUIZ, J. N. C. et al. Evidência de evolução do genoma redutor e aquisição lateral de funções
873 de virulência em duas cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* . **Plos One**, Califórnia,
874 v. 4, n. 6, abr. 2011. Doi: 10.1371 / journal.pone.0018551
- 875 SÁ, M. C.A. et al. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium*
876 *pseudotuberculosis* . **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 11, p. 1319-
877 1324, nov. 2013a.
- 878
879 SÁ, M. C. A. et al. Distribution of *PLD* and *FagA*, *B*, *C* and *D* genes in *Corynebacterium*
880 *pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics And**
881 **Molecular Biology**, v. 2, n. 36, p.265-268, fev. 2013b.
- 882
883 SANCHES, B. G.S. et al. Fagocitose intensificada de *Corynebacterium pseudotuberculosis*
884 por células da série monócito-macrófago de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da
885 artrite encefalite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 12, n.32, p.1225-1229,
886 dez. 2012.
- 887
888 SANTANA-JORGE, K. T. O. et al. Putative virulence factors of *Corynebacterium*
889 *pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microbial Cell**
890 **Factories**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-13, 16 maio 2016. Springer Nature.
891 <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-016-0479-6>.
- 892
893 SANTOS JÚNIOR, M. I.; GOMES, A.A.B. Determinação do Estresse Osmótico do
894 *Corynebacterium pseudotuberculosis* , Agente Etiológico da Linfadenite Caseosa. **Revista**
895 **Científica de Produção Animal**, v. 14, n. 1, p.5-8, jun. 2012.
- 896
897 SANTOS, Eliane Macedo Sobrinho et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*
898 with promising potential for caseous lymphadenitis vaccine development: a literature
899 review. **Caderno de Ciências Agrárias**, Montes Claros, v. 8, n. 2, p.90-96, mai-ago. 2016.
- 900
901 SCHREUDER, B. E.; TER LAACK, E. A.; DERCKSEN, D. P. Erradication of caseous
902 lymphadenitis in sheep with the help of newly development ELISA technique. **Veterinary**
903 **Record**, v. 135, p. 174-176, 1994.
- 904
905 SEYFFERT, N. et al. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds
906 revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research**
907 **In Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p.50-55, fev. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.07.002>.
- 908
909 SHIGIDI, M. T. A. A comparison of five serological tests for diagnosis of experimental
910 *Corynebacterium ovis* infection in sheep. **Brazilian Veterinary Jornal**, v. 135, p. 172-177,
911 1979.
- 912
913 SILVA, C. Cytotoxic T cells and mycobacteria. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 197, n.
914 1, p.11-18, 1 abr. 2001. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(01)00099-4)
915 [1097\(01\)00099-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(01)00099-4).
- 916
917 SILVA, W. M. et al. Label-free proteomic analysis to confirm the predicted proteome of
918 *Corynebacterium pseudotuberculosis* under nitrosative stress mediated by nitric oxide. **Bmc**
919 **Genomics**, v. 15, dez. 2014. Doi: 10.1186 / 1471-2164-15-1065.

- 920 SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA - SNA. **Produção de carne ovina pode**
921 **ser mais rentável que a bovina.** 2015. Disponível em: <[http://sna.agr.br/producao-de-carne-](http://sna.agr.br/producao-de-carne-ovina-pode-ser-mais-rentavel-que-a-bovina/)
922 [ovina-pode-ser-mais-rentavel-que-a-bovina/](http://sna.agr.br/producao-de-carne-ovina-pode-ser-mais-rentavel-que-a-bovina/)>. Acesso em: 11 ago. 2016.
923
- 924 SOLANET, J. J. et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **Revista**
925 **Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 43, n. 1, p.9-17, mar. 2011.
- 926 SOUSA, W. H. O agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. **Tecnologia & Ciência**
927 **Agropecuária**, João Pessoa, v.1, n.1, p.51-58, set. 2007
- 928 SOUZA, M. F. et al. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da
929 Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 31, p.224-230, mar. 2011.
- 930 TORRES, L. F. C. et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the
931 toxigenicity of *Corynebacterium spp* with zoonotic potential and an overview of human and
932 animal infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p.272-
933 279, mai. 2013.
934
- 935 VALE, V. et al. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente
936 infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* . **Revista de Ciências**
937 **Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 2, n. 2, p.192-200, dez. 2003.
938
- 939 VALE, V. L. C. et al. Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and
940 somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune
941 response against a *C. pseudotuberculosis* strain. **Bmc Veterinary Research**, [s.l.], v. 12, n. 1,
942 p.2-8, 8 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0811-8>.
943
- 944 VENCOFARMA. **LinfoVac**. 2016. Disponível em: <[http://www.vencofarma.com.br/produto-](http://www.vencofarma.com.br/produto-detalhe/105/linfovac.)
945 [detalhe/105/linfovac.](http://www.vencofarma.com.br/produto-detalhe/105/linfovac.)>. Acesso em: 12 dez. 2016.
946
- 947 VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista**
948 **Ovinos**, Porto Alegre, v. 4, n. 12, mar.2008.
949
- 950 VIANA, J. G. A.; SILVEIRA, V. C. P. Análise econômica da ovinocultura: estudo de caso na
951 Metade Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1187-
952 1192, jul. 2009.
953
- 954 VOSKUIL, M. I. et al. The Response of *Mycobacterium tuberculosis* to Reactive Oxygen
955 and Nitrogen Species. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 2, p.1-6, 2011. Frontiers Media
956 SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00105>.
957
- 958 WATANABE, H. et al. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains.
959 **Shock** v. 22, n.5, p. 460–466, nov. 2004.
960
- 961 WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Update on Small**
962 **Ruminant Medicine**, v.17, n.1, 359-371, 2001.
963
- 964 ZAVOSHTI, F. R. et al. Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in
965 an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. **Comparative**

- 966 **Clinical Pathology**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.667-671, jan. 2011. Springer Nature.
967 <http://dx.doi.org/10.1007/s00580-010-1154-7>.
- 968 ZAVOSHTI, F. R. et al. Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in
969 an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. **Comparative**
970 **Clinical Pathology**, v. 21, n. 5, p.667-671, 6 jan. 2011. Springer Nature.
971 <http://dx.doi.org/10.1007/s00580-010-1154-7>.
972
- 973 ZERBINATI, J. et al. Produção e padronização de um antígeno para um teste elisa indireto no
974 diagnóstico da linfadenite caseosa em soros caprinos. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 3,
975 p. 285-293, jul./set. 2007.
976
- 977 YOZWIAK, M. L; & SONGER, J. G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis*
978 phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. **American**
979 **Journal Veterinary Research**, n. 54, p. 392-397, 1993.
980

981 **MANUSCRITO 1: Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**

982

983 **DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) INDIRETO NA**
984 **DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI – *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM**
985 **OVINOS**

986

987 Aline Najara. D. Gonçalves¹, Cleber E. Galvão², Fernando Alvarenga Reis², Patrícia Yoshida
988 F. Martins³, Grácia Maria S. Rosinha^{2*}

989

990 ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do
991 Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Famez), Campo Grande/MS, Av.
992 Senador Felinto Muller, 2443, CEP: 79070-900, Brasil. E-mail:
993 aline.ndgoncalves@gmail.com.

994 ² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia,
995 830 - Vila Popular, Campo Grande/MS, 79002-970, Brasil.

996 ³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três
997 Lagoas, Estrada Sobral/Groáíras, Km 4, Sobral, CEP: 62010-970, Brasil.

998

999

1000 **RESUMO** - Gonçalves, A. N. D., Santos, L. R., Soares, C. O., Reis, F. A., Galvão, C. E. &
1001 Rosinha, G. M. S. 2016. [**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO**
1002 **(ELISA) INDIRETO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANT – *Corynebacterium***
1003 ***pseudotuberculosis* EM OVINOS.**] *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Embrapa Gado de
1004 Corte, Av. Rádio Maia, 830 - Vila Popular, Campo Grande, MS, 79002-970, Brasil.
1005 E-mail: gracia.rosinha@embrapa.br.

1006 A doença infectocontagiosa linfadenite caseosa afeta, principalmente, caprinos e
1007 ovinos e é caracterizada por abscessos nos linfonodos e em órgãos internos. Seu agente
1008 etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Entre os fatores de virulência
1009 desta bactéria está o operon *xa*, onde se localiza o gene *xaI*, responsável pela aquisição
1010 extracelular de ferro e por sintetizar a proteína XA1. Objetivou-se, neste estudo, verificar o
1011 potencial da proteína XA1r como antígeno para compor um teste sorológico do tipo ELISA
1012 indireto, para diagnóstico de linfadenite caseosa em ovinos. O ponto de corte foi estabelecido
1013 pela curva *ROC* em 0,299. O teste de ELISA foi capaz de discriminar animais positivos e
1014 negativos, com sensibilidade de 90,9% e especificidade de 72,2%. O teste identificou cinco

1015 animais como falso-positivos e três foram considerados falso-negativos. Quando testados os
1016 animais dos três grupos - testes assintomáticos, histórico de LC e controle sistemático -,
1017 90,7% foi considerado positivo para LC. Estes resultados demonstram a potencialidade da
1018 proteína XA1r, quando utilizada como antígeno em teste ELISA indireto. Deste modo, este
1019 imunoenensaio pode ser utilizado para o diagnóstico de ovinos com LC, auxiliando no controle
1020 da doença.

1021

1022 Termos de indexação: Ovinos, Sorologia, Elisa, Diagnóstico Subclínico, Linfadenite Caseosa.

1023

1024

1025

INTRODUÇÃO

1026

1027 A linfadenite caseosa (LC) é uma doença crônica que afeta, sobretudo, ovinos e
1028 caprinos (AYERS, 1977; SÁ et al., 2013a), já relatada também em cavalos, lhamas, alpacas,
1029 búfalos, veados, camelos (Zavoshti et al., 2012) e, ocasionalmente, em bovinos e humanos
1030 (CAMARGO et al. 2010). Seu agente etiológico é o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um
1031 bacilo gram-positivo, pleomórfico, aeróbio, imóvel e não esporulado (Euzéby; Guérin-
1032 Faublée, 2000; Oliveira et al., 2016).

1033 Em sua forma superficial, esta enfermidade é caracterizada por produzir lesões
1034 crônicas de aspecto caseoso e purulento, observadas principalmente em linfonodos
1035 superficiais (Santos Júnior et al., 2012), como o submandibular, parotídeo e pré-escapular.
1036 Quanto à forma visceral, os abscessos são encontrados em órgãos internos, como pulmões,
1037 fígado e rins, sendo que estas duas formas podem coexistir (Eckersall et al., 2007; Guimarães
1038 et al., 2011). A presença de nódulos linfáticos externos e internos acarreta prejuízos
1039 econômicos, devido à dificuldade dos animais em executar funções simples, como pastejo,
1040 reprodução e produção leiteira, além da condenação de carcaças em abatedouros e a
1041 depreciação da pele (Solanet et al., 2011).

1042 O diagnóstico da LC é baseado na avaliação clínica, na qual se visualiza a presença de
1043 abscessos nos linfonodos superficiais do animal (Baird; Malone, 2010). O teste padrão ouro é
1044 o isolamento do agente causador da doença, a partir do material caseoso drenado dos
1045 abscessos, seguido de testes bioquímicos (Nassar et al., 2014). No entanto, a infecção
1046 subclínica e/ou identificação de animais com abscessos internos requerem esforços para
1047 detectar e controlar a doença, lançando o desafio de diagnosticar esta enfermidade em animais
1048 assintomáticos, pois estes são fonte de infecção para ovinos saudáveis (REBOUÇAS et al.,
1049 2013).

1050 Diferentes métodos de diagnósticos sorológicos têm sido utilizados diagnosticar LC
1051 em pequenos ruminantes, como soroneutralização, imunodifusão em gel de ágar,
1052 hemaglutinação indireta, fixação de complemento e o ensaio de Imunoadsorção enzimática
1053 (ELISA) (RIBEIRO et al., 2011). O teste de ELISA indireto para a detecção de anticorpos
1054 contra proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis*, quando associado a exames clínicos, é
1055 capaz de identificar a maioria dos animais infectados (REBOUÇAS et al., 2013)

1056 O Laboratório de Engenharia Genética Animal, situado na Embrapa Gado de Corte,
1057 selecionou a proteína XA1, por meio da técnica de imunovarredura de uma biblioteca de
1058 expressão de *C. pseudotuberculosis* (dados submetidos à publicação). O gene *xal* está
1059 inserido no operon *xal*, que é responsável pela aquisição extracelular de ferro, o que auxilia a
1060 sobrevivência de *C. pseudotuberculosis* em ambientes hostis. A proteína XA1 é codificada
1061 por este gene e faz parte do sistema de transporte da membrana citoplasmática, para captação
1062 de ferro-sideróforos da superfamília dos transportadores ABC (BILLINGTON et al., 2002;
1063 SÁ et al., 2013b).

1064 Tendo em vista a necessidade de um teste de diagnóstico rápido e sensível para
1065 linfadenite caseosa em ovinos, objetivou-se, neste estudo, verificar o potencial da proteína
1066 XA1r como antígeno, em um teste sorológico do tipo ELISA indireto.

1067

1068 MATERIAL E MÉTODOS

1069

1070 Amostras de soro

1071

1072 Para o teste de Elisa indireto, foram utilizadas 94 amostras de soros de ovinos de raças
1073 e idades variadas. As amostras foram agrupadas, conforme seus *status* em: Positivas
1074 (identificação microbiológica e bioquímica de *C. pseudotuberculosis*); Negativas (animais
1075 sem manifestação clínica, pertencentes a um rebanho sem histórico da doença); Controle
1076 Sistemático (provenientes de uma propriedade que mantém exames clínicos periódicos e
1077 utiliza técnicas de manejo para o controle da LC); Assintomáticos (animais sem alterações
1078 palpáveis dos linfonodos); e Histórico de LC (animais que conviviam no mesmo ambiente,
1079 pasto, piquete ou baía com outros que possuíam histórico de LC) (Quadro 1). O projeto para o
1080 desenvolvimento desta pesquisa foi submetido, avaliado e aprovado pela Comissão de Ética
1081 no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, sendo
1082 certificado com o registro n.º 749/2016.

1083

1084 **Tabela 1. Amostras de soros utilizadas para compor o teste de Elisa Indireto**

Amostras (Status)	Quantidade (N)
Positivos	33
Negativos	18
Controle Sistemático	23
Assintomáticos	10
Histórico de LC	10
Total	94

1085

1086 **Caracterização microbiológica e bioquímica de *Corynebacterium pseudotuberculosis***

1087

1088 Amostras de material purulento de abscessos, localizados em linfonodos
 1089 submandibulares e/ou pré-escapulares de 33 ovinos, foram assepticamente coletadas e
 1090 cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) Agar, enriquecido com 5% de sangue ovino.
 1091 A confirmação do agente foi realizada pelas características morfológicas das colônias
 1092 isoladas, presença de hemólise, coloração de gram e testes bioquímicos de redução de nitrato,
 1093 hidrólise de esculina, fermentação de glicose, maltose e sucrose, de acordo com Markey et al.
 1094 (2013).

1095

1096 **Produção da Proteína XA1 recombinante (XA1r)**

1097

1098 Uma região da sequência do gene *xa1*, que codifica a porção hidrofílica da proteína
 1099 XA1, foi selecionada com o auxílio do programa *Protean* - DNASTAR[®]. A clonagem desta
 1100 em plasmídeo de expressão gênica foi sinteticamente confeccionada pela empresa de
 1101 biotecnologia Genone *Biotechnologies*. O plasmídeo recombinante pET47b*xa1* foi inserido
 1102 em *E. coli* da linhagem TOP10 F', quimicamente competente para obtenção de estoque e
 1103 cultivo. Foi realizada a cultura da cepa, estoque para extração e purificação do plasmídeo
 1104 pET47b*xa1* com o kit *Wizard miniprep*[™] (Promega[®]), seguindo as orientações do fabricante.
 1105 O plasmídeo pET47b*xa1* foi introduzido em célula quimicamente competente *E. coli* Rosetta-
 1106 Gami para a indução da expressão gênica, que foi realizada com IPTG a 1mM, por incubação
 1107 a 28°C, durante quatro horas sob agitação de 200 RPM. A indução da XA1r foi verificada por
 1108 eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%, corado com azul brilhante de Comassie
 1109 e *Western blot* com *poly-Histidine monoclonal antibody* (Sigma-Aldrich[®]). A XA1r foi
 1110 purificada por cromatografia de afinidade, em resina metálica com a coluna de agarose níquel
 1111 *His trap HP* (GE Healthcare[®]), de acordo com as instruções do fabricante. Após, foi realizada
 1112 a diálise contra PBS 1X (pH 7,2) durante 72 horas, 4°C e feita a avaliação da purificação em

1113 gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%. A proteína purificada foi quantificada pelo método
1114 descrito por Lowry (1951) e estocada a -20°C.

1115

1116 **ELISA indireto com a proteína XA1r**

1117

1118 O teste foi padronizado, a fim de se estabelecer as melhores condições para a
1119 diferenciação entre soro positivo e negativo, sendo todos os componentes do ensaio testados,
1120 ao mesmo instante e sob as mesmas circunstâncias. A padronização dos reagentes e a
1121 condução dos ensaios foram realizadas em placas de poliestireno de fundo chato, contendo 96
1122 cavidades (Costar 3590). O antígeno utilizado foi a proteína XA1r, diluída seriadamente
1123 (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600, 1:3.200, 1:6.400, 1:12.800, 1:25.600, 1:51.200 e
1124 1:102.400) e titulada frente às diluições 1:50, 1:100, 1:400, 1:800, 1:1.600 e 1:3.200 dos
1125 soros. Como controle positivo, foi utilizada amostra de soro de um animal confirmado com
1126 linfadenite caseosa, por meio de isolamento microbiológico e teste bioquímico; e, como
1127 controle negativo, um soro proveniente de animal de uma área não endêmica e que não
1128 apresentava sinais clínicos da doença. Esses mesmos soros foram utilizados em todos os
1129 ensaios, com o intuito de garantir a repetibilidade e confiabilidade dos resultados obtidos. O
1130 conjugado *Monoclonal Anti-Goat/Sheep IgG-peroxidase* (Sigma-Aldrich, USA) foi titulado
1131 frente aos soros e ao antígeno nas diluições 1:10.000, 1:20.000 e 1:30.000.

1132 O antígeno foi diluído em tampão carbonato bicarbonato a 0,05M, pH 9,6 e incubado a
1133 4°C, durante 16-18 horas, em câmara úmida. Após quatro lavagens com solução salina
1134 tamponada com fosfato – PBS 1X, contendo 0,05% de Tween-20 (PBST), as placas foram
1135 bloqueadas com 200 µL/poço com PBST, contendo leite desnatado a 5% e incubadas a 37°C
1136 durante uma hora. As mesmas foram lavadas, novamente, por quatro vezes com PBST e
1137 acrescentados 100 µL dos soros testes já diluídos em PBST, contendo 1% de leite desnatado,
1138 por uma hora. Após serem incubadas, mais uma vez, a 37°C, pelo período de uma hora, foram
1139 realizadas quatro lavagens e 100 µL do conjugado *Anti-goat/sheep peroxidase* já diluído em
1140 PBST, em leite desnatado a 1%, distribuído em todos os poços. Após quatro novas lavagens
1141 com PBST, foram aplicados 95 µL/poço da solução reveladora Orto-fenilenediamina (OPD)
1142 (Sigma-Aldrich), diluídos conforme as instruções do fabricante. As placas foram incubadas,
1143 durante 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, para que ocorresse a reação
1144 colorimétrica, sendo esta interrompida, acrescentando-se 50 µL/poço de solução de ácido
1145 sulfúrico (H₂SO₄) 3M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (*Microplate Reader BIO-*
1146 *RAD Model 550*), usando-se filtro de 490 nm.

1147 **Análise Estatística**

1148

1149 A definição do ponto de corte foi feita por meio da curva ROC (*Receiver Operator*
1150 *Characteristic*), utilizando o software MedCalc® versão 17. Os cálculos da sensibilidade e
1151 especificidade foram realizados utilizando-se resultados de 51 soros (33 positivos e 18
1152 negativos) ao teste de ELISA indireto, tendo como teste padrão ouro o isolamento e
1153 identificação de *C. pseudotuberculosis*, a partir de abscessos e calculadas com 95% de
1154 intervalo de confiança.

1155

1156

RESULTADOS

1157

1158

1159 A indução proteína XA1r foi confirmada pela eletroforese em gel de SDS-PAGE. Foi
1160 possível observá-la com, aproximadamente, 21 Kilodaltons (kDa). No *Western blot*, a
1161 proteína recombinante foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-histidina.

1162

1163 As interpretações para os testes bioquímicos, realizados a partir do material isolado
1164 dos abscessos, caracterizaram o agente *Corynebacterium pseudotuberculosis*, gram-positivo,
1165 apresentando β -hemólise, positivo quanto à fermentação de glicose e maltose e negativo para
1166 sucrose e hidrólise da esculina.

1166

1167 Na padronização do Elisa Indireto, os melhores resultados obtidos foram 1:400 a
1168 diluição do antígeno, 1:50 a diluição dos soros e 1:30.000 a diluição do conjugado.

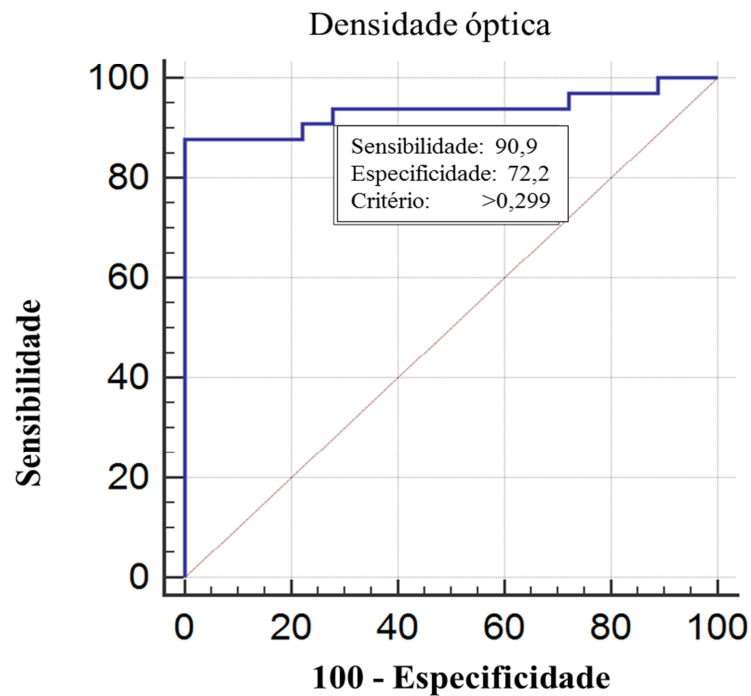
1168

1169 Para minimizar as variações intraensaio foram observados coeficientes de variação
1170 (CV) menores que 10% e interplacas inferiores a 15%. Os valores de Densidade óptica (DO)
1171 para o teste de Elisa tiveram variação de 0,200 a 1,771 para animais positivos e 0,192 a 0,341
1172 para os negativos.

1172

1173 A curva ROC utilizada para determinação do ponto de corte do teste está representada
1174 na Figura 1. Esta curva apresenta a sensibilidade, em função da proporção de falsos positivos
1175 (100 - especificidade). O ponto de corte definido em $DO = 0,299$ foi considerado como a
1176 melhor otimização possível dos valores de sensibilidade e especificidade do teste de ELISA
1177 indireto em questão. Neste ponto, a sensibilidade e a especificidade do ensaio foram de 90,9
1178 (Intervalo de confiança de 75,7-98,1%) e 72,22% (Intervalo de confiança de 46,5-90,3%),
1179 respectivamente.

1179



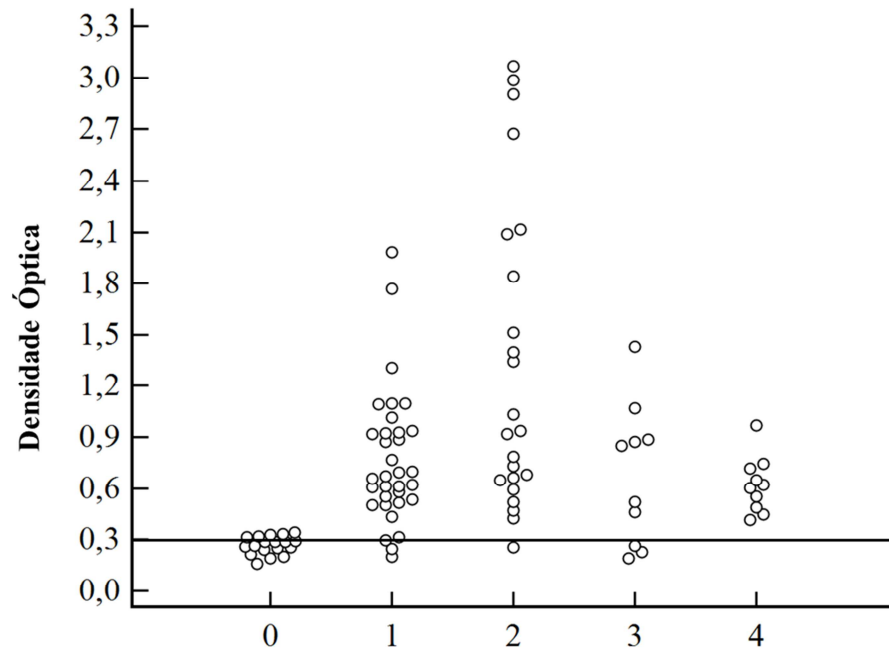
1180 Fig. 1. Curva ROC expressando os resultados de sensibilidade e especificidade (100-
1181 especificidade) para Elisa Indireto, utilizando como antígeno a proteína XA1r de *C.*
1182 *pseudotuberculosis*.
1183

1184
1185 O teste de ELISA indireto foi capaz de identificar 30/33 animais que tiveram
1186 diagnóstico positivo para linfadenite caseosa no teste padrão ouro e 13/18 ovinos negativos.
1187 Quando testadas as 94 amostras do banco de soro pelo ELISA, 74 foram diagnosticadas como
1188 soropositivas para LC, representando uma taxa de 78,72%.

1189 Em relação aos grupos testes, foram observados os seguintes resultados no ensaio de
1190 ELISA: entre os animais que faziam parte de um rebanho com histórico de LC, mas não
1191 apresentavam sinal clínico, 70% (7/10) foram diagnosticados como positivos e os outros 30%
1192 negativos, enquanto que 100% dos ovinos classificados como assintomáticos, após realização
1193 de exames clínicos, foram tidos como positivos para a doença. No grupo controle sistemático,
1194 apesar da propriedade ter adotado medidas de manejo para o controle da LC, apenas um único
1195 animal foi tido como negativo para linfadenite caseosa. Na figura 2, estão representadas as
1196 médias dos valores de Densidade Óptica (DO), obtidas no ELISA para todos os grupos
1197 testados.

1198

Distribuição dos resultados em Densidade Óptica obtidos no teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* em ovinos



1219 **Tabela 2. Parâmetros utilizados para a validação de teste de ELISA indireto com**
 1220 **a identificação de anticorpos específicos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*.**
 1221 **Isolamento de *C. pseudotuberculosis* foi utilizado como padrão-ouro para amostras**
 1222 **positivas e diagnóstico molecular para as negativas**

1223

Parâmetro	Resultado
Soros testados	51
Soros verdadeiros positivos	33
Soros verdadeiros negativos	18
Falso – positivo	5
Falso – negativo	3
Ponto de Corte	0,299
Sensibilidade (%)	90,9
Especificidade (%)	72,2

1224

1225

1226

DISCUSSÃO

1227

1228

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245

1246

A criação de ovinos vem ganhando espaço no agronegócio brasileiro e, assim, criando novas oportunidades no mercado nacional de produtos de origem animal. No entanto, o acometimento do rebanho por enfermidades contagiosas, que são disseminadas, sobretudo, devido ao manejo inadequado em relação à sanidade dos animais, são as principais causas de prejuízos na criação desses pequenos ruminantes. Entre essas doenças, está a linfadenite caseosa, uma importante enfermidade que afeta ovinos e caprinos (Moura-Costa et al., 2008).

O diagnóstico padrão ouro para LC é a cultura, mas esta possui a desvantagem de estar relacionada com a presença de microrganismos oportunistas, que crescem mais rápido no meio e podem impedir que *C. pseudotuberculosis* seja detectada, como *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp. (NASSAR et al., 2016). Outros fatores que dificultam o diagnóstico ouro e podem torná-lo pouco possível, são as lesões crônicas externas, contendo poucos microrganismos viáveis, e as lesões viscerais que são constatadas somente após o abate do animal (Ribeiro et al., 2013).

Testes de diagnóstico baseados em ELISA têm sido desenvolvidos com o objetivo de detectar, de maneira eficaz, a LC, principalmente nos casos assintomáticos. Muitos desses testes, geralmente, utilizam vários antígenos da bactéria como componentes da parede celular, exotoxina (PLD) e exotoxina recombinante (Chirino-Zárraga et al., 2009; Carminat et al., 2003; Rebouças et al., 2013; Hariharan et al., 2015).

1247 Neste estudo, utilizou-se a proteína de membrana XA1r, selecionada por meio da
1248 técnica de imunovarredura. Esta proteína é sintetizada pelo gene *xal*, que representa um
1249 importante fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*, por seu papel na aquisição
1250 extracelular de ferro, o que auxilia a bactéria em sua sobrevivência em ambientes hostis
1251 (Dorella et al., 2006; SÁ et al., 2013b).

1252 Sabe-se que sensibilidade é a capacidade de um teste em discriminar, dentre os
1253 suspeitos de uma patologia, aqueles efetivamente infectados, enquanto a especificidade, por
1254 sua vez, é a capacidade que o mesmo teste possui de identificar com segurança os não
1255 infectados, em face de uma amostra de indivíduos que sabidamente não têm a doença em
1256 questão (Guimarães, 1985). O teste apresentou valor de sensibilidade (90,9%) superior ao de
1257 especificidade (72,2%), ou seja, o teste proposto é capaz de detectar um grande número de
1258 animais verdadeiramente positivos.

1259 Outros testes de diagnóstico baseados em ELISA foram desenvolvidos, utilizando
1260 antígenos secretados, obtendo diferentes valores de sensibilidade. Kaba et al. (2001)
1261 encontraram valor de sensibilidade de 85%, Solanet et al. (2011) reportaram 98% e Rebouças
1262 et al., 89%. Alguns fizeram uso da exotoxina PLD, como o testes avaliados por Dercksen et
1263 al. (2000), que relataram sensibilidade de $79\pm 5\%$ e Malone et al. (2006) 88%. Outro ELISA,
1264 mas utilizando antígenos de *C. pseudotuberculosis* obtidos por sonicação do cultivo,
1265 apresentou 83% (Binns et al., 2007).

1266 Paule et al. (2003) conduziram um estudo para avaliar a resposta imune humoral, a
1267 partir de infecção experimental por *C. pseudotuberculosis* em caprinos, e foi possível detectar
1268 títulos de anticorpos positivos contra a *C. pseudotuberculosis*, entre o dia 6 e 11 após a
1269 infecção, quando não há a presença de sinais clínicos. Isto pode explicar o fato de todos os
1270 animais classificados como assintomáticos, neste estudo, serem positivos no teste de ELISA e
1271 não apresentarem abscessos externos.

1272 Observou-se que, mesmo nos animais que pertenciam ao rebanho onde havia medidas
1273 de controle sistemático da doença, por meio de exames clínicos e adoção de técnicas de
1274 manejo adequadas para o controle da doença, um único animal foi negativo no teste
1275 sorológico. Isso pode estar associado ao fato de *C. pseudotuberculosis* ser capaz de sobreviver
1276 em solo contaminado com pus por até oito meses, em galpões de tosquia por,
1277 aproximadamente, quatro meses e na palha, feno e outros fomitês por até dois meses. As
1278 baixas temperaturas e ambientes úmidos prolongam ainda mais o tempo de sobrevivência
1279 desta bactéria (Lucas et al., 2009).

1280 Entre os dez ovinos que não tinham os sinais clínicos, mas conviviam com outros que
1281 possuíam histórico da doença, sete foram apontados como positivo e os outros três como
1282 negativos no teste de ELISA. Esses animais diagnosticados como positivos para LC podem
1283 ter sim a doença, porém na forma subclínica, e estarem servindo como fonte de transmissão
1284 para outros ovinos. A manutenção de casos confirmados com LC no rebanho deve ser evitada,
1285 pois, uma vez identificados, os animais infectados devem ser removidos, sendo esta atitude
1286 fator preponderante para o controle da doença (Santana-Jorge et al., 2016).

1287 O uso regular do teste ELISA para triagem e diagnóstico de ovinos positivos, em
1288 associação com inspeções clínicas e mudanças na gestão da propriedade, pode reduzir,
1289 significativamente, a incidência de lc em rebanhos afetados (Baird; Malone, 2010). No
1290 entanto, vários fatores podem interferir na interpretação do teste ELISA, como a natureza dos
1291 anticorpos circulantes contra *C. pseudotuberculosis*, que podem diminuir durante períodos de
1292 dormência de patógenos e resultar em um grande número de falsos negativos e na
1293 incapacidade de distinguir entre animais previamente expostos e aqueles que ainda abrigam o
1294 patógeno (Ribeiro et al., 2013).

1295

1296 **Agradecimentos**

1297

1298 Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Feral de Mato
1299 Grosso do Sul e ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
1300 Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia
1301 do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) e Embrapa Gado de Corte.

1302

1303

1304

CONCLUSÃO

1305

1306

1307 Estes resultados demonstram a potencialidade da proteína recombinante XA1 como
1308 antígeno em teste de ELISA indireto. Este imunoensaio pode auxiliar como uma ferramenta
1309 acessível no diagnóstico de ovinos com linfadenite caseosa, além de contribuir em programas
1310 de controle da doença dentro dos rebanhos.

1311

1312

1313

1314

REFERÊNCIA

- 1315
1316
1317
1318 Aquino de Sá M.C., Gouveia V., Krewer C.C., Veschi J.L.A., Guaraldis-Mattos A.L. &
1319 Matiuzzi da Costa. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium*
1320 *pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. *Genetic and*
1321 *Molec Biol.* 36 (2): 265-268.
1322
- 1323 Araujo, F. R., Ramos, C. A. do N., Luíz, H. L., Péres, I. A. H. F. S., Oliveira, R. H. M. de,
1324 Souza, I. I. F. de, Russi, L. dos S2009. Avaliação de um protocolo de extração de DNA
1325 genômico a partir de sangue total. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 5 p.
1326 (Embrapa Gado de Corte. Comunicado técnico, 120).
1327
- 1328 Ayers, J.L. 1977. Caseous Lymphadenitis in Goats and Sheep: A Review of Diagnosis,
1329 Pathogenesis, and Immunity. *JAVMA*, 171(12): 251-254.
1330
- 1331 Billington, E.P.A., Songer G. & Jodt B.H. 2002. Identification and role in virulence of
1332 putative iron acquisition genes form *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Federation of*
1333 *Microbiological Societies.* (208): 41-45.
1334
- 1335 Camargo, E.V., Barboza, C.S., Vargas, A.P.C., Cecim, M. & Leal, M.L.R. 2010. Isolamento
1336 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no sêmen de um carneiro na região central do Rio
1337 Grande do Sul. *Arq. Inst. Biol.*, 77(1) 139-142.
1338
- 1339 Carminati, R. 2003. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA
1340 indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Rev. Ciên. Méd.*
1341 *iol.*, Salvador, 2(1) 88-93.
1342
- 1343 Chirino- Zárraga, C., Rey-Valerion, C., Scaramelli, A. & Carrero, L. 2009. Diagnosis of
1344 caseous lymphadenitis by ELISA in naturally infected goats from Venezuela. *Small*
1345 *Ruminant Research*, 95.
1346
- 1347 Dercksen D.P., Brinkhof J.M.A., Dekker-Nooren T., Van Maanen K., Bode C.F., Baird G.,
1348 Kamp E.M. 2000. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous
1349 lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 75:167-175.
1350
- 1351 Dorella F. A., Pacheco L. G. C., Miyoshia A., Azevedo, V. & Oliveira S. C. 2006.
1352 *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis
1353 and molecular studies of virulence. *Vet Resear*, 37(2), 201-218.
1354
1355
- 1356 Eckersall P.D., Lawson F.P., Bence L., Waterston M.M., Lang T.L., Donachie W. &
1357 Fontaine M.C. 2007. Acute phase protein response in an experimental model of ovine
1358 caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res.* 3: 35. Doi: 10,1186/1746-6148-3-35.
1359

- 1360 Euzéby J.P. & Guérin-Faublée V. 2000. Étude de quelques bactéries Patógenos pour le cheval
1361 et / ou les carnívoros domestiques. In: Freney J., Renaud F., Hansen W. et C. Bollet:
1362 Précis de bactériologie clinique , Edições ESKA, Paris. 459-500.
1363
- 1364 Guimarães A. S., Carmo F.B., Pauletti R.B., Seyffert N., Ribeiro D., Lage A.P., Heinemann
1365 M.B., Miyoshi A., Azevedo V. & Gouveia A.M.G. 2011. Caseous lymphadenitis:
1366 epidemiology, diagnosis, and control. IIOAB Journal 2(2):33-43.
1367
- 1368 Hariharan H., Tiwari K. P., Kumthekar S., Thomas D., Hegamin-Younger C., Edwards B. &
1369 Sharma R. N. 2015. Serological Detection of Caseous Lymphadenitis in Sheep and Goats
1370 Using a Commercial ELISA in Grenada, West Indies. International Jour. Vet Med:
1371 Resear & Rep, (2015). Doi: 10.5171/2015.473459.
1372
- 1373 Lucas, R. P., Scaramucci, C.P. & Pereira, L. 2009. Linfadenite caseosa em ovinos - revisão de
1374 literatura. Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet., (12):1-7.
1375
- 1376 Markey, B., Archambault, M., Cullinane, A. & Maguire. Clinical Veterinary Microbiology. 2.
1377 ed. Elsevier. 2012. 902 p.
1378
- 1379 Maky L.R., Shen S.H., Bergstrom R.C. & Stetzenbach L.D. 1985. Diagnosis of
1380 *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep, using an enzyme-linked
1381 immunossorbent assay. Am. J. Vet. Res. 46:212-214
1382
- 1383 Moura-Costa, L. F., Bahia R. C., Carminati R., Vale V. L., Paule B. J., Portela R. W., Freire S.
1384 M, Nascimento I., Schaer R., Barreto L. M. & Meyer R. 2008. Evaluation of the humoral
1385 and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium*
1386 *pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous
1387 lymphadenitis. Vet Immunol Immunophat (126)131–141.
1388
- 1389 Nassar, A. F. C., Daniel, G.T., Ruiz, R., Myashiro, S., Scannapieco, E.M., Neto, J.S. &
1390 Gregory, L. 2015. Diagnostic comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through
1391 microbiological culture and PCR in sheep samples. Arq. Inst. Biol. (82):1-6.
1392 Doi10.1590/1808-1657000692013.
1393
- 1394 OIE- World Organisation For Aninal Health. 2014. Development and optimisation of
1395 antibody detection assays. Acesso em: 24 jan. 2017. Disponível em:
1396 [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIBODY_DETECT](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIBODY_DETECT.pdf)
1397 [T.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIBODY_DETECT.pdf)
1398
- 1399 Oliveira, A., Teixeira, P., Azevedo, M., Jamal, S.B., Tiwari, S., Almeida, S., Silva, A., Barh,
1400 D., Dorneles, E.M., Haas, D.J., Heinemann, M.B., Ghosh, P., Lage, A.P., Figueiredo,
1401 H., Ferreira, R.S. & Azevedo, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be under
1402 anagenesis and biovar Equi forms biovar Ovis: a phylogenic inference from sequence and
1403 structural analysis. BMC Microbiol. (16):100. DOI 10.1186/s12866-016-0717-4.
1404
- 1405 Paule, B. J. A., Azevedo, V., Moura-Costa, L. F., Freire, S. M., Regis, L. F., Vale, V. L. C.,
1406 BAHIA, R. C., Carminati, R. & Meyer, R. SDS-PAGE and Western blot analysis of
1407 somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Rev Ciênc
1408 Méd Biológ, Salvador, v. 3, n. 1, p. 44-52, jan./jun. 2004.
1409

- 1410 Rebouças M.F., Loureiro D., Bastos B.L., Moura-Costa B., Hanna S.A., Azevedo V., Mayer
1411 R. & Portela R.W. 2013. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium*
1412 *pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant
1413 as antigen. *Pesq. Vet. Bras.* 33 (11): 1296-1302.
1414
- 1415 Ribeiro M.G., Belotta A.F., Fernandes M. C., Guena R., Nardi Júnior G., Lara G.H.B.,
1416 Giuffrida R. & Zamprogna T. O. 2011. Citologia aspirativa no diagnóstico da linfadenite
1417 em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 31 (10): 839-843.
1418
- 1419 Ribeiro, D., Dorella, F.A., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., de Paula Castro, T.L., Portela,
1420 R.W.D., Meyer, R., Mioyshi, A., Luvizotto, M.C.R. & Azevedo, V. .2013. Subclinical
1421 Diagnosis of Caseous Lymphadenitis Based on ELISA in Sheep from Brazil. *J Bacteriol*
1422 *Parasitol* 4:170. doi:10.4172/2155-9597.1000170
1423
- 1424 SÁ, M. C.A. et al. 2013a. Activity of disinfectants and biofilm production of
1425 *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(11), 1319-1324.
1426
1427
- 1428 Sá, M.C.A., Gouveia, G.V., Krewer, C.C., Veschi, J.L.A., Mattos – Guaraldi, A.L. & Costa,
1429 M.M. 2013b. Distribution of *PLD* and *FagA*, *B*, *C* and *D* genes in *Corynebacterium*
1430 *pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. *Genet. Mol.*
1431 *Biol.* 36 (2):265-268.
1432
- 1433 Santana-Jorge, K.T.O., Santos, T.M., Tartaglia, N.R., Aguiar, E.L., Souza, R.F.S., Mariutti,
1434 R. B.M., Erbele, R.J., Arni, R.K., Portela, K.W., Meyer, R. & Azevedo, V. 2006. Putative
1435 virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and
1436 protein expression. *Microb Cell Fact.*, 15:83. DOI 10.1186/s12934-016-0479-6.
1437
- 1438 Santos Júnior, M.L. & Gomes, A.A.B. 2012. Determinação do Estresse Osmótico do
1439 *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Agente Etiológico da Linfadenite Caseosa. *Rev.*
1440 *Cient. Prod. Anim.*, 14 (1): 2012.
1441
- 1442 Solanet J.J., Mlena R., Estein S.M., Belchior S.E. & Paolicchi F.A. 2011. Desarrollo de una
1443 prueba de ELISA para detectar anticuerpos em carneros vacunados o infectados com
1444 *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Ver. Argent. Microbiol.* 43: 9-17.
1445
- 1446 Zavoshti, F.R., Khoojine, A.B.S., Helan, J.A., Hassanzadeh, B. & Heydari, A. 2011.
1447 Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz:
1448 comparison of bacterial culture and pathological study. *Comp. Clin. Pathol.* (21) 667–671.
1449
- 1450 Kaba J., Kutschke L. & Gerlach G. F. 2001. Desenvolvimento de um ELISA para o
1451 diagnóstico de infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Vet*
1452 *Microbiol.* 78 (2): 155-63.
1453
1454
1455

1456 **MANUSCRITO 2: Revista Journal of Agricultural Science**

1457

1458 **UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA XA1 RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO EM TESTE**
1459 **DE ELISA INDIRETO NO DIAGNÓSTICO DA LINFADENITE CASEOSA EM**
1460 **CAPRINOS**

1461

1462 Aline Najara Domingos Gonçalves¹, Grácia Maria Soares Rosinha^{2*}, Fernando Alvarenga
1463 Reis², Cleber E. Galvão e Patrícia Yoshida F. Martins³

1464

1465 ¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do
1466 Sul, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.1467 ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil
1468 Correspondência: Laboratório de Engenharia Genética Animal, Empresa Brasileira Pesquisa
1469 Agropecuária Gado de Corte, Mato Grosso do Sul, Brasil. Tel: 0xx67- 3368-2168. E-mail:
1470 gracia.rosinha@embrapa.br.1471 ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Caprinos e ovinos, Fazenda Três
1472 Lagoas, Estrada Sobral/Groáíras, Km 4, Sobral, CEP: 62010-970, Brasil.

1473

1474

1475 **Resumo**

1476

1477 A Linfadenite Caseosa ou mal do caroço dos caprinos e ovinos é uma doença infecto-
1478 contagiosa crônica, que tem como agente causador a bactéria *Corynebacterium*
1479 *pseudotuberculosis*, caracterizada pela formação de abscessos em linfonodos, tanto
1480 superficiais quanto internos, implicando na diminuição da produção de leite, perda de peso e
1481 condenação de carcaça. Objetivou-se, neste estudo, produzir um antígeno recombinante
1482 denominado XA1r e utilizá-lo na padronização de um teste ELISA indireto, para o
1483 diagnóstico da LC em soros caprinos naturalmente infectados e não infectados. Para tanto, foi
1484 formado um banco contendo 92 soros, entre positivos (n=29), negativos (n=19), provenientes
1485 de animais com sinal clínico de LC (n=29) e aqueles que faziam parte de um rebanho com
1486 histórico da doença (n=15). O estudo da sensibilidade e especificidade foi verificado por meio
1487 da curva ROC, na qual se obteve resultados de 96,6 e 67,2% para o ELISA indireto e o ponto
1488 de corte foi a DO= 0,426. O teste de ELISA apresentou um animal falso-negativo e seis falso-
1489 positivos. A associação do teste de ELISA indireto proposto a exames clínicos foi capaz de
1490 diagnosticar como positivos 96,55% dos animais que possuíam sinal clínico da doença,
1491 mostrando assim, o potencial da proteína XA1r no reconhecimento de anticorpos contra *C.*
1492 *pseudotuberculosis*.

1493

1494

1495

1496

1497

1498 **1 Introdução**

1499

1500 Evoluindo de criações voltadas para a subsistência, nos últimos anos, ocorreram
1501 mudanças significativas para a consolidação da cadeia produtiva da caprinocultura, no Brasil,
1502 com destaque para a Região Nordeste, que detém mais de 90% de todo o rebanho nacional
1503 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE 2015).

1504 A linfadenite caseosa (LC) é considerada uma doença crônica, debilitante e
1505 contagiosa, que acomete principalmente caprinos e ovinos, e existente em todos os países
1506 onde são criados. É causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* e trata-se de
1507 um sério problema para a caprinocultura nacional, evidenciando perdas econômicas,
1508 desvalorização da pele, diminuição da produção de leite, custo de drogas e mão de obra para
1509 tratar abscessos externos (ALVES; OLANDER, 1998; DORNELES et al., 2012).

1510 A cronicidade da doença torna os animais infectados reservatórios constante dentro de
1511 um rebanho. Além disso, como o período de incubação do patógeno dura de dois a seis meses,
1512 um animal assintomático, considerado saudável quando introduzido em um rebanho, pode
1513 difundir a doença para novas áreas (EMBRAPA, 2014). O diagnóstico de LC depende
1514 principalmente das características clínicas desta enfermidade e do isolamento com a
1515 identificação do agente causador, a partir da secreção purulenta (ALGAMMAL, 2016).

1516 Diante disto, vários testes sorológicos vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico da
1517 LC. Um deles é o teste de Ensaio de Imunoadsorção Enzimática – ELISA do tipo sanduíche
1518 (MALONE et al., 2006) e indireto (CARMINATI et al., 2003; MALONE et al., 2006;
1519 ZERBINATI, 2006; BINNS et al., 2007; SEYFFERT et al., 2009; SOLANET et al., 2011;
1520 REBOUÇAS et al., 2013). O teste de ELISA é considerado de fácil execução e aplicável em
1521 rotinas de laboratórios de diagnóstico (HOELZLE et al., 2013).

1522 Em estudo desenvolvido pela Embrapa Gado de Corte, foram descobertas proteínas
1523 antigênicas e imunogênicas, a partir de imunovarredura de biblioteca de expressão gênica de
1524 *C. pseudotuberculosis* (dados submetidos à publicação). Detectou-se o potencial antigênico
1525 do gene *xa1*, ao reagir com soro de ovinos positivos pra LC. Este gene é um dos responsáveis
1526 pela aquisição de ferro para o metabolismo de *C. pseudotuberculosis*, desta forma, estando
1527 relacionado com a virulência dessa bactéria. Este gene faz parte do *operon xa* e codifica uma
1528 proteína de membrana chamada XA1.

1529 Objetivou-se, neste estudo, desenvolver e padronizar um protocolo de ELISA indireto
1530 para detecção de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* em caprinos, utilizando a proteína

1531 recombinante XA1, a fim de contribuir para o controle da linfadenite caseosa nesta espécie
1532 animal.

1533

1534 **2 Material e Métodos**

1535

1536 **2.1 Banco de soros**

1537

1538 Foi utilizado um total de 92 soros de caprinos de idade e sexo variados, sendo: 29
1539 soros de animais positivos para linfadenite caseosa, por meio do isolamento de *C.*
1540 *pseudotuberculosis* e testes bioquímicos; 29 soros de animais que apresentavam abscessos nos
1541 linfonodos superficiais; 19 soros de caprinos negativos para LC com ausência de sinal clínico
1542 e provenientes de rebanhos sem histórico da doença; além de outros 15 soros de animais que
1543 fazem parte de um rebanho com histórico da doença, mas que não apresentava sinal clínico de
1544 LC.

1545

1546 **2.2 Identificação microbiológica do agente**

1547

1548 O material purulento coletado a partir dos abscessos foi semeado em placas, contendo
1549 o meio ágar sangue de ovino 5%, incubados por 48 horas a 37°C. Após o crescimento
1550 bacteriano, selecionaram-se colônias características, as quais foram repicadas para o caldo
1551 *Brain Heart Infusion* (BHI) para crescimento durante 48 horas, a 37°C, sob agitação constante
1552 de 200 RPM. Em seguida, as amostras foram criopreservadas em glicerol em ultrafreezer a -
1553 80 °C.

1554 A identificação da bactéria *C. pseudotuberculosis* nas amostras biológicas foi
1555 realizada por meio do isolamento do agente, considerado o teste padrão ouro para diagnóstico
1556 da LC, baseando-se nas características morfológicas das colônias isoladas, que foram
1557 posteriormente submetidas à coloração de gram, hemólise e testes bioquímicos de catalase,
1558 oxidase, Camp - *S. aureus* (Reverse), oxidação e fermentação - OF e urease (ANVISA, 2008).

1559

1560 **2.3 Extração de DNA bacteriano**

1561

1562 Onze das amostras criopreservadas foram semeadas e cultivadas em meio BHI Agar,
1563 enriquecido com 5% de sangue ovino. Após 72 horas a 37°C, foram selecionadas colônias
1564 características de *C. pseudotuberculosis*.

1565 O DNA bacteriano foi extraído utilizando-se o método de choque térmico, o qual
1566 consistiu em três ciclos de 30 minutos a 94°C e 30 minutos a -20°C para inativação do agente
1567 e liberação do material genético (FUVERKI et al., 2008).

1568

1569 **2.4 Diagnóstico molecular**

1570

1571 O diagnóstico molecular foi feito para 11 das 29 amostras positivas no teste padrão
1572 ouro, com o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados os
1573 oligonucleotídeos iniciadores C2700F e C3130R para a amplificação de um fragmento do
1574 gene *rpoB*, conforme o descrito por Khamis et al. (2005). Para a segunda reação, foram
1575 utilizados os oligonucleotídeos para amplificação do gene *pld*. A reação de PCR foi preparada
1576 contendo 5 µL de tampão (1X), 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 2 µL de oligonucleotídeo
1577 iniciador plDcoryF (5' – ATG AGG GAG AAA GTT GTT TTA – 3') e plDcoryR (5' – TCA
1578 CCA CGG GTT ATC CGC – 3') (20 pmol); 1 µL de dNTP (10 mM); 37 µL de água
1579 ultrapura; 0,5 U de Taq DNA polimerase; e 1 µL de DNA genômico de cada animal teste. A
1580 amplificação ocorreu em termociclador, onde a temperatura inicial foi de 95°C, a
1581 desnaturação da dupla fita à 95°C, por 4 minutos; logo após, o anelamento dos *primers* à 55°C
1582 por 1 minuto, e extensão da fita de DNA à 72°C por 2 minutos. Os ciclos foram repetidos 35
1583 vezes, com extensão à 72°C por 7 minutos e finalizado à 4°C.

1584 Ambas as reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado
1585 com *Syber Gold* (Invitrogen, EUA), e visualizadas em transiluminador ultravioleta, com 1 Kb
1586 DNA *Plus* (Invitrogen, EUA) como marcador.

1587

1588 **2.5 Produção da Proteína XA1 recombinante (XA1r)**

1589

1590 A sequência do gene *xal*, que codifica a porção hidrofílica da proteína XA1, foi
1591 selecionada com o auxílio do programa *Protean - DNASTAR*[®]. Esta sequência e a construção
1592 do plasmídeo de expressão gênica foram sinteticamente confeccionadas pela empresa de
1593 biotecnologia Genone *Biotechnologies*. O plasmídeo recombinante pET47b*xal* foi
1594 introduzido em célula quimicamente competente *E. coli* Rosetta-gami e a indução da
1595 expressão gênica foi realizada com IPTG à 1mM, por incubação a 28°C, durante quatro horas
1596 sob agitação de 200 RPM. A indução da XA1r foi verificada por eletroforese em gel
1597 poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%, corado com azul brilhante de Comassie e *Western blot*
1598 com *poly-Histidine monoclonal antibody* (Sigma-Aldrich[®]). A XA1r foi purificada por

1599 cromatografia de afinidade, em resina metálica com a coluna de agarose níquel *His trap HP*
1600 (GE Healthcare®), de acordo com as instruções do fabricante. Após, foi realizada a diálise
1601 contra PBS 1X pH 7,2, durante 72 horas a 4°C, e feita a avaliação da purificação em gel de
1602 poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%. A proteína purificada foi quantificada pelo método descrito
1603 por Lowry (1951) e estocada a -20°C.

1604

1605 **2.6 Teste de ELISA Indireto utilizando como antígeno a proteína XA1** 1606 **recombinante**

1607

1608 As placas de poliestireno de fundo chato (COSTAR 3590) foram sensibilizadas com
1609 100 µL do antígeno, diluído a 1:400, em tampão carbonato bicarbonato a 0,05M, pH 9,6,
1610 incubadas a 4 °C por 12 horas, em câmara úmida. Após quatro lavagens com PBS 1X,
1611 contendo 0,05% de Tween- 20 (PBST), as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de
1612 PBST, contendo 5% de leite desnatado, durante uma hora. A seguir, foram incubadas com
1613 100µL/poço dos soros testes diluídos a 1:50 em PBST, contendo 1% de leite desnatado,
1614 durante 1 hora. Após quatro lavagens com PBST, adicionaram-se às placas 100 µL do
1615 conjugado monoclonal anti-Goat/Sheep IgG – Peroxidase (SIGMA), diluído a 1:15.000 em
1616 PBST com 1% de leite desnatado. As placas foram incubadas a 37 °C por 60 minutos e, em
1617 seguida, foram novamente lavadas quatro vezes com PBST e incubadas com 95 µL/poço da
1618 solução de o-fenilenediamina (OPD) (Sigma-Aldrich®) (diluído, conforme instruções do
1619 fabricante). As placas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da
1620 luz, e a reação foi interrompida, acrescentando-se 50µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄)
1621 3M. A leitura foi feita em leitor de ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550),
1622 usando-se filtro de 490 nm de comprimento de luz.

1623

1624 **2.7 Análise estatística**

1625

1626 O ponto de corte foi calculado a partir da curva ROC (*Receiver Operator*
1627 *Characteristic*), cuja finalidade é avaliar a sensibilidade em função da especificidade, com o
1628 uso do software MedCalc® versão 17. A especificidade e a sensibilidade foram calculadas
1629 com 95% de intervalo de confiança.

1630

1631

1632

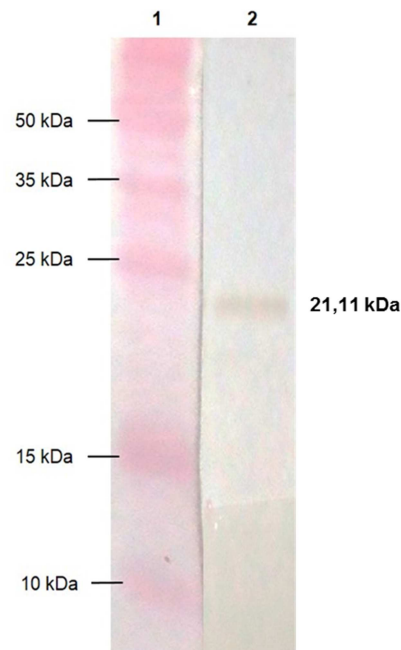
1633 2 Resultados e Discussão

1634

1635 Em caprinos e ovinos, as infecções por *C. pseudotuberculosis* ocasionam a linfadenite
1636 caseosa, reconhecida como doença de importância mundial, em decorrência da alta
1637 prevalência e pelos prejuízos econômicos (WILLIAMSON, 2001; MOTTA et al., 2010). O
1638 desenvolvimento de um método de diagnóstico rápido, sensível e específico faz-se necessário
1639 para o controle e prevenção da LC. Diferentes técnicas indiretas foram propostas, ao longo
1640 dos anos, para o diagnóstico desta doença e, entre elas, está o teste sorológico do tipo ELISA.
1641 No entanto, o isolamento direto de *C. pseudotuberculosis*, a partir do material purulento de
1642 linfonodos, permanece como o procedimento mais fidedigno de diagnóstico “*in vivo*”
1643 (RIBEIRO et al., 2001).

1644 São relatados vários testes sorológicos para o diagnóstico de LC, normalmente,
1645 baseados em preparos de células mortas, antígenos de parede ou toxóides do filtrado de
1646 cultivo, além da exotoxina fosfolipase D (PLD) (REBOUÇAS et al., 2013), porém estes
1647 preparos podem apresentar baixa especificidade e falso-positivos (BROWN et al., 1987).
1648 Neste estudo, utilizou-se a proteína recombinante XA1, identificada durante a criação de uma
1649 biblioteca de expressão gênica de *C. pseudotuberculosis* por imunovarredura. Esta proteína
1650 está relacionada com a absorção extracelular de Fe, o que representa um importante fator de
1651 virulência para esta bactéria (DORELLA et al., 2006; SÁ et al., 2013).

1652 A indução da proteína XA1r foi confirmada pela eletroforese em gel de SDS-PAGE,
1653 sendo possível observá-la com, aproximadamente, 21 Kilodaltons (kDa). No *Western blot*, a
1654 proteína recombinante foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti- histidina (Figura 1).



1655

1656 Figura 1. Análise de expressão da proteína recombinante XA1. Eletroforese em gel SDS-
 1657 PAGE – 15% corado em azul brilhante de Comassie transferido à membrana de nitrocelulose.
 1658 Reação entre a membrana e o com anticorpo monoclonal anti-histidina, e revelada com DAB.
 1659 Expressão da proteína XA1r de *C. pseudotuberculosis* em *E. coli* TOP10 F', transformada
 1660 com plasmídeo recombinante pET47bxa1. Canaleta 1 – Marcador de proteína (Promega).
 1661 Canaleta 2 – Indução pET47bxa1 por 4h à 1mM de IPTG.

1662

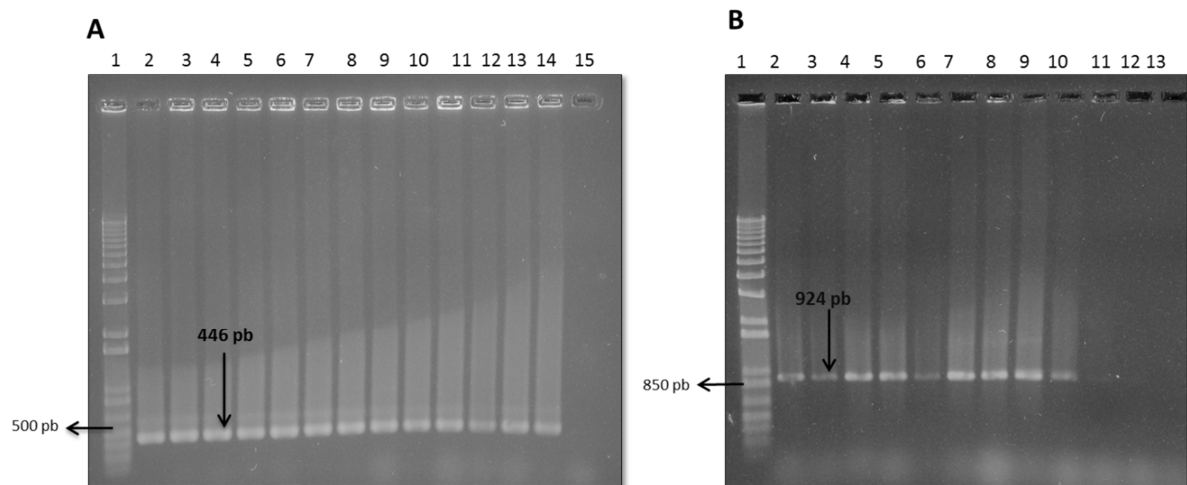
1663 *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi caracterizada pelo fenótipo positivo para a
 1664 coloração de Gram e para as provas bioquímicas de catalase, hemólise, Camp - *S. aureus*
 1665 (Reverse), urease e oxidação e fermentação - OF e negativo para oxidase. Os testes
 1666 bioquímicos empregados são métodos simples e utilizados para a realização de diagnóstico
 1667 diferencial, em relação aos possíveis agentes encontrados no material drenado, a partir dos
 1668 linfonodos de animais acometidos pela LC, o que contribui para um diagnóstico mais preciso
 1669 (EMBRAPA, 2007).

1670

1671 Porém, muitas vezes, a confirmação do agente por testes bioquímicos são
 1672 inconclusivas, devido à grande variabilidade do próprio agente. O uso do diagnóstico por
 1673 PCR, com a utilização de oligonucleotídeos específicos, pode simplificar a identificação das
 1674 colônias, classificando o microrganismo em gênero e espécie, o pode colaborar no controle da
 1675 disseminação da doença (PACHECO et al., 2007; TORRES et al., 2013; HERNÁNDEZ-
 1676 LEÓN et al., 2016). No entanto, este método não exclui o cultivo bacteriano do material
 extraído dos abscessos, o que implica na demora do diagnóstico, além de restringi-lo à forma

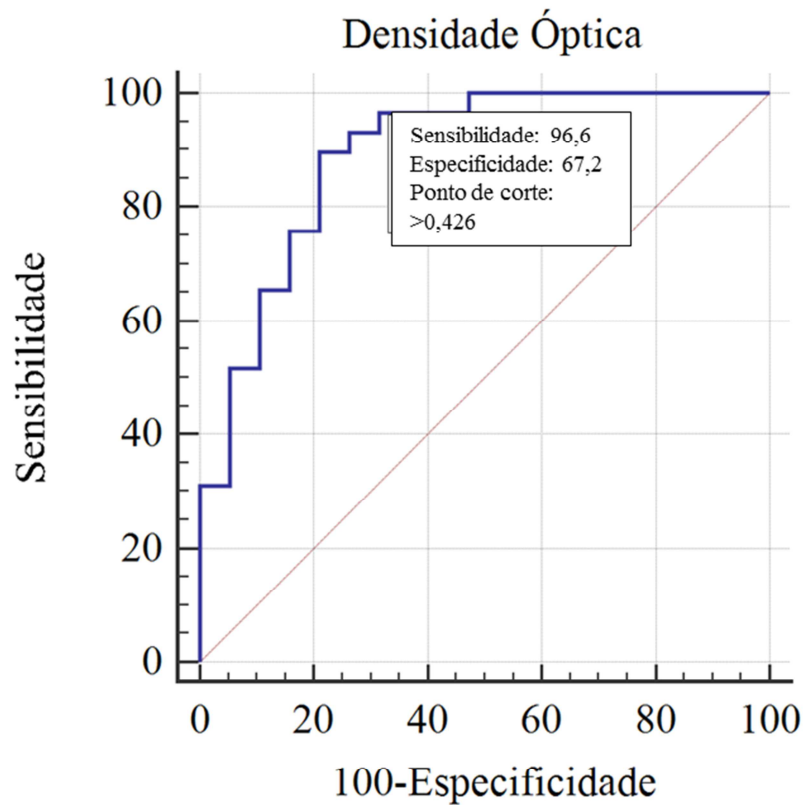
1677 clínica da LC (ÇETINKAYA et al., 2002; PACHECO et al., 2007). A detecção e amplificação
 1678 do gene *β-subunidade RNA Polimerase (rpoB)* tem sido empregada para facilitar o
 1679 diagnóstico diferencial de *C. pseudotuberculosis* de outras bactérias que possam estar
 1680 presentes em amostras do material purulento (ALGAMMAL, 2016; KHAMIS et al., 2005).

1681 Os 11 caprinos, que tiveram diagnóstico positivo para linfadenite caseosa pelo teste
 1682 padrão ouro e provas bioquímicas, mantiveram essa mesma condição no teste molecular para
 1683 ambos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Figura 3). Entre essas mesmas amostras,
 1684 apenas uma apresentou resultado negativo no teste de ELISA indireto.



1685
 1686 Figura 3. Análise dos testes moleculares pela PCR, por meio de eletroforese em gel de
 1687 agarose 1% corado com Syber Gold (Invitrogen). **A:** Amplificação do gene *rpoB* de
 1688 *C. pseudotuberculosis* com 446 pb. Canaleta 1: Marcador 1 kb DNA Plus (Invitrogen); 2:
 1689 Controle positivo; 3 –14: Amostras e canaleta 15: Controle negativo. **B:** Amplificação do
 1690 gene *pld* de *C. pseudotuberculosis* com 924 pb. Canaleta 1: Marcador 1 kb DNA Plus
 1691 (Invitrogen); Canaleta 2: Controle positivo, Canaleta 3-12: Amostras; canaleta 13: Controle
 1692 negativo.

1693 A sensibilidade e especificidade são parâmetros fundamentais para definição de um
 1694 teste de diagnóstico. Quanto maior a sensibilidade de um teste, menor será o número de falso-
 1695 negativos; no entanto, quanto maior a especificidade, menor será o número de falso-positivos.
 1696 O presente estudo obteve sensibilidade de 96,6% e especificidade de 67,2%, quando definido
 1697 o ponto de corte de $DO = 0,426$, por meio da curva ROC. A curva utilizada para a
 1698 determinação do ponto de corte do teste de ELISA indireto está representada na Figura 1. Esta
 1699 curva apresenta a sensibilidade em função de falso-positivos (100-Especificidade), em
 1700 destaque o ponto de corte utilizado no cálculo da sensibilidade e especificidades, e seus
 1701 respectivos valores.



1702

1703 Figura 1. Curva ROC expressando os resultados de sensibilidade e especificidade em função
 1704 do ponto de corte escolhido.

1705

1706 Neste estudo, o teste ELISA desenvolvido apresentou um índice de sensibilidade
 1707 maior do que a especificidade. Isso significa que, por meio deste teste, é possível a detecção
 1708 de caprinos verdadeiramente infectados, porém sua especificidade na detecção de animais
 1709 negativos foi baixa. Entre os 29 caprinos com diagnóstico positivo no isolamento e testes
 1710 bioquímicos, um único animal foi considerado como falso-negativo, ou seja, o teste de ELISA
 1711 proposto foi capaz de identificar 28/29 amostras positivas, ao passo que seis animais foram
 1712 tidos como falso-positivos. A tabela 1 apresenta quais foram os parâmetros para a validação
 1713 do Teste de Elisa indireto, com uso da proteína XA1r como antígeno e amostras de soros de
 1714 caprinos.

1715

1716

1717

1718

1719

1720

1721 Tabela 1. Validação do Teste de Elisa indireto com uso da proteína XA1r com antígeno, tendo
1722 como padrão ouro o isolamento para amostras positivas e teste molecular para as negativas

Parâmetro	Resultado
Soros testados	92
Soros verdadeiros positivos	29
Soros verdadeiros negativos	19
Falso – positivo	6
Falso – negativo	1
Ponto de Corte	0,426
Sensibilidade (%)	96,6
Especificidade (%)	67,2

1723

1724 A sensibilidade do teste de ELISA proposto foi maior à encontrada por Dercksen et al.
1725 (2000), que foi de 94%, ao utilizar como antígeno a exotoxina Fosfolipase D e soros de
1726 caprinos. Zerbinate et al. (2007) testaram como antígenos os extratos brutos da bactéria *C.*
1727 *pseudotuberculosis*, denominados BMD e BHI, em teste ELISA indireto. Foram obtidos
1728 valores de sensibilidade e especificidade de 98% para ELISA BHI, e de sensibilidade 99,8% e
1729 especificidade de 98% para o ELISA BMD. Ribeiro et al. (2013) descreveram o desempenho
1730 de um teste de ELISA para o diagnóstico de LC, o mesmo revelou sensibilidade de 88% e
1731 especificidade de 31%, valores abaixo dos obtidos no teste em questão.

1732 Assim, neste estudo, a sensibilidade e especificidade da maior parte dos testes foram
1733 determinadas utilizando soros de caprinos com abscessos, dos quais *C. pseudotuberculosis* foi
1734 isolado e soros de caprinos saudáveis de rebanhos sem registro de LC. No entanto,
1735 acrescentamos ao teste ELISA amostras, cujas informações eram baseadas no histórico de
1736 cada grupo, simulando situações encontradas no dia a dia no campo.

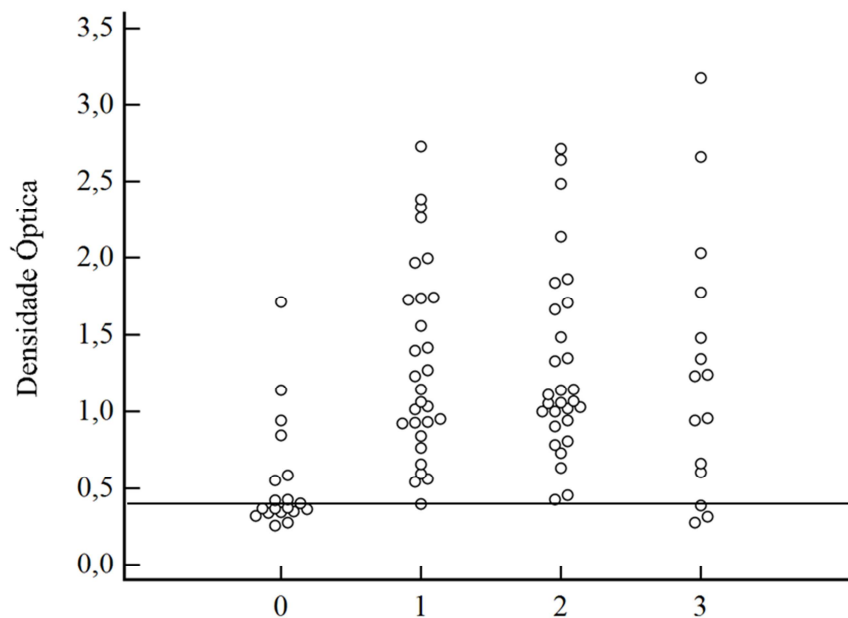
1737 Entre as amostras oriundas de um rebanho com histórico de linfadenite caseosa e a
1738 interação entre animais saudáveis e infectados, 80% foram consideradas positivas para a LC.
1739 Casos como estes, em que a doença está instaurada na propriedade, exigem medidas de
1740 manejo para seu controle. Os animais tratados devem retornar ao rebanho somente após
1741 cicatrização completa da lesão e, no caso de animais com abscessos recorrentes, sugere-se
1742 que sejam eliminados do rebanho, para que se evitem novos casos (WILLIAMSON, 2000;
1743 EMBRAPA, 2007).

1744 Em relação aos caprinos que apresentavam sinal clínico de LC, 96,55% teve
1745 diagnóstico confirmado para a enfermidade. Isso ressalta a importância do diagnóstico clínico,
1746 no qual se visualiza a presença de abscessos nos linfonodos superficiais do animal (BAIRD;
1747 MALONE, 2010). Apenas um animal que possuía sinal clínico obteve resultado negativo no

1748 teste de ELISA, porém existem outros microrganismos que causam abscessos semelhantes aos
 1749 causados por *C. pseudotuberculosis*, como *Arcanobacterium pyogenes* e *Pasteurella*
 1750 *multocida* (DORELLA et al., 2006).

1751 A distribuição dos resultados de Densidade Óptica obtidas no teste de Elisa para a
 1752 detecção de anticorpos específicos contra *C. pseudotuberculosis* encontra-se na figura 2. Os
 1753 dados expressam os resultados obtidos nos grupos positivo, negativo, presença de sinal clínico
 1754 e histórico da doença no rebanho.
 1755

Distribuição dos resultados em Densidade Óptica obtidos no teste de ELISA
 indireto para detecção de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis*



1756

1757 Figura 2. Representação gráfica em *Dot-plot* das absorvâncias observadas no teste de ELISA
 1758 indireto, com a utilização da proteína XA1r. Os grupos estão representados por: 0: Negativo;
 1759 1: Positivo; 2: Sinais clínicos e 4: histórico de LC.

1760

1761 3 Conclusão

1762 O teste de ELISA indireto foi capaz de diagnosticar como positivos animais que
 1763 possuíam sinal clínico da doença, mostrando assim, o potencial da proteína XA1r em compor
 1764 este teste sorológico. A associação do teste de ELISA indireto proposto a exames clínicos
 1765 pode ser capaz de contribuir no controle da linfadenite caseosa no rebanho, por meio de
 1766 identificação e eliminação dos animais infectados.

1767 **Agradecimentos**

1768 Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato
 1769 Grosso do Sul e ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
 1770 Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia
 1771 do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) e Embrapa Gado de Corte.

1772

1773

REFERÊNCIAS

1774 Algammal, A. M. (2016) Molecular Characterization and Antibiotic Susceptibility of
 1775 *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated from Sheep and Goats Suffering from Caseous
 1776 Lymphadenitis. *Zagazig Veterinary Journal*, 44(1), 1-8.

1777 Alves, F. S. F. & Olander, H. J. (1998). Uso de uma vacina toxóide no controle da linfadenite
 1778 caseosa em caprinos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 2, 74-77.

1779 Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária,. (2008). *Descrição dos Meios de Cultura*
 1780 *Empregados nos Exames Microbiológicos*. Recuperado de:
 1781 http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf.

1782

1783 Ashton, O. B. O., Wong, M., & McGhie, T. K. (2006). Pigments in avocado tissue and oil.
 1784 *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 10151-10158.
 1785 <http://dx.doi.org/10.1021/jf061809j>

1786

1787 Baird, G. J. & Malone, F. E. (2010). Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks
 1788 using clinical examination and regular ELISA testing. *Veterinary Record*, 166(12), 358-362.
 1789 Doi: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.b4806>.

1790

1791 Billington, E.P.A., Songer G. & Jodt B.H. (2002). Identification and role in virulence of
 1792 putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Federation of*
 1793 *Microbiological Societies*. (208): 41-45.

1794

1795 Binns, S. H.; Green, L. E.; Bayley, M. (2007). Development and validation of an ELISA to
 1796 detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Veterinary*
 1797 *Microbiology*, 169–179.

1798

1799 Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
 1800 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*,
 1801 72, 248-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

1802

1803 CarminatI, R. (2003). Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de
 1804 ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Revista de Ciências*
 1805 *Médicas e Biológicas*, 2 (1), 88-93.

1806

1807 Çetinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R. de Baere, T. Veneechoutte, M. (2002).
 1808 Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR.
 1809 *Veterinary of Microbiology*, (88), 75-83.

1810 Costa L. F. M. (2002). *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da
 1811 linfadenite caseosa em caprinos. *Revista de Ciências Médicas Biológicas*. 1 (1), 105-115.

- 1812 Dercksen, D. P., Brinkhof, J. M. A., Dekker-Nooren, T., Van Maanen, K., Bode, C. F., Baird,
1813 G., Kamp, E. M. (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous
1814 lymphadenitis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, (75)167–175
1815
- 1816 Dorella, F. A., Pacheco, L. G., Oliveira, S. C., Miyoshi, A., Azevedo, V. (2006)
1817 *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis
1818 and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, 37(2), 201-218.
- 1819 Dorneles, E.M.S., Santana, J. A., Andrade, G.I, Santos, E.L.S., Santos, A.S., Guimarães, R.A.
1820 ... M.B. Heinemann. (2012) Molecular characterization of *Corynebacterium*
1821 *pseudotuberculosis* isolated from goats using ERIC-PCR. *Genetics And Molecular Research*,
1822 (11), 2051-2059.
1823
- 1824 Embrapa CNPC. (2014). Linfadenite Caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e
1825 controle. (113). Sobral.
1826
- 1827 Fuverki, R. B. N., Murakami, P. S., Biondo, A. W., Barros Filho, I. R. (2008) Uso, da pcr
1828 para detecção e identificação de microbactérias a partir de amostras clínicas de bovinos.
1829 *Archives of Veterinary Science*, 13(1), 73-77.
1830
- 1831 HERNÁNDEZ-LEÓN, F. et al. (2016) Identification and molecular characterization of
1832 *Corynebacterium xerosis* isolated from a sheep cutaneous abscess: first case report in
1833 Mexico. *Bmc Research Notes*, 9(1), 1-6.
1834
- 1835 Hoelzle, L. E, Scherrer, T., Muntwyler, J., Wittenbrink, M. M., Philipp, W. & Hoelzle, K.
1836 (2013). Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the
1837 induced humoral immune response in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 164 (3-4) 359-
1838 65.
1839
- 1840 IBGE. Produção da Pecuária Municipal (2014). *Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação*
1841 *anual, segundo as categorias - Brasil - 2015-2015*. Disponível em: <
1842 http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default_xls_brasil.shtm>.
1843 Acesso em: 16 jan. 2016.
1844
- 1844 Khamis, A., Raout, D., Scola, L. B. (2005). Comparison between rpoB and 16S rRNA Gene
1845 Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of *Corynebacterium*. *Journal*
1846 *Of Clinical Microbiology*, 43 (4), 1934-1936.
1847
- 1848 Lowry O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., Randall, R. J. (1951)Protein measurement with
1849 the folin phenol reagent. *The Journal Biological Chemistry*, 1(193):265–75.
1850 doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
1851
- 1852 Malone, F. E., Fee, S. A., Kamp, E. M., Re, D. C., Baird, G. J., O'Reilly, K. M., Murdock , F.
1853 E. (2006). A serological investigation of caseous lymphadenitis in four flocks of sheep. *Irish*
1854 *Veterinary Journal*, 59 (1), 19-21.
1855
- 1856 Motta, R.; Cremasco, A. C. M. & Ribeiro, M. G. (2010). Infecções por *Corynebacterium*
1857 *pseudotuberculosis* em animais de produção. *Veterinária e Zootecnia*, 2(17), 200-213.
- 1858 OIE- World Organisation For Animal Health. 2014. *Development and optimisation of*
1859 *antibody detection assays*. Acesso em: 24 jan. 2017. Disponível em:

- 1860 http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIBODY_DETECT.pdf. OIE- World Organisation For Animal Health. 2014.
- 1861
- 1862
- 1863 Rebouças, M. F., Loureiro, D., Bastos, B. L., Moura-Costa, B., Hanna, S. A., Azevedo, V.,
- 1864 Mayer, R. & Portela, R. W. 2013. Development of an indirect ELISA to detect
- 1865 *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture
- 1866 supernatant as antigen. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(11): 1296-1302.
- 1867
- 1868 Ribeiro, M. G., Dias Junior, J.G., Paes, A. C., Barbosa, A. G., Nardi Junior, G. & Listoni, F.
- 1869 J. P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium*
- 1870 *pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. *Arquivos do Instituto Biológico*, São
- 1871 Paulo, v.68, n.1, p.23-28, jan./jun. 2001
- 1872
- 1873 Seyffert, N., Guimarães, A. S., Pacheco, L. G. C., Portela, R. W., Bastos, B.L., Dorella, F. A.,
- 1874 HEinemann, M. B... Azevedo, V. (2010). High seroprevalence of caseous lymphadenitis in
- 1875 Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based
- 1876 ELISA. *Research In Veterinary Science*, 88 (1) 50-55.
- 1877 Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.07.002>.
- 1878
- 1879 Solanet, J. J., Mlena, R., Estein, S. M., Belchior, S. E. & Paolicchi, F. A. (2011). Desarrollo
- 1880 de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos em carneros vacunados o infectados com
- 1881 *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista Argentina de Microbiología*. (43): 9-17.
- 1882
- 1883 Williamson, L. H. (2001) Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Update on Small*
- 1884 *Ruminant Medicine*, 17(1) 359-371.
- 1885
- 1886 Zerbinati, J., Greve, I. C., Leal., R. F., Amorin, L. M. P., Silva, D. L., Viegas, S. R. A.,
- 1887 Silva... Cerqueira, R. B. (2007). Produção e padronização de um antígeno para um teste Elisa
- 1888 indireto no diagnóstico da linfadenite caseosa em soros caprinos. *Revista Acadêmica*,
- 1889 *Curitiba*, 5(3) 285-293.
- 1890
- 1891
- 1892