

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Efeito da suplementação com *Hermetia illucens* na resposta imune e
proteção contra linfadenite caseosa em camundongos vacinados com
rNanH**

Henrique Gonçalves Pegoraro

Pelotas, Julho de 2025

Henrique Gonçalves Pegoraro

**Efeito da suplementação com *Hermetia illucens* na resposta imune e
proteção contra linfadenite caseosa em camundongos vacinados com
rNanH**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências (área do conhecimento:
Biotecnologia).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sibele Borsuk

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Rochedo Conceição

Pelotas, 2025

Henrique Gonçalves Pegoraro

**Efeito da suplementação com *Hermetia illucens* na resposta imune e
proteção contra linfadenite caseosa em camundongos vacinados com
rNanH**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 06/08/2025

Banca examinadora:

.....

Prof.^a Dr.^a Sibele Borsuk (Orientadora)

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....

Prof. Dr. Frederico Schmitt Kremer

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....

Prof. Dr. Sérgio Jorge

Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

P376e Pegoraro, Henrique Gonçalves

Efeito da suplementação com *Hermetia illucens* na resposta imune e proteção contra linfadenite caseosa em camundongos vacinados com rNanH [recurso eletrônico] / Henrique Gonçalves Pegoraro ; Sibele Borsuk, orientadora ; Fabrício Rochedo Conceição, coorientador. — Pelotas, 2025.

91 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Imunogenicidade. 2. Neuramidase. 3. Humoral. 4. Celular. 5. Ração. I. Borsuk, Sibele, orient. II. Conceição, Fabrício Rochedo, coorient. III. Título.

CDD 615.372

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Schmitt Kremer (Universidade Federal de Pelotas, CDTEC)

Prof. Dr. Sérgio Jorge (Universidade Federal de Pelotas, FV)

Prof.^a Dr.^a Sibele Borsuk (Orientadora, Universidade Federal de Pelotas, CDTEC)

Agradecimentos

Agradeço à minha família, por me auxiliar em momentos de dúvida durante essa caminhada. À minha mãe Andreia, por sempre me auxiliar a olhar para o futuro e ao meu pai Mauricio, por me mostrar e ajudar em novos caminhos, vocês sempre vão fazer parte da minha jornada.

À minha irmã Sofia, por me permitir ser a pessoa que podes confiar para contar o que pensa e compartilhar de seus momentos leves e também dos difíceis, permitindo acompanhar teu constante crescimento.

À minha namorada Narryman, por sempre estar comigo durante todos os momentos dessa jornada, me permitindo crescer pessoalmente e profissionalmente. Os dias fora do laboratório se tornam mais leves contigo, sendo minha fonte de abrigo e inspiração. Nossos rituais de conhecer cafés pela cidade são momentos de leveza e conversas que eu precisava todos os dias após diversos momentos de incerteza e dúvida. Tu es o meu chão e meu norte e espero um dia conseguir retribuir tudo que já fez por mim.

Aos meus gatos, Chewbacca e Guaraná, minhas fontes de calor no inverno e meus alarme de manhã, sendo uma das minhas felicidades todo dia que chegava em casa.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Sibele Borsuk, pela oportunidade de ingressar ao laboratório, e todos os seus conselhos e exemplos dentro e fora do laboratório.

Ao Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária, Nicole, Luísa, Barbara, Gustavo, Matheus, Beatriz e Eshiley, por me auxiliarem durante experimentos e conselhos de vida. À Mirna por me permitir expandir meu pensamento crítico e me ajudar na busca por novas oportunidades.

Aos meus amigos que o curso me proporcionou, em especial, Miguel, por sempre trazer pensamentos críticos em análises do laboratório e da vida, e Airton, por me mostrar todas as possibilidades que o mundo pode proporcionar.

Aos meus amigos de Porto Alegre por estarem disponíveis em momentos de lazer durante minhas visitas a cidade, as nossas conversas se tornaram um ótimo momento de descontração.

Aos meus parceiros de escalada, que durante escaladas e treinos, me ensinaram mais sobre a vida e como lidar com diversos problemas que a vida joga em nossa direção, a próxima agarrar sempre é uma casa.

Agradeço também à Universidade Federal de Pelotas por oferecer a estrutura e oportunidades de estudar Biotecnologia e aos órgãos de fomento pelas bolsas e por valorizar a ciência feita nas universidades.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“É muito raro que as coisas funcionem na primeira vez. Nós sempre temos que
tentar de novo”

- Pierre Agostini

Resumo

PEGORARO, Henrique. **Efeito da suplementação com *Hermetia illucens* na resposta imune e proteção contra linfadenite caseosa em camundongos vacinados com rNanH** 2025. 91f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença crônica que afeta ovinos e caprinos mundialmente e é causada pela bactéria gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Mesmo já estabelecidos, os métodos de tratamento existentes ainda são considerados ineficazes e caros, e embora a vacinação seja a melhor estratégia para controlar a LC, as vacinas comerciais disponíveis apresentam baixa eficácia e reações adversas, o que torna importante a busca por novos alvos e formulações vacinais que sejam mais seguras e econômicas. Juntamente a vacinação, suplementação dos animais com componentes bioativos capazes de ter ação imunomodulatória podem melhorar a resposta das vacinas. Diante disso, o presente estudo avaliou a resposta imune humoral e proteção após vacinação de camundongos com a proteína rNanH em conjunto com ração suplementada com farinha de *Hermetia illucens*. Para tal, a proteína rNanH foi expressa em *E. coli*, purificada e caracterizada por *Western blot*. Foram utilizados 40 camundongos Balb/c, divididos em 4 grupos, em que o grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) receberam 200 µL de solução salina enquanto o grupo 3 (G3) e o grupo 4 (G4) receberam duas doses de 200 µL contendo 50 µg de rNanH e 7,5 µg de saponina como adjuvante. G2 e G4 estavam sob constante alimentação de ração suplementada. Após 21 dias da segunda dose, os animais foram desafiados com cepa patogênica de *C. pseudotuberculosis* MIC-6. Amostras de sangue foram coletadas para o ELISA indireto. Para automatizar a análise estatística, foi desenvolvido um *Software* denominado de CLARA. G4 obteve níveis elevados de IgG1 e uma diminuição de IgG2a quando comparado ao G3. A sobrevivência de G3 e G4, 80% e 70%, respectivamente, enquanto o G2 obteve um aumento de sobrevivência quando comparado ao G1. Mesmo havendo uma indução do tipo Th2, a ração suplementada parece ter contribuído para uma melhora na resposta imune inata. Para perspectivas futuras, se espera analisar a produção de citocinas pró-inflamatórias e outras aplicações imunomodulatórias.

Palavras-chave: Imunogenicidade, Neuramidase, Humoral, Celular, Ração

Abstract

PEGORARO, Henrique. **Effect of *Hermetia illucens* supplementation on immune response and protection against caseous lymphadenitis in mice vaccinated with rNanH** 2025. 91f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Caseous lymphadenitis (CLA) is a chronic disease that affects sheep and goats worldwide and is caused by the gram-positive bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*, characterized by the formation of abscesses in lymph nodes. Even established treatment methods are still considered ineffective and expensive, and although vaccination is the best strategy for preventing and controlling CLA, available commercial vaccines have low efficacy and adverse reactions, making it important to search for new targets and vaccine formulations that are safer and more economical. Along with vaccination, the diet based on *Hermetia illucens* presented several bioactive components with immunomodulatory capacity. The present study demonstrates the concentration of specific antibodies after vaccination with recombinant NanH protein in conjunction with a supplemented feed. For this, the rNanH protein was expressed in *E. coli*, purified, and characterized by Western blot. For *in vivo* experimentation 40 Balb/c mice were used, divided into 4 groups, in which group 1 (G1) and group 2 (G2) received 200 µL of saline solution while group 3 (G3) and group 4 (G4) received two doses of 200 µL containing 50 µg of rNanH and 7.5 µg of saponin as an adjuvant. G2 and G4 were under constant supplementation with feed. After 21 days of the second dose, the animals were challenged with the pathogenic strain of *C. pseudotuberculosis* MIC-6. Blood samples were collected for indirect ELISA. To automate statistical analysis, a software called CLARA was developed. G4 had high levels of IgG1 and a decrease in IgG2a when compared to G3. G3 and G4 survival rates were 80% and 70%, respectively, while G2 showed an increase in survival compared to G1. Even with a Th2-type induction, the supplemented feed appears to have contributed to an improvement in the innate immune response. For future perspectives, the production of pro-inflammatory cytokines and other immunomodulatory applications are expected to be analyzed.

Keywords: Immunogenicity, Neuramidase, Humoral, Cellular

Lista de Abreviaturas

ANOVA – Analysis of Variance (Análise de Variância)

API – Analytical Profile Index (Índice de Perfil Analítico)

BCA – Bicinchoninic Acid (Ácido Bicinconínico)

BHI - Brain and Heart Infusion (Infusão Cérebro Coração)

DL – Dose Letal

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

D.O. – Densidade Óptica

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima)

h – Hora

H₂O₂ – Água Oxigenada

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ – Interferon Gama

IgG – Imunoglobulina G

IL- β – Interleucina beta

IL-6 – Interleucina 6

IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kDa – Quilodalton

LB – Luria-Bertani

LC – Linfadenite Caseosa

M – Molar

mg – Miligrama

min – Minuto

mL – Mililitro

mM – Milimolar

NaCl – Solução Salina

NanH – Neuraminidase H

ng – Nanograma

°C – Grau Celsius

OPD – o-Phenylenediamine Dihydrochloride (Ortofenilenodiamina)

PBS – Phosphate-Buffered Saline (Tampão Salina-Fosfato)

PBS-T – Phosphate-Buffered Saline with Tween 20 (Tampão Salina-Fosfato com Tween 20)

PEG – Polietilenoglicol

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLD – Phospholipase D (Fosfolipase D)

rpm – Revolutions per minute (Rotações por Minuto)

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio)

TNF- α – Tumour Necrosis Factor Alpha (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

x – Vezes

μ L – Microlitro

Sumário

Resumo	8
Abstract	9
Lista de Abreviaturas	10
Sumário	12
1. Introdução Geral	14
2. Revisão Bibliográfica.....	17
2.1 Ovinocaprinocultura	17
2.2 Linfadenite caseosa	18
2.2.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	18
2.2.2 Epidemiologia e Transmissão	19
2.2.3 Patogenicidade, Virulência e Imunologia	20
2.2.4 Diagnóstico	23
2.2.5 Tratamento e Profilaxia	25
2.3 Vacinas Comerciais.....	26
2.4 Vacinas Experimentais.....	27
2.4.1 Vacinas de Subunidade	28
2.5 <i>Hermetia illucens</i>	29
2.5.1 Larva como alimento.....	30
2.5.2 Componentes imunomoduladores	31
3. Hipótese e Objetivos	33
3.1 Hipótese.....	33
3.2 Objetivo geral	33
3.3 Objetivos específicos	33
4. Capítulos	34
4.1 Manuscrito 1 - Immune response and protection against caseous lymphadenitis of mice immunized with rNanH subunit vaccine and supplemented with <i>Hermetia illucens</i>	34
Abstract	35
Introduction.....	36
Results	37
Discussion	38

Conclusion.....	41
Materials and Methods	41
Legends	47
Tables	48
Figures	49
References	52
4.2 Manuscrito 2 - CLARA: An R script for 96-well plate assay reading and analysis.....	57
Abstract	58
Code Metadata.....	59
Introduction.....	59
Methods and Implementation	60
Software demonstration	61
Software Impact	62
Conclusion and Future Perspectives	62
Legends	64
Figures	65
References	70
5. Conclusão Geral	71
6. Referências Bibliográficas.....	72

1. Introdução Geral

A ovinocaprinocultura se caracteriza pela criação de pequenos ruminantes, ovinos e caprinos, possuindo uma grande importância comercial mundialmente (Periasamy *et al.*, 2017). Esse segmento da pecuária representa grande parte da renda de pequenos produtores rurais, visto que esses ruminantes conseguem usufruir de diversos recursos naturais considerados inadequados para criação de outras espécies (Aguirre-Riofrio *et al.*, 2020). Ademais, a ovinocultura possui grande importância na produção de carne e lã, tendo significativa contribuição na economia local de produtores (Kurukulasuriya *et al.*, 2022). Entre as práticas agropecuárias brasileiras, a criação de pequenos ruminantes é uma das mais antigas e está em constante crescimento (Bertuzzi *et al.*, 2022). Entretanto, diversos fatores impactam negativamente a ovinocaprinocultura, como doenças bacterianas, que levam a grandes prejuízos aos produtores (Dudek *et al.*, 2022).

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente etiológico da Linfadenite Caseosa (LC), que acomete pequenos ruminantes mundialmente (Yaacob *et al.*, 2021). A doença é caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos superficiais, se manifestando usualmente na região submandibular e glândula parótida, ou internos, sendo frequentes nos pulmões e região mediastinal (Dorella, Fernanda Alves *et al.*, 2006). É um patógeno gram-positivo intracelular facultativo, se apresentado de forma pleomórfica, com características β -hemolítica, em formato de cocos ou bastonetes filamentosos (Guimarães *et al.*, 2011). Devido a fatores epidemiológicos e condições sanitárias precárias, a grande taxa de disseminação da LC leva a uma necessidade de controle da doença (Windsor, 2011).

O controle da LC é dificultado pela sua natureza crônica e subclínica, levando a uma alta prevalência mundial (Baird; Fontaine, 2007). A disseminação dentro do rebanho acaba ocorrendo de forma elevada devido a práticas de manejo irregulares, juntamente com o descarte incorreto de resíduos contaminados (Guimarães *et al.*, 2011). A contaminação dos rebanhos pela *C. pseudotuberculosis* leva a diminuição da produção de carne, lã e leite, além de acarretar a condenação de carcaças e peles (Faccioli-Martins; Alves; Pinheiro,

2014). Já foi relatado a presença desse agente patogênico em diversos países, como Egito (Magdy Selim *et al.*, 2022), República Tcheca (Markova *et al.*, 2024) e Brasil (Alves, José Romero Alexandre *et al.*, 2020).

Ao redor do mundo, a perda econômica relacionada a infecção por *C. pseudotuberculosis* vem sendo relatada como um fator agravante para a busca de novas pesquisas (Dorella, Fernanda Alves *et al.*, 2006). No Brasil a prevalência clínica da *C. pseudotuberculosis* supera os 30%, sendo encontrado frequentemente em animais de pequeno porte (Aquino De Sá *et al.*, 2018; Alves, José Romero Alexandre *et al.*, 2020). Para a diminuição de infecções por LC se faz necessário a utilização de vacinas disponíveis comercialmente (Guimarães *et al.*, 2011).

As vacinas disponíveis no mercado são baseadas em tecnologias da vacinologia tradicional, como bacterinas, toxóides e bactérias vivas atenuadas (De Pinho *et al.*, 2021). Apesar da ampla disponibilidade de vacinas comerciais, a proteção oferecida por elas acaba sendo incompleta, deixando os animais sob risco de desenvolverem abscessos superficiais e profundos (Sohier *et al.*, 2017). Tendo isso em vista, diversas estratégias estão sendo exploradas e aprimoradas para melhorar os níveis de proteção vacinal (De Pinho *et al.*, 2021).

Entre as técnicas de vacinação experimentais desenvolvidas podemos destacar as vacinas vivas atenuadas, levando a uma resposta imune humoral gerada por uma cepa naturalmente atenuada de *C. pseudotuberculosis* (Vale *et al.*, 2016). Entre as formulações vacinais experimentais, aquelas que utilizam subunidades proteicas recombinantes estão emergindo como estratégias promissoras, devido a sua capacidade de ativar uma resposta imunológica Th1 (Droppa-Almeida *et al.*, 2021). Em uma vacina contendo a proteína rCP09720, se observou elevados níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a, além de demonstrar uma taxa de proteção de 58,3% (Brum *et al.*, 2017). Considerando as vantagens na utilização de antígenos recombinantes, se faz necessário o uso de proteínas específicas de *C. pseudotuberculosis* (Scholl *et al.*, 2023).

A proteína neuramidase H (NanH) é considerada um fator de virulência em bactérias patogênicas (Brown, Corrie C; Olander; Alves, 1987; Ziech *et al.*, 2019). Também conhecida como sialidase, a NanH reconhece e remove ácidos

siálicos da superfície celular hospedeira, auxiliando na invasão bacteriana (Llanco; Nakano; Avila-Campos, 2015). Em certos casos, sialoconjugados podem ser incorporados pelo patógeno, disfarçando seus antígenos e evitando reconhecimento pelo sistema imunológico (Santana-Jorge *et al.*, 2016).

Além da utilização das proteínas recombinantes, a suplementação alimentar a partir de insetos já demonstrou induzir uma resposta imune adaptativa em diversos animais, como frangos de corte e tilápia (Devic *et al.*, 2018; De Souza Vilela *et al.*, 2021). Dentre os insetos usados na suplementação, se destaca a larva de *Hermetia illucens* como uma das melhores alternativa devido ao seu pequeno ciclo de vida, alto número de ovos e condições de criação simplificada (Müller; Wolf; Gutzeit, 2017). A *H. illucens* necessita de adaptações em seu sistema imune devido a sua alimentação diversificada, imprevisível e repleta de diversos tipos de contaminações bacterianas (Vilcinskas, 2013). Já foi demonstrado três partes cruciais da larva para uma resposta imunomodulatória, sendo esses os peptídeos antimicrobianos (PAMs), ácido dodecanoico e a quitina (Koutsos; Modica; Freel, 2022).

Nesse contexto, objetiva-se melhorar a resposta imune humoral de camundongos Balb/c a utilizando as vacinas de subunidade contendo a proteína NanH recombinante, em conjunto com uma alimentação suplementada com *H. illucens*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Ovinocaprinocultura

A ovinocaprinocultura compreende a criação de ovinos e caprinos, com a finalidade de obter produtos como carne, leite e lã (Teixeira *et al.*, 2020). A criação destes pequenos ruminantes apresenta características atrativas, especialmente pela capacidade dos ovinos de se adaptarem a uma ampla variedade de sistemas de produção, bem como a diferentes condições ambientais, incluindo regiões úmidas e áridas (Bhatt; Abbassi, 2021). Caprinos compartilham certas características de criação, podendo ocupar locais com baixa disponibilidade nutritiva, regiões montanhosas e regiões áridas e semiáridas (Simões *et al.*, 2021). Mundialmente a ovinocaprinocultura conta com aproximadamente 1.173 milhões e 1.003 milhões cabeças de ovinos e caprinos, respectivamente (Mazinani; Rude, 2020).

A produção de pequenos ruminantes em países em desenvolvimento tem demonstrado diversos impactos econômicos positivos na última década. Em regiões como o Sudeste Asiático, por exemplo, a ovinocaprinocultura tem contribuído significativamente para o aumento da renda familiar e para o fortalecimento da segurança alimentar (Bush, 2024). De forma semelhante, na América Latina e no Caribe observa-se um crescimento na população de caprinos, refletindo a valorização dessa atividade em áreas com condições adversas. Por outro lado, a população de ovinos nessas regiões apresentou uma tendência de redução, possivelmente associada a fatores como preferências de mercado, manejo e adaptação ambiental (Meza-Herrera *et al.*, 2022). No Brasil, o manejo desses animais é considerada uma das práticas pecuárias mais tradicionais, apresentando crescimento contínuo nos últimos anos (Bertuzzi *et al.*, 2022).

O Brasil possui atualmente um rebanho de 21,5 milhões de ovinos e um rebanho de 12,3 milhões de caprinos, sendo o Nordeste responsável por aproximadamente 48,2 % e 65,8 % de ovinos e caprinos, respectivamente (IBGE, 2023). Dentre os estados nordestinos, o Sergipe demonstrou que a criação de caprinos ocorre majoritariamente por pequenos produtores rurais (Carvalho *et al.*, 2020). No Piauí, os sistemas extensivos de criação predominam,

com algumas práticas de saúde implementadas (Silva, R.A.B. *et al.*, 2011). Dentro do estado do Rio Grande do Sul a distribuição geográfica de ovinos se concentra nas regiões Sudoeste e Sudeste, já os caprinos se encontram bem distribuídos em todas as regiões do estado (SEPLAG/RS, 2020). Nos últimos anos, tem-se visto uma profissionalização maior juntamente com melhores condições sanitárias (Guimarães *et al.*, 2011). Contudo, desafios persistem, incluindo deficiências na gestão de alimentação e na adoção de novas tecnologias, além da prevalência de infecções patogênicas (Carvalho *et al.*, 2020; Dudek *et al.*, 2022). Dentre as diversas infecções que acometem esses rebanhos, a Linfadenite caseosa é uma enfermidade que resulta em grandes perdas econômicas (Brundage; Burmahan, 2021).

2.2 Linfadenite caseosa

A Linfadenite caseosa (LC) gera perdas econômicas significativas nos rebanhos tanto de formas diretas, pela condenação de carcaças, redução na produção de leite e lã, quanto de formas indiretas pelo aumento nos custos de cuidados veterinários. Essa doença se apresenta na forma de abscessos nos órgãos e em linfonodos periféricos e viscerais do animal infectado (Singh *et al.*, 2014; Dopud *et al.*, 2024). Essa enfermidade infecciosa crônica em pequenos ruminantes é causada pela *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Baird; Fontaine, 2007).

2.2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

C. pseudotuberculosis são bactéria Gram-positivos, imóveis, intracelulares facultativas, não-esporulantes, que se manifestam em filamentos ou cocos com tamanho entre 0,5 µm – 0,6 µm por 1,0 µm – 3,0 µm. A bactéria é anaeróbica facultativa, com crescimento ideal a uma temperatura de 37 °C e um pH entre 7,0 e 7,2. Em meio sólido, se apresentam de forma seca e com uma coloração pálida e frágil, já em meio líquido ocorre a formação de aglomerações granulosas (Dorella, Fernanda Alves *et al.*, 2006; Baird; Fontaine, 2007; Guedes *et al.*, 2015; Parise *et al.*, 2021).

O patógeno é classificado em dois biovars, biovar equi, acometendo em sua maioria cavalos, causando a infecção denominada de linfangite

ulcerativa, e o biovar ovis, que se apresenta em ovinos e caprinos (Guimarães *et al.*, 2011). A classificação de cada biovar é definida pelas suas propriedades bioquímicas. O biovar equi é nitrato redutase positiva e apresenta sensibilidade a estreptomicina, já o biovar ovis por outro lado não consegue fazer a redução de nitrato a nitrito e apresenta resistência a estreptomicina (Barba *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2022). Ambos os biovars são urease e catalase positivas e fermentam glicose e ribose, sem apresentar a produção de gases como produto, e ambos não conseguem digerir caseína e hidrolisar gelatina (Muckle; Gyles, 1982). Cerca de 80% dos isolados conseguem fermentar maltose, mas não outros carboidratos, como manose, sacarose e lactose (Guedes *et al.*, 2015).

A *C. pseudotuberculosis* acomete diversos hospedeiros além de caprinos e ovinos, tais como búfalos, camelídeos, bovinos e humanos (Gomide *et al.*, 2018). Mesmo que sua ocorrência em humanos seja rara, é importante reconhecer o seu potencial zoonótico e adotar precauções ao manusear animais contaminados (Williamson, 2001). Mundialmente, diversas regiões com grandes rebanhos de ovinos e caprinos demonstram a presença deste agente etiológico (Ramos *et al.*, 2022).

2.2.2 Epidemiologia e Transmissão

A prevalência mundial de LC já foi demonstrada em diversos estudos (Fu *et al.*, 2022). A distribuição global de *C. pseudotuberculosis* reflete na distribuição global de rebanhos de pequenos ruminantes, sendo identificadas na Europa, Austrália, América do Sul e do Norte, África e Oriente Médio (Mathewos; Fesseha, 2022). A LC é frequentemente subnotificada em diversos países, uma vez que não há notificação oficializada. Além disso, muitos criadores desconhecem as implicações econômicas da enfermidade e diante da detecção de abscessos superficiais nos animais, deixam de buscar orientação veterinária, o que contribui para a disseminação da doença nos rebanhos (Abebe; Sisay Tessema, 2015).

No Brasil, a doença se encontra de forma endêmica em algumas regiões do país, sendo frequentemente encontrado em caprinos e ovinos deslanados, com uma prevalência clínica que supera os 30% (Aquino De Sá *et al.*, 2018; Alves, José Romero Alexandre *et al.*, 2020). No Nordeste do país, um estudo

encontrou uma prevalências em ovinos a nível de rebanho de 93,88% e a nível de animal de 37,46% (Alves, José Romero Alexandre *et al.*, 2020). Foi observada uma prevalência sorológica igualmente elevada em rebanhos de caprinos no estado de Minas Gerais, em que 78,9% dos animais tiveram uma resposta sorológica positiva e 98% dos rebanhos possuíam pelo menos um animal soropositivo (Seyffert *et al.*, 2010). Outro estudo no Nordeste reportou 37,9% de soropositividade em caprinos vendidos em feira de animais (Farias *et al.*, 2018). Os fatores associados à prevalência da LC incluem as práticas de gestão e as fontes de água (Alves, José Romero Alexandre *et al.*, 2020).

A LC manifesta em um rebanho quando um animal infectado é introduzido a um grupo saudável, permitindo a rápida disseminação da bactéria (Guimarães *et al.*, 2011). A infecção normalmente se dá por feridas superficiais, que podem ocorrer durante procedimentos rotineiros como tosquia ou castração, até ferimentos causados por outros incidentes traumáticos podem causar disseminação, permitindo que ovinos contaminados transmitam a bactéria ao resto do rebanho (Ruiz *et al.*, 2020).

Além disso, outra característica importante do *C. pseudotuberculosis* é a sua capacidade de sobreviver no ambiente em diferentes temperaturas, com capacidade patogênica até três semanas na palha, dois meses no feno, quatro meses em tendas de tosquia e mais de oito meses no solo, além disso, a bactéria já foi detectada após cinco meses em locais contaminados com pus oriundo de abscessos dos animais contaminados (Guimarães *et al.*, 2011; Torky *et al.*, 2023).

2.2.3 Patogenicidade, Virulência e Imunologia

Mesmo que a patogenia do *C. pseudotuberculosis* na ovinocaprinocultura ainda não tenha sido completamente elucidada, os fatores de virulência essenciais implicados nesse processo já foram reconhecidos pelas suas funções cruciais de evasão do sistema imune do hospedeiro, adesão, invasão, colonização e propagação (Guedes *et al.*, 2015). Após se estabelecer no hospedeiro, esse patógeno evade o sistema imune com relativa facilidade, resultando em infecções crônicas que persistem pela maior parte, ou até toda a vida do animal (Silva, *et al.*, 2017).

Após a infecção, o patógeno se dissemina de forma livre, ou dentro de macrófagos, através do sistema linfático aferente, até linfonodos locais e órgãos internos (Guimarães *et al.*, 2011). Esse processo de disseminação se dá pela habilidade do patógeno de infectar macrófagos, induzir morte celular e liberar novas bactérias (Barral *et al.*, 2022). A bactéria é capaz de se multiplicar dentro do macrófago e sobreviver à ação de enzimas do fagolisossomo por mais de 48h devido a presença de uma camada lipídica externa (Stefańska *et al.*, 2010; Guimarães *et al.*, 2011).

Além de servir como uma barreira física, os lipídeos de superfície auxiliam na adesão e facilitam a citotoxicidade localizada (De Oliveira Zamproga *et al.*, 2021). Também, já foi relatado na literatura, uma correlação direta entre a proporção de lipídeos de superfície e o desenvolvimento de abscessos crônicos (Muckle; Gyles, 1982).

O transporte do patógeno até o linfonodo drenante que ocorre através de fagócitos ou diretamente através da corrente sanguínea, resulta na formação de lesões em outros tecidos do hospedeiro (Selim *et al.*, 2021). O sistema imunológico do hospedeiro busca limitar a proliferação de bactérias nos macrófagos através do desenvolvimento de piogranulomas, encapsulando células infectadas por *C. pseudotuberculosis* (Lopes Bastos, 2012).

A fosfolipase D (PLD), pertencente ao grupo das fosfolipases heterogêneas, é considerada um dos fatores de virulência mais importante da *C. pseudotuberculosis* devido à sua capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações ésteres no glicerol fosfolipídico (Baird; Fontaine, 2007; Leal *et al.*, 2018). Além disso, desempenha um papel crucial na propagação da bactéria do local inicial da infecção para outros tecidos do corpo (Guedes *et al.*, 2015).

Além dos lipídios de parede celular e PLD, as proteínas carreadoras de ferro também são fatores de virulência importantes desse patógeno, onde um óperon composto por quatro genes, (*fag*) A, B, C e D, trabalha em conjunto com o gene *p/d* para adquirir ferro, uma função essencial, devido a sobrevivência e proliferação desse patógeno dentro de macrófagos (Billington *et al.*, 2002; Sá, Maria Da Conceição Aquino De *et al.*, 2013). A produção de biofilmes é outro fator de virulência crucial que contribui para a persistência da infecção. Esses agregados de microcolônias, aderem às superfícies biológicas, fator

potencialmente atrelado a sua resistência a antimicrobianos e biocidas. Os lipídios superficiais são responsáveis pela organização do biofilme, e a quantidade desses lipídios na membrana celular está diretamente ligada à espessura do biofilme desenvolvido e à virulência da cepa bacteriana (Jolly, 1966; Guedes *et al.*, 2015).

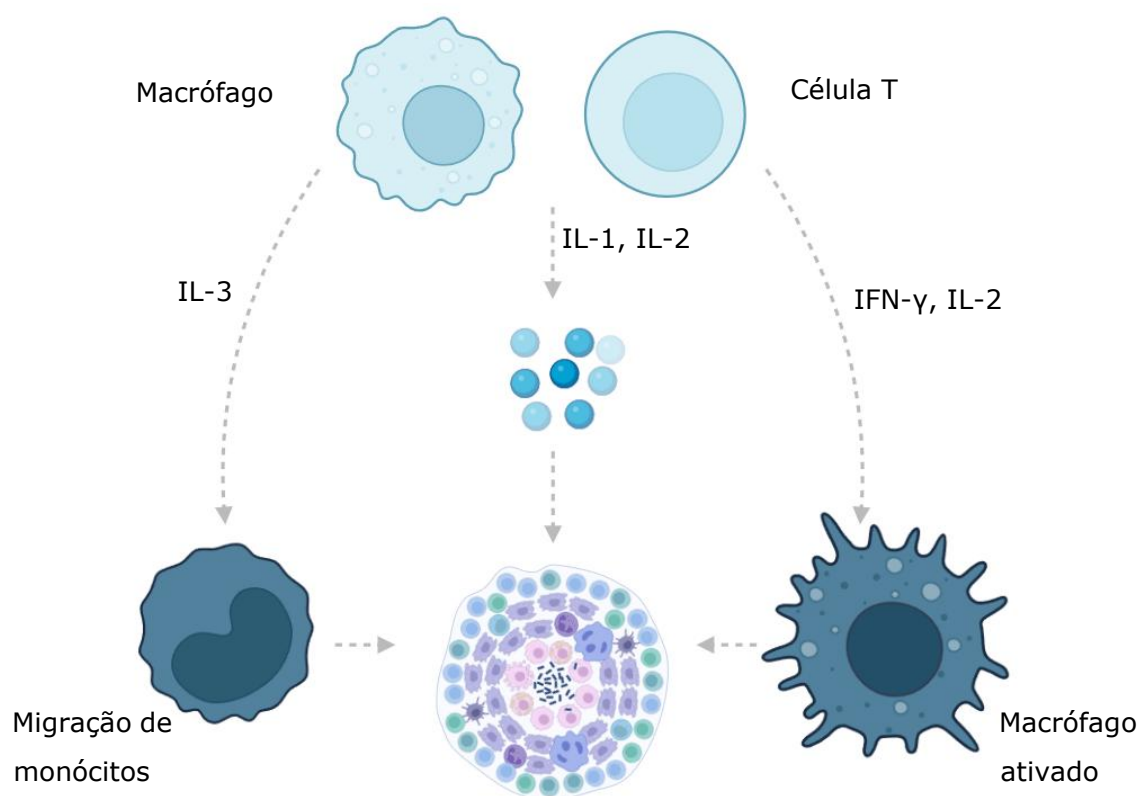


Figura 1: Esquema simplificado demonstrando a ação imunológica que ocorre na formação de piogranuloma. Fonte: autoria própria.

A infecção por *C. pseudotuberculosis* é marcada por três estágios distintos, o estágio inicial, o estágio de amplificação e o estágio de estabilização (Pepin *et al.*, 1992). O primeiro estágio dura de 1 a 4 dias e se inicia no primeiro contato do patógeno com o organismo, em que ocorre o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e para a drenagem linfonodal. O segundo estágio, ocorrendo de 5 a 10 dias, é marcada pelo desenvolvimento do piogranuloma, estrutura de camada espessa composta por células e tecidos fibrosos, envolvendo células hospedeiras infectadas, para conter a multiplicação de *C. pseudotuberculosis*. A fase de estabilização ocorre após 10 dias e é caracterizada pela maturação e resistência do piogranuloma. Além disso, o

período prolongado de incubação da doença, que pode durar de 3 a 20 semanas, apresenta um desafio significativo no manejo de rebanhos, dificultando a separação entre animais saudáveis e infectados, tornando praticamente impossível a erradicação da doença (Hodgson *et al.*, 1994; Seyffert *et al.*, 2010; Lopes Bastos, 2012).

A resposta do sistema imunológico do hospedeiro à infecção por *C. pseudotuberculosis* é multifacetada e engloba mecanismos associados às respostas imunes inatas e adaptativas (Guimarães *et al.*, 2011). Após a infiltração bacteriana, as células imunes, incluindo neutrófilos e macrófagos, são recrutadas para o local da infecção, dando início a sinalização para o desenvolvimento da resposta adaptativa (Droppa-Almeida *et al.*, 2021). Os neutrófilos desempenham um papel crítico nos estágios iniciais da infecção, enquanto o número de macrófagos no local da infecção aumenta significativamente ao longo do tempo (Torky *et al.*, 2023). Pesquisas demonstraram a contribuição significativa das citocinas TNF- α e IFN- γ no desenvolvimento da resposta imune, pois facilitam a ativação de macrófagos a partir do local da infecção. As citocinas IL-1 β e IL-6, também desempenham um papel ativo contra a infecção (Dorella, Fernanda A *et al.*, 2009; Jesse *et al.*, 2016).

A formação de piogranulomas está intimamente relacionada às respostas Th1 e Th2, onde macrófagos e neutrófilos produzem citocinas que auxiliam na estabilização do piogranuloma e na prevenção da disseminação bacteriana (Lopes Bastos, 2012). Enquanto o patógeno é facultativo intracelular, uma resposta Th1 é ideal devido à capacidade do microrganismo de sobreviver dentro dos fagócitos. Estudos sugerem que uma resposta imune mista, incluindo níveis significativos de INF- γ e células citotóxicas, proporcionaria ótima proteção contra *C. pseudotuberculosis*. Uma resposta humoral por si só é insuficiente para proteger o hospedeiro (Guimarães *et al.*, 2011; Lopes Bastos, 2012).

2.2.4 Diagnóstico

Apesar dos avanços na ovinocaprinocultura, ainda existem fatores que dificultam o crescimento dos rebanhos, como a inadequação das práticas de manejo, em condições sanitárias precárias e altos níveis de morbidade, que

auxiliam na disseminação da LC, tornando de grande importância o diagnóstico rápido e preciso da doença (Windsor, 2011; Brundage; Burmayan, 2021).

O diagnóstico pode ser realizado através de um exame clínico do animal para confirmar a presença de abscessos (Selim *et al.*, 2021). Durante o exame, também são considerados a presença de febre, inapetência e emaciação, além do aspecto macroscópico dos exsudatos presentes no interior dos abscessos. (Motta; Cremasco; Ribeiro, 2010). A identificação de *C. pseudotuberculosis* é fundamental, uma vez que outros patógenos também podem levar à formação de abscesso em pequenos ruminantes. Os piogranulomas causados pelo microrganismo devem ser diferenciados das lesões causadas por bactérias como *Actinobacillus lignieresii* (actinobacilosis), *M. tuberculosis* (tuberculosis), *Staphylococcus aureus* e *Actinomyces pyogenes* (Alves, Francisco Selmo Fernandes; Pinheiro, 1997; Guimarães *et al.*, 2011).

Atualmente, também é utilizado para o diagnóstico de LC a realização do isolamento do microrganismo por meio de cultura bacteriológica. Porém, a punção do material caseoso pode levar a contaminação do ambiente, representando um grande risco de transmissão para o resto do rebanho (Baird; Fontaine, 2007; Silva, Wanderson M. *et al.*, 2017).

O método de diagnóstico mais utilizado em escala comercial é o sistema API Coryne, sendo reconhecido pela sua rapidez e praticidade, e se baseia na realização de 21 testes bioquímicos a partir do pus do animal infectado. No entanto, a aplicação do método é limitada, uma vez que alguns animais acometidos apresentam lesões internas assintomáticas, dificultando a coleta de amostras clínicas. (Soto; Zapardiel; Soriano, 1994; Barral *et al.*, 2022). Testes sorológicos também podem ser efetuados, os quais incluem a inibição da antihemolisina (Brown, Corrie C; Olander; Alves, 1987), aglutinação em tubo (Cameron *et al.*, 1972), hemaglutinação indireta (Shigidi, 1979), ensaio de microaglutinação (Menzies, Paula I; Muckle, 1989), detecção de interferon gama (IFN- γ) por imunoensaio enzimático (ELISA) (Menzies, P.I; Hwang; Prescott, 2004) e ELISA utilizando células bacterianas, toxinas, sobrenadantes de cultura ou proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis* (Ter Laak *et al.*, 1992; Dercksen *et al.*, 2000; Seyffert *et al.*, 2010).

A falta de métodos de detecção definitivos dificulta a erradicação da LC (Dorella, Fernanda Alves *et al.*, 2006). Sendo extremamente necessário o desenvolvimento de técnicas de tratamento eficazes para prevenir a disseminação desse agente infeccioso (Alves, José Romero Alexandre *et al.*, 2020).

2.2.5 Tratamento e Profilaxia

O tratamento da LC depende da manifestação clínica da doença. Para os casos cutâneos, a abordagem primária é realização de drenagem estéril dos abscessos externos dos animais antes da ruptura, evitando a contaminação do ambiente e dos manipuladores (Yitagesu *et al.*, 2020). Após o procedimento, é importante limpar e cauterizar as feridas com iodo a 10%, e todos os equipamentos cirúrgicos devem ser desinfetados antes e após o procedimento. Ferramentas descartáveis utilizadas durante o procedimento devem ser incineradas e enterradas após a sua utilização (M. A. Saeed; B. Alharbi, 2014). Tais procedimentos apresentam limitações, uma vez que podem representar risco de contaminação para terceiros e não são aplicáveis em formas viscerais da doença (Guedes *et al.*, 2015).

Embora *C. pseudotuberculosis* cultivada *in vitro* tenha demonstrado suscetibilidade a antibióticos como penicilina, tetraciclina e cefalosporina, a sua eficácia *in vivo* é limitada (Terab *et al.*, 2021). Isso ocorre devido a espessa camada de material caseoso que se forma ao redor das células infectadas, dificultando a ação desses antibióticos (Delgado Duno *et al.*, 2015). O biofilme produzido pela bactéria também acaba sendo um fator que diminui a efetividade dos antibióticos (Sá, Maria Conceição Aquino De *et al.*, 2021).

Dessa forma, o tratamento com antibióticos pode ser dispendioso e propenso a falhas para o produtor, por necessitar de altas concentrações e longos períodos de administração, sem a garantia de efetividade. Sendo assim, medidas profiláticas, como inspeções regulares do rebanho, separação dos animais infectados, limpeza das instalações e vacinação, são necessárias para evitar a propagação da LC dentro de um rebanho (Guedes *et al.*, 2015).

Tendo isso em vista, a vacinação tem se mostrado como a medida profilática mais eficaz, já que uma vez vacinados, o sistema imune do animal possui anticorpos específicos que combatem o agente infeccioso de forma mais rápida e eficaz, interrompendo a progressão da doença (Bezerra *et al.*, 2021; Dorella *et al.*, 2006).

2.3 Vacinas Comerciais

Atualmente, as vacinas para LC disponíveis comercialmente em alguns países se baseiam nas tecnologias de vacinologia tradicional, incluindo toxóides, bacterinas e bactérias vivas atenuadas (De Pinho *et al.*, 2021). LinfoVac® e 1002 são suspensões de *C. pseudotuberculosis* liofilizadas, vivas e atenuadas. O LinfoVac® é amplamente utilizado em caprinos e ovinos, enquanto o 1002 foi desenvolvido pela Companhia de Desenvolvimento Agrícola da Bahia, e é aprovado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento para produção e comercialização em todo o Brasil (Dorella *et al.*, 2009; De Pinho *et al.*, 2021).

Outra vacina amplamente disponível se denomina de Glanvac®, contendo antígenos de múltiplos componentes de diferentes bactérias, incluindo *Clostridium perfringens* tipo D, *Cl. Tetani*, *Cl. Novyi* tipo B, *Cl. Septicum* e *C. pseudotuberculosis* fosfolipase D inativada por formalina, utilizando do adjuvante de Freund incompleto. A vacinação por Glanvac® estimula a produção de anticorpos, protegendo os animais contra as bactérias incluídas na sua formulação. Notavelmente, também pode ser administrado a fêmeas grávidas, e atualmente, existem nove variantes dessa vacina disponíveis no mercado (Faccioli-Martins; Alves; Pinheiro, 2014; BULA GLANVAC, 2021; Smith; Sherman, 2022).

A vacina Biodectin®, desenvolvida por Fort Dodge, é composta por toxóides purificados derivados de várias cepas de bactérias *Clostridium*, incluindo *Cl. Septicum*, *Cl. Novyi*, *Cl. Tetani*, *Cl. Perfringens* tipo D, culturas inativadas de *Cl. Chauvoei*, uma fração de *C. pseudotuberculosis*, e um anti-helmíntico chamado moxidectina. Por outro lado, a vacina Caseous D-T® da Colorado Serum Co. combina uma bacterina e um toxoide de *C. pseudotuberculosis* com dois toxóides clostridianos (*Cl. Perfringens* tipo D e *Cl. Tetani*), enquanto a vacina Case-Bac® também da Colorado Serum Co. utiliza o

toxóide e a bacterina de *C. pseudotuberculosis*, mas sem os toxóides clostridianos (Dorella *et al.*, 2009; De Pinho *et al.*, 2021).

Embora diversas vacinas estejam disponíveis comercialmente, nenhuma delas confere proteção completa contra a LC, e animais vacinados ainda podem desenvolver abscessos superficiais e profundos (Sohier *et al.*, 2017). Além disso, essas vacinas podem resultar em efeitos adversos como febre, letargia, redução da produção de leite e requerem múltiplas doses para alcançar proteção, necessitando também de um reforço anual para manter a sua eficácia (Dorella *et al.*, 2009; De Pinho *et al.*, 2021).

Para criar uma vacina eficaz para a LC, várias estratégias têm sido exploradas além do aprimoramento das tecnologias existentes. Entre essas estratégias destaca-se o uso de cepas inativadas de *C. pseudotuberculosis*, frações celulares bacterianas contendo antígenos, vacinas de DNA, vacinas vetorizadas e formulações contendo proteínas recombinantes (Dorella *et al.*, 2009; De Pinho *et al.*, 2021).

2.4 Vacinas Experimentais

Entre estratégias desenvolvidas, um estudo contendo uma vacina vetorizada utilizando do Bacillus Calmete-Guérin recombinante (rBCG) para expressar antígenos da *C. pseudotuberculosis* demonstrou níveis estatisticamente significativos de INF- γ e IL-10, citocinas que indicam uma resposta imune celular contra o patógeno (Leal *et al.*, 2018). Além disso, uma vacina toxóide eficaz foi desenvolvida utilizando toxina derivada de *C. pseudotuberculosis*, demonstrando-se capaz de induzir uma imunidade protetora em animais desafiados através da resposta de linfócitos específicos (Syame *et al.*, 2018).

As vacinas vivas atenuadas são outro exemplo de estratégia de vacinação. Um estudo demonstrou uma cepa atenuada de *C. pseudotuberculosis* capaz de induzir resposta imune humoral e celular em camundongos BALB/c (Vale *et al.*, 2016). Um estudo mostrou uma resposta imune fraca e de curta duração foi induzida, mostrando apenas 16,6% de

proteção e induzido somente a produção de IFN- γ em vacinas de DNA (Brum *et al.*, 2017).

Outro estudo realizado utilizou o alvo cp1002_RS01850 de *C. pseudotuberculosis*, e embora a vacina tenha gerado níveis de IgG totais estatisticamente significativos, não foi capaz de conferir proteção em animais desafiados pela cepa virulenta MIC-6 do patógeno (Rezende *et al.*, 2020). Várias formulações de vacinas utilizando subunidades proteicas têm emergido como estratégias promissoras devido a sua capacidade de ativar tanto a resposta do tipo Th1 quanto a geração de linfócitos T citotóxicos (Droppa-Almeida *et al.*, 2021).

2.4.1 Vacinas de Subunidade

As proteínas recombinantes rSodC e rPLD já foram utilizadas em uma vacina de subunidade, demonstrando uma produção significativa de anticorpos IgG imediatamente após a primeira imunização com rSodC, enquanto a rPLD induziu uma produção substancial de IgG 30 dias após o desafio. (Moreira *et al.*, 2022). Outro estudo produziu uma vacina contendo a proteína recombinante CP09720, em que a esterase recombinante foi capaz de gerar níveis elevados de anticorpos IgG1 e IgG2a, atingindo uma taxa de proteção de 58,3% (Brum *et al.*, 2017).

Um estudo realizado em 2018 por SILVA e colaboradores (2018), demonstrou a tecnologia de vacinas recombinantes, no qual rCP01850 e rCP09720 foram utilizados em combinação com rPLD para formar diferentes formulações vacinais. A formulação vacinal composta por rPLD + rCP01850, usando saponina como adjuvante apresentou proteção parcial em 50% dos animais desafiados, além de altos níveis de IgG total. Notavelmente, esse grupo também apresentou alta produção de IgG2a, indicando uma resposta do tipo Th1, caracterizada por aumento da produção de citocinas TNF- α e IFN- γ (Silva, *et al.*, 2018).

Técnicas de bioinformática são amplamente realizadas para facilitar a identificação de potenciais alvos vacinais, oferecendo diversas vantagens como redução do tempo e custo na busca por novos alvos. Uma abordagem que

emergiu desses recursos é a vacinologia reversa, que emprega ensaios *in silico* para identificar novos alvos imunogênicos (Droppa-Almeida; Franceschi; Padilha, 2018).

2.4.1.1 NanH

A proteína NanH, também conhecida como sialidase, é uma neuraminidase bacteriana que possui peso molecular variável entre 55 - 60 kDa, composta por aproximadamente 694 aminoácidos. Contém um peptídeo sinal em sua porção N-terminal e um domínio transmembrana em sua porção C-terminal (Kim *et al.*, 2010; Corrêa *et al.*, 2018).

As sialidases são glicosil-hidrolases que removem resíduos terminais de ácido siálico dos glicoconjugados, e pertencem a uma classe de proteínas encontradas em uma variedade de organismos, incluindo vírus, protozoários e bactérias (Llanco; Nakano; Avila-Campos, 2015). Em bactérias patogênicas, sialidases são consideradas fatores de virulência, pois reconhecem e removem os ácidos siálicos da superfície das células hospedeiras, auxiliando na invasão bacteriana. Essas proteínas também podem desempenhar um papel nutricional, fornecendo ácido siálico como fonte de energia para as bactérias (Ziech *et al.*, 2019). Certos patógenos podem incorporar sialoglicoconjugados e exibi-los às células hospedeiras, e evitando o reconhecimento pelo sistema imunológico. A localização na membrana da *C. pseudotuberculosis* dessa proteína aumenta seu potencial como candidata a vacina, facilitando o reconhecimento de antígenos pelas células imunes (Vimr, 1994; Santana-Jorge *et al.*, 2016).

2.5 *Hermetia illucens*

Além da vacinação, a suplementação a partir de alguns insetos já demonstraram grande potencial imunomodulador devido a presença de alguns compostos bioativos (Mohamed *et al.*, 2024). A mosca soldado-negro, também denominada de *Hermetia illucens*, possui adaptações fisiológicas que permite com que ela seja utilizada em diversas aplicações. A sua larva é capaz de converter com eficiência material orgânico em biomassa (Müller; Wolf; Gutzeit, 2017). O intestino médio da larva, crucial para a plasticidade dietética, compreende regiões distintas com níveis de pH específicos e células especializadas para digestão, absorção e defesa contra uma gama de patógenos

(Bruno *et al.*, 2019). Essas larvas produzem peptídios antibacterianos e têm elevada tolerância a micotoxinas, o que aumenta a sua capacidade de prosperar em diversos substratos (Sverguzova *et al.*, 2021).

As larvas de *H. illucens* apresentam uma notável capacidade de bioconversão de vários tipos de resíduos orgânicos, como resíduos sólidos de ambientes urbanos e agrícolas (De Filippis *et al.*, 2024; Namira; Afifah; Pratama, 2024). Sua eficácia é atribuída a um sistema digestivo altamente adaptável e à uma microbiota associada, que lhes permite processar substratos com diferentes composições de nutrientes (De Filippis *et al.*, 2024). As larvas têm a capacidade de diminuir significativamente a quantidade de resíduos, gerando uma biomassa útil com alto teor de proteínas e lipídios, podendo ser utilizada na alimentação animal (Jucker *et al.*, 2020; Surendra *et al.*, 2020).

2.5.1 Larva como alimento

As larvas de *H. illucens* emergiram como uma promissora fonte alternativa de proteína na produção sustentável de alimentos para animais, particularmente para aves. Estudos demonstraram que a incorporação dessas larvas em dietas de frangos de corte pode melhorar o desempenho de crescimento, a conversão alimentar e o rendimento das carcaças (Salahuddin *et al.*, 2024).

O perfil nutricional das larvas de *H. illucens* é comparável às fontes de proteína convencionais, como a farinha de peixe e a farinha de soja, com alto teor de proteína e um conteúdo equilibrado de lipídeos (Çetingül; Shah, 2022). A farinha desengordurada pode ser incluída até 100 g/kg nas dietas de frangos de corte sem afetar negativamente a qualidade da carne (Gasco *et al.*, 2019).

Os lipídios das larvas estão presentes em grandes quantidades em dois estágios do seu desenvolvimento, no último instar e no pré-pupa, podendo ser utilizados na produção para rações animais (Franco *et al.*, 2021). As larvas também possuem substâncias bioativas com potenciais aplicações imunológicas (Müller; Wolf; Gutzeit, 2017).



Figura 2: Ciclo de vida da mosca *H. illucens* (Silva *et al.*, 2024)

2.5.2 Componentes imunomoduladores

Estudos recentes identificaram vários compostos imunomoduladores nas larvas de *H. illucens* com potenciais aplicações na saúde animal. Foi descoberto um novo polissacarídeo, o dípteros-BSF, em inglês *Black Soldier Feed*, que ativa as respostas imunitárias inatas em macrófagos de camundongos através da sinalização de receptores Toll-like (Ali *et al.*, 2019). Já foram demonstradas diversas partes cruciais da larva para uma resposta imunomodulatória, como os PAMs, ácido dodecanoico e quitina (Koutsos; Modica; Freel, 2022).

Os PAMs são componentes da resposta imune inata dos insetos, que inibem a invasão de suas células por meio da destruição da membrana dos patógenos (Brown, Greg *et al.*, 2008). O ácido dodecanoico apresenta um grande potencial nutricional, além de servir como um inibidor de fatores de virulência, da

formação de biofilme e da membrana (Ruzin; Novick, 2000; Harlystiarini *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020). A quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza, tem como produto a quitosana, que por sua vez já se demonstrou como um agente antibacteriano, através da inibição da proliferação bacteriana (Yu *et al.*, 2019).

O ácido láurico, outro ácido graxo predominante nessas larvas, apresenta grande atividade antimicrobiana (Koutsos; Modica; Freel, 2022). O sistema imunitário robusto da larva, adaptado ao seu habitat rico em micróbios, inclui hemócitos e componentes humorais, como fenoloxidase (Zdybicka-Barabas *et al.*, 2017). Além disso, esses mesmos peptídeos induzidos pela imunização com probióticos a partir da larva mostraram uma forte atividade antibacteriana em concentrações mínimas inibitórias de 150 µg/mL (Choi, Won Hyung *et al.*, 2018).

Estudos em frangos e codornizes demonstraram que o extrato ou a farinha de larvas de *H. illucens* melhorou a imunidade humoral e celular, incluindo um aumento nos níveis de anticorpos, frequência de linfócitos T CD4+ e atividade de lisozima no soro desses animais (Choi, In-Hag *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018). O substrato dessas larvas influenciou as suas propriedades imunoestimulantes, mas aquelas alimentadas com restos de peixe apresentaram uma atividade de lisozima maior no soro das codornizes (Pasotto *et al.*, 2020).

3. Hipótese e Objetivos

3.1 Hipótese

A suplementação com *H. illucens* aumenta a resposta humoral induzida a partir da estratégia vacinal de subunidade recombinante a partir da proteína NanH em camundongos.

3.2 Objetivo geral

Avaliar a proteína rNanH de *C. pseudotuberculosis* expressa em *E. coli* como vacina de subunidade recombinante em conjunto com a ração contendo *Hermetica illucens* para a resposta humoral contra linfadenite caseosa em camundongos.

3.3 Objetivos específicos

- Expressar e purificar a proteína rNanH (pAE/*nanH*) em *E. coli*;
- Produzir ração a partir de *Hermetica illucens*;
- Imunizar camundongos BALB/c com a formulação vacinal;
- Avaliar as respostas imune humoral induzida pela vacina recombinante juntamente com a suplementação da ração de *H. illucens*;
- Avaliar a proteção conferida após desafio com a cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* MIC-6.

4. Capítulos

4.1 **Manuscrito 1 - Effect of *Hermetia illucens* supplementation on immune response and protection against caseous lymphadenitis in mice vaccinated with rNanH**

Manuscrito formatado para revista: BMC One Health Advances

Henrique Goncalves Pegoraro¹, collaborators to be defined, Sibele Borsuk¹

¹Laboratório de Biotecnologia Infecto-parasitária, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil, 96010–900

*Corresponding author: Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Campus Universitário s/n, Prédio 19 –, Pelotas, RS, Brazil, 96010-900. Phone: +55 53 3275 7350. E-mail: sibeleborsuk@gmail.com

Abstract

Caseous lymphadenitis (CLA) is a chronic disease that affects sheep and goats worldwide and is caused by the gram-positive bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*, characterized by the formation of abscesses in lymph nodes. Even established treatment methods are still considered ineffective and expensive, and although vaccination is the best strategy for preventing and controlling CLA, available commercial vaccines have low efficacy and adverse reactions, making it important to search for new targets and vaccine formulations that are safer and more economical. Along with vaccination, the diet based on *Hermetia illucens* presented several bioactive components with immunomodulatory capacity. The present study demonstrates the concentration of specific antibodies after vaccination with recombinant NanH protein in conjunction with a supplemented feed. For this, the rNanH protein was expressed in *E. coli*, purified, and characterized by Western blot. For *in vivo* experimentation 40 Balb/c mice were used, divided into 4 groups, in which group 1 (G1) and group 2 (G2) received 200 μ L of saline solution while group 3 (G3) and group 4 (G4) received two doses of 200 μ L containing 50 μ g of rNanH and 7.5 μ g of saponin as adjuvant. G2 and G4 were under constant supplementation with feed. After 21 days of the second dose, the animals were challenged with the pathogenic strain of *C. pseudotuberculosis* MIC-6. Blood samples were collected for indirect ELISA. To automate statistical analysis, a software called CLARA was developed. G4 had high levels of IgG1 and a decrease in IgG2a when compared to G3. G3 and G4 survival rates were 80% and 70%, respectively, while G2 showed an increase in survival compared to G1. Even with a Th2-type induction, the supplemented feed appears to have contributed to an improvement in the innate immune response.

Keywords: Immunogenicity, Neuramidase, Humoral, Cellular

Introduction

Corynebacterium pseudotuberculosis is the etiological agent of Caseous Lymphadenitis (CLA), which affects small ruminants worldwide (1). The disease is characterized by the formation of abscesses on superficial lymph nodes, or internal lymph nodes, (2). Due to epidemiological factors and poor sanitary conditions, the high rate of CLA spread necessitates strong disease control (3). Around the world, economic losses related to *C. pseudotuberculosis* infection have been reported as a factor necessitating new research (2). In Brazil, the clinical prevalence of *C. pseudotuberculosis* exceeds 30%, and it is commonly found in small ruminants (4,5). To reduce CLA infections, the use of commercially available vaccines is necessary (6).

The vaccines available on the market are based on traditional vaccinology technologies, such as bacterins, toxoids, and attenuated live bacteria (7). Despite the wide availability of commercial vaccines, the protection they offer is incomplete, leaving animals at risk of developing superficial and deep abscesses (8). With this, various strategies have been explored and improved to enhance vaccination protection levels (7).

Among the experimental vaccination techniques developed, we can highlight live attenuated vaccines, leading to a humoral immune response generated by a naturally attenuated strain of *C. pseudotuberculosis* (9). Among experimental vaccine formulations, those using recombinant protein subunits are emerging as promising strategies due to their ability to activate a Th1-type response (10). In a vaccine containing the rCP09720 protein, elevated levels of IgG1 and IgG2a antibodies were observed, with a protection rate of 58.3% [20]. Given the advantages of using recombinant antigens, it is necessary to use specific proteins of *C. pseudotuberculosis* (11).

Neuraminidase H (NanH) protein is considered a virulent factor in pathogenic bacteria (12,13). Also known as sialidase, NanH recognizes and removes sialic acids from the host cell surface, aiding in bacterial invasion (14). In certain cases, sialoconjugates can be incorporated by the pathogen, mimicking its antigens and avoiding recognition by the immune system (15). In addition to the use of recombinant proteins, dietary supplementation using insects has

already been shown to induce an adaptive immune response in various animals, such as broiler chickens and tilapia (16,17).

Among the insects used in supplementation, the larvae of *Hermetica illucens* can be highlighted as one of the best alternatives due to its short life cycle, high number of eggs, and simplified breeding conditions (18). *H. illucens* requires adaptations in its immune system due to its diverse, unpredictable diet, which is full of distinct types of bacterial contamination (19). Three crucial parts of the larvae have been shown to elicit an immunomodulatory response: antimicrobial peptides (AMPs), dodecanoic acid, and chitin (20). Studies in chickens and quails demonstrated that the extract or flour of *H. illucens* larvae improved humoral and cellular immunity, including increased antibody levels, CD4+ T lymphocyte frequency, and serum lysozyme activity in these animals (21,22). The substrate of these larvae influenced their immunostimulatory properties, but those fed with fish remains showed higher lysozyme activity in quail serum (23).

In this context, the goal is to improve the cellular and humoral immune response and the survival of Balb-C mice by using subunit vaccines containing NanH, in conjunction with a diet supplemented with *H. illucens*.

Results

Expression and identity of the rNanH protein

The rNanH protein was expressed in *E. coli* BL21 Star (DE3) and solubilized in 8 M urea for subsequent purification. Both the 12% SDS-PAGE (Figure 1), used to visualize the expression of the rNanH protein (Figure 1A), and the Western blot to confirm its identity (Figure 1B), demonstrated a molecular weight of approximately 58 kDa.

Evaluation of the humoral immune response

The production levels of specific IgG1 are represented in Figure 2, and IgG2a antibodies induced by the recombinant vaccines are represented in Figure

3. The results obtained demonstrated a significant increase compared to the control groups (G1 and G2) in IgG1 levels on days 21 and 42 in the groups containing rNanH (G3) and supplemented rNanH (G4). The rNanH protein group with supplementation (G4) had the highest levels of IgG1 on day 42 when compared to the other experimental groups ($p < 0.05$) (Figure 2A). Regarding the IgG2a isotype, on day 42, the group containing rNanH with supplementation (G4) showed a significant decrease compared to the rNanH group (G3) (Figure 2B).

Protective efficacy against challenge

Following the challenge with a virulent MIC-6 strain of *C. pseudotuberculosis*, the mice were evaluated by endpoint (24) for 40 days. The G3 and G4 groups had 80% and 70% survival rates, respectively. In the control groups, there was a 20% survival rate in group G1 and a 45% survival rate in group G2. Statistical significance was observed between G1 and vaccinated groups (G3 and G4) (Figure 3).

Discussion

Caseous Lymphadenitis (CLA) is a globally distributed disease characterized by abscesses in lymph nodes and caused by *C. pseudotuberculosis*, a gram-positive, intracellular bacterium that survives within macrophages and results in significant economic losses for the global sheep and goat industry (25–27).

In this study, we evaluated the vaccine potential of the *C. pseudotuberculosis* NanH recombinant antigen, and animals were supplemented with feed containing *H. illucens* in the protection against *C. pseudotuberculosis* infection in a mice model (15). Studies have already characterized NanH as a virulence factor important for *C. pseudotuberculosis* clearance (28). This surface protein participates in the adhesion of the pathogen, while also aiding in the immune evasion, by utilizing sialoconjugates (29). These characteristics make NanH a promising target for vaccine development.

Groups G3 and G4 conferred a protection of 80% and 70% respectively, however the control groups G1 and G2 had a survival rate of 10% and 45%, respectively. While there was a statistical difference between G1 compared to G3 and G4, G2 did not demonstrate a statistical difference when compared to these groups. Host genetics play a significant role in animal survival, with studies showing up to 4-log differences in lethal dose between mouse strains (30). Genetic mapping has also identified specific loci associated with resistance to highly pathogenic influenza viruses (30). In carcinogenicity studies, environmental factors, such as room conditions, can also impact tumor rates and survival (31). Studies show that Th1-type responses are associated with resistance to *Trypanosoma cruzi* infection, where Stat4-deficient mice, which had an impaired Th1 response, exhibited increased susceptibility and 100% mortality (32). IL-4-deficient mice, despite showing altered immune responses, did not exhibit changes in parasite survival rates compared to wild-type mice against *Brugia malayi* (33) *H. illucens* larvae meal has been found to enhance immune activities and increase survivability of broiler chickens against *Salmonella Gallinarum* infection (22). These findings suggest a modest modulatory effect of *Hermetia illucens* on the immune response.

IgG subtype production by B cells are closely related to either a Th1 or a Th2 response (34). IgG1 antibodies have a diverse range of effects that play a crucial role in immune responses and are usually associated with a Th2 type response (35). By interacting with Fcγ receptors (FcγRs) on immune cells, they mediate various immunological processes including phagocytosis, cytotoxicity, and modulation of leukocyte activity (36). IgG2a antibodies on the other hand play a crucial role in enhancing immune responses through various mechanisms, being characteristic of a Th1 type response (35). They significantly augment antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by Natural Killer cells (37), while also enhancing antigen-specific IgG1 and IgG2a effect (38).

The results shown in experimental groups G1 and G3 confirm the ability of the recombinant protein to incite a humoral response, when compared to a saline solution, as previously shown by our research group, being highly characteristic of a Th1 response (39). G4 demonstrated significant levels of IgG1 and IgG2a production, and an increase in IgG1 titers on G4 was observed compared to G3,

since a higher production of this specific antibody enhances opsonization and promotes antibody-dependent cytotoxicity (40). Even though IgG2a titers were higher compared to IgG1, G4 showed a slight decrease in this specific antibody production compared to G3, demonstrating a slight shift favoring IgG1 production. Previous studies have demonstrated that a Th1 type response, modulated by IgG2a, is superior given the facultative intracellular nature of *C. pseudotuberculosis* (9). However, evidence suggests that Th2 cytokines can enhance protective type-1 immunity against certain intracellular pathogens, such as *Leishmania* (41). Furthermore, antibodies produced during humoral immune responses play a crucial role in modulating Th1 activation through Fc receptors, facilitating antigen uptake and presentation for improved T-cell responses against pathogens like *Chlamydia* and *Mycobacteria* (42). Consequently, both Th1 and Th2 type responses could be beneficial against facultative intracellular bacterium like *C. pseudotuberculosis*, since cellular immunity is crucial for complete bacterial clearance and a humoral response can significantly impact pathogen elimination (43,44).

Saponin-based adjuvants have shown to be beneficial on certain immune responses, as they stimulate both Th1 immune responses and cytotoxic T-lymphocyte production, making them suitable for various vaccine types (45). These adjuvants can enhance both antibody production and cell-mediated immunity, often at lower doses than other adjuvants (46).

The diverse range of bioactive components present in *H. illucens* have already shown to be beneficial as immunomodulators. AMPs are components of the innate immune response of insects, which inhibit the pathogen invasion by destroying their membrane (47), and can recruit and activate immune cells, such as macrophages, lymphocytes, and dendritic cells, while modulating inflammatory mediators and signaling pathways (48). Chitin, the second most abundant polymer in nature, produces chitosan, which has been shown to be an antibacterial agent, inhibiting bacterial proliferation (49), showing the ability to activate innate and adaptive immune cells, including eosinophils, macrophages, and Th2 lymphocytes (50). Dodecanoic acid has great nutritional potential and serves as an inhibitor of virulence factors, biofilm formation, and cell membrane (51–53). Lauric acid, another predominant fatty acid in these larvae, exhibits

strong antimicrobial activity (20). Other antimicrobial peptides, including cecropins, defensins, and attacins, have demonstrated efficacy against various pathogens *in vitro* and *in vivo* (54).

This study revealed a complex immunomodulatory role for dietary *H. illucens*. While it enhances baseline innate resistance to *C. pseudotuberculosis*, its potent Th2-inducing properties interfere with the generation of an optimal Th1-mediated adaptive immune response. These findings highlight the critical need to evaluate nutritional interventions not in isolation, but in the context of their interactions with specific immunoprophylactic strategies, ensuring that a well-intentioned supplement does not inadvertently compromise targeted disease prevention.

Conclusion

Here we constitute an initial screening aimed at identifying promising applications of *H. illucens* supplementation in conjunction with vaccination, which shows that the supplemented feed appears to have contributed to an improvement in the innate immune response. For future perspectives, the intention is to conduct pro-inflammatory cytokines analyses and further immunomodulatory applications.

Materials and Methods

Cultivation of *Escherichia coli* and *C. pseudotuberculosis*

E. coli BL21 Star (DE3) and TOP10 strains were cultured in liquid Luria-Bertani (LB) medium with agitation or LB-agar for 16 h at 37°C, and ampicillin (100 µg/mL) was added to the *E. coli* culture when necessary. The pathogenic strain of *C. pseudotuberculosis* MIC-6 was cultured in Brain and Heart Infusion Broth (BHI) or BHI-Agar for 48 hours at 37°C with agitation.

Expression and purification of recombinant NanH protein

The recombinant protein expression was performed using the pAE/nanH vector, previously constructed by our group [26], and transformed into *E. coli* BL21 Star (DE3) strain by electroporation. The cultures were induced using 1 mM isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) after they reached an optical density (OD₆₀₀) between 0.6 and 0.8. The recombinant protein was quantified using the BCA Protein Assay kit (Pierce), and its expression was confirmed by Western Blot using the anti-6x-His monoclonal antibody conjugated with peroxidase (Sigma). The purification was performed using affinity chromatography on a nickel HisTrap Sepharose (GE) column.

Preparation of feed containing *Hermetia illucens*

A commercial feed was supplemented with *H. illucens* flour (10% w/w) provided by the Nuinset Biotecnologia Company (Pelotas, RS, Brazil) and distributed to mice in specific groups. For the preparation of this supplemented feed, a homogeneous mixture of the previously ground commercial feed (9 parts) and *H. illucens* flour (1 part) [27] was made, then moistened with distilled water and subsequently converted manually into pellets with a 0.7mm diameter using 10 mL syringes. After the pelleting process, the supplemented feed was kept in a heated incubator (42°C for 24 h) until it was completely dry and then stored at 4°C until use.

Determination of the lethal dose 50 (LD50)

The minimum dose of the agent to induce infection, disease pathology, and manifestation of clinical signs was determined. The lethal dose was calculated by distributing female BALB/c mice into groups of four and infecting them via the intraperitoneal route with serial doses [28]. The dilution that results in the death of 50% of the mice is determined as the LD50, and in the experiment, two times the LD50 is used (CEEA protocol number **004262/2023-04**).

Immunization scheme in mice with recombinant proteins and supplemented diet

In this study, the rNanH protein was used, with saponin as an adjuvant and some groups had their diet supplemented with feed containing *H. illucens* as described in Table 1. The formulations were inoculated into 6- to 8-week-old female Balb/c mice. The animals were divided into four groups of 10 individuals each and were immunized subcutaneously (S.C.) with two vaccine doses at an interval of 21 days between immunizations and received supplemented or standard feed *ad libitum*. Two groups received the supplemented feed. The rNanH protein was inoculated at a concentration of 50 µg per dose. Group 1 (G1) and group 2 (G2) were used as controls and inoculated with 200 µL of sterile saline solution 0.9% (NaCl), while group 3 (G3) and group 4 (G4) were immunized with 200 µL of a combined solution containing the recombinant protein. Groups G2 and G4 were supplemented with feed containing *H. illucens*, as shown in Table 1.

Blood sample collection

Blood samples were collected via submandibular puncture on day 0 and one day prior to each vaccination dose, as shown on Scheme 1. Samples were then centrifuged (3,500 rpm, 15 min) and the resulting serum was stored until use at -20°C.

Challenge Assay

The challenge containing twice the DL50 of the virulent MIC-6 strain of *C. pseudotuberculosis* was conducted 21 days after the last vaccine dose. Inoculation was performed intraperitoneally, and the animals were observed for 40 days after infection to analyze the parameters defined by the endpoint criteria, which were weight loss, hair loss, and lethargy exhibited by the animals [26].

Evaluation of the humoral immune response

To evaluate the humoral immune response, an indirect ELISA assay was performed in a 96-well flat-bottom plates (Maxisorp-Nunc) that were plated with 150 ng of our recombinant proteins (rNanH) in bicarbonate buffer (pH = 9.8) per well and incubated for 16 h at 4°C. The plates were then washed with PBS-T (1x PBS pH = 7.4; 0.05% Tween 20) three times and blocked for 1 h at 37 °C with 200 µL/well of 5% skim milk powder diluted in PBS-T. They were then washed with PBS-T three times and 100 µL/well of duplicate mouse serum samples were added at a dilution of 1:50. After 1 h of incubation at 37 °C, three more washes with PBS-T were performed, and 100 µL/well of peroxidase-conjugated mouse anti-IgG (Sigma) at a dilution of 1:5000 was added. After another 1 h incubation at 37 °C and three washes with PBS-T, 100 µL/well of a developer solution (200 moles ortho-phenylenediamine [OPD, Sigma] diluted in 10 mL citrate-phosphate buffer pH=7.6 and 50 µL H₂O₂) was added. The absorbance was measured at 492 nm using an ELISA plate reader (Mindray) [26].

Statistical analysis

The data was analyzed using R software for Windows and expressed as mean $\pm$ standard deviation. A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to calculate differences between levels of IgG production, followed by Tukey's post-test. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Authors' declarations

All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship.

Authors' contributions

--

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding information

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. SB (Proc. 308953 / 2019-3) are Technological Development fellows from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Compliance with ethical standards

Ethical statement

This research was conducted following the Brazilian Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and approved by the Ethics Commission on Animal Experimentation (CEEa) of the Federal University of Pelotas (protocol number 12522-2019).

Legends

Table 1: Groups and dose contents identification.

Figure 1: (A) SDS-PAGE for evaluation of rNanH protein expression in *E. coli*. (1): Pre-stained protein molecular weight marker (BioLabs); (2): Purified rNanH protein; (B) Western blot for evaluation of rNanH protein expression. (1): Pre-stained protein molecular weight marker (BioLabs); (2): Purified rNanH protein

Figure 2: Determination of IgG1 (A) and IgG2a (B) levels generated against the rNanH protein of *C. pseudotuberculosis* on days 0 (pre-immune), 21 (first immunization), and 42 (second immunization). The results are presented as the mean and standard deviation (bars) of absorbance (nm) in the indirect ELISA assay. Different letters on the same day represent groups with significant statistical differences in each graph ($p < 0.05$). The graphs were generated using R software.

Figure 3: Survival curve of Balb/c mice fed a supplemented diet and vaccinated with rNanH and subsequently challenged with a virulent MIC-6 strain of *C. pseudotuberculosis*. The mice were immunized subcutaneously with two vaccine doses and monitored for 40 days post-challenge. The survival curves were compared using Fisher's exact test and the log-rank test. (G1) Saline 0,9%, (G2) Saline 0,9% / *H. illucens*, (G3) rNanH, (G4) rNanH / *H. illucens*.

Tables

Table 1

Group	Vaccinated Groups	
	<i>1st dose</i>	<i>2nd dose</i>
G1	Saline Solution 0,9%	Saline Solution 0,9%
G2	Saline Solution 0,9%/H. <i>illucens</i>	Saline Solution 0,9%/H. <i>illucens</i>
G3	rNanH/Saponin	rNanH/Saponin
G4	rNanH/Saponin/ <i>H. illucens</i>	rNanH/Saponin/ <i>H. illucens</i>

Figures

Figure 1

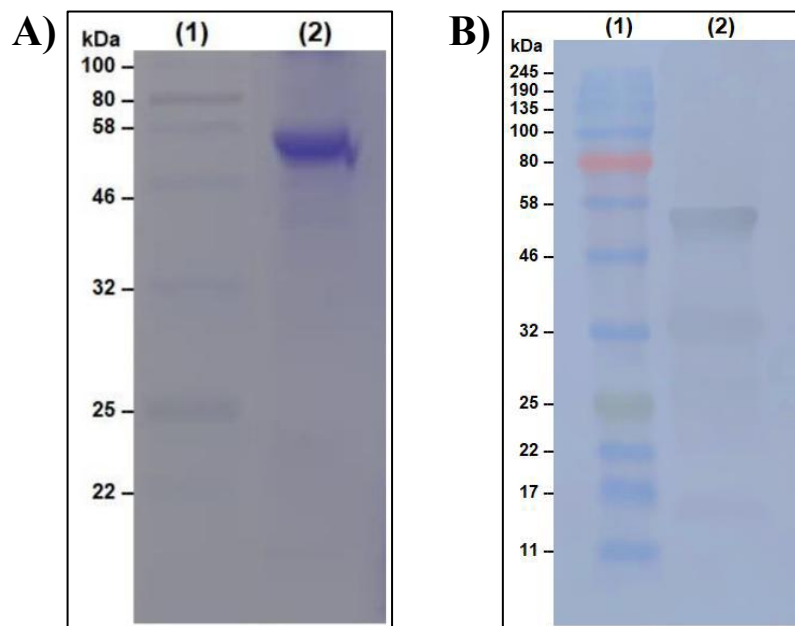


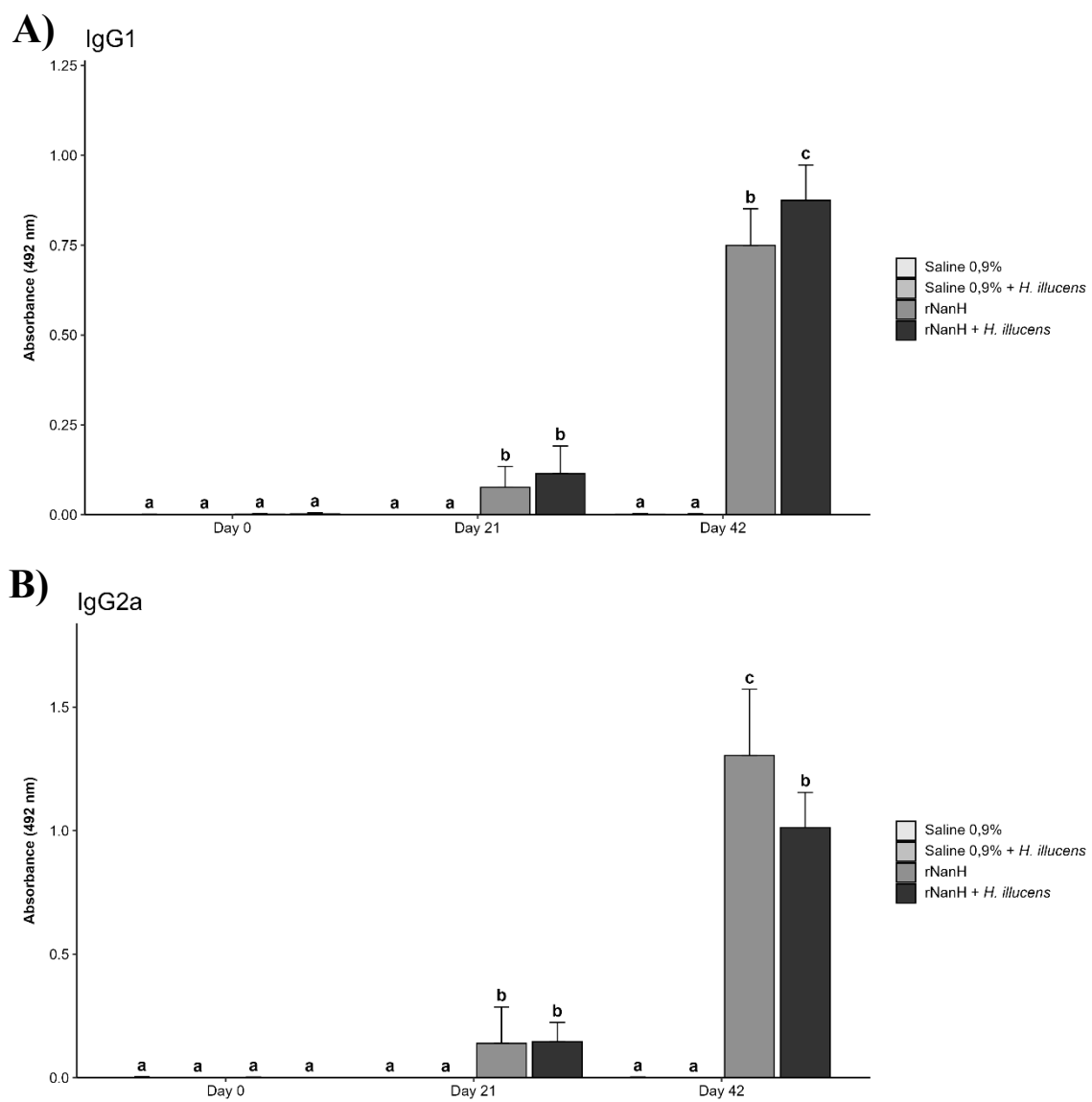
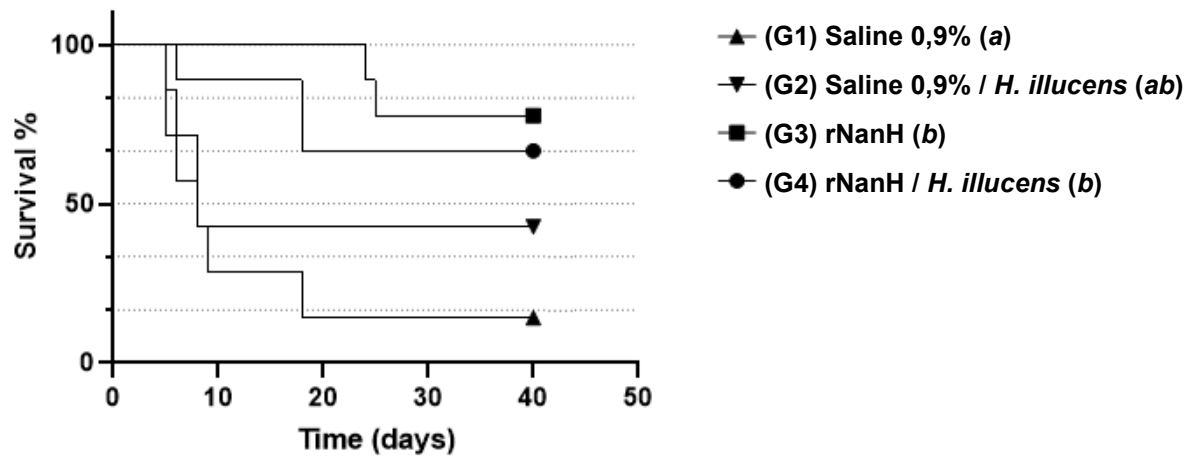
Figure 2

Figure 3



References

1. Yaacob MF, Murata A, Nor NHM, Jesse FFA, Raja Yahya MFZ. Biochemical composition, morphology and antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biofilm. *Journal of King Saud University - Science*. 2021 Jan;33(1):101225.
2. Dorella FA, Carvalho Pacheco L, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res*. 2006 Mar;37(2):201–18.
3. Windsor PA. Control of Caseous Lymphadenitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2011 Mar;27(1):193–202.
4. De Sá MDC, Raynal JT, Sales Rosa D, Aquino De Sá Oliveira S, Pereira Freire D, Alcantara ME, et al. Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: Revisão. *Pubvet [Internet]*. 2018 Nov 20 [cited 2025 June 21];12(11). Available from: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/982>
5. Alves JRA, De Farias AEM, Dos Anjos DM, Lima AMC, Faccioli-Martins PY, De Souza CJH, et al. Seroepidemiological study of Caseous lymphadenitis in sheep from the Northeast region of Brazil using an indirect ELISA. *Trop Anim Health Prod*. 2020 July;52(4):1945–52.
6. Guimarães A de S, Ribeiro D, Lage AP, Heinemann MB, Miyoshi A, Gouveia AMG. CASEOUS LYMPHADENITIS: EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS, AND CONTROL. 2011;
7. Pinho RB, De Oliveira Silva MT, Bezerra FSB, Borsuk S. Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021 Mar;105(6):2287–96.
8. Sohler MS, Selim SA, Bakry MA, Elgabry EA, Rehab MA. COMPARISON OF PROTECTION AGAINST CASEOUS LYMPHADENITIS IN SHEEP INDUCED BY LOCAL ISOLATED STRAIN OF *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* BY TOXOID PLD & TOXOID PLD WITH BACTERIN VACCINE. 2017;
9. Vale VLC, Silva MDC, De Souza AP, Trindade SC, De Moura-Costa LF, Dos Santos-Lima EKN, et al. Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune response against a *C. pseudotuberculosis* strain. *BMC Vet Res*. 2016 Dec;12(1):195.
10. Droppa-Almeida D, Da Silva GA, Gaspar LMDAC, Pereyra BBS, Nascimento RJM, Borsuk S, et al. Peptide vaccines designed with the aid of immunoinformatic against Caseous Lymphadenitis promotes humoral and cellular response induction in mice. Wang T, editor. *PLoS ONE*. 2021 Nov 29;16(11):e0256864.

11. Scholl NR, Silva MTDO, Barbosa TN, De Pinho RB, Alves MSD, Portela RW, et al. Evaluation of the Association of Recombinant Proteins NanH and PknG from *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Different Adjuvants as a Recombinant Vaccine in Mice. *Vaccines*. 2023 Feb 23;11(3):519.
12. Brown CC, Olander HJ, Alves SF. Synergistic Hemolysis-Inhibition Titers Associated with Caseous Lymphadenitis in a Slaughterhouse Survey of Goats and Sheep in Northeastern Brazil. 1987.
13. Ziech RE, Farias LD, Ardisson-Araújo DMP, Camargo GMFD, Frey J, Vargas ACD. Molecular characterization of virulence genes *cctA*, *nanA*, and *fliC* in *Clostridium chauvoei* from Rio Grande do Sul and São Paulo State, Brazil. *Cienc Rural*. 2019;49(5):e20181006.
14. Llanco LA, Nakano V, Avila-Campos MJ. Sialidase Production and Genetic Diversity in *Clostridium perfringens* Type A Isolated from Chicken with Necrotic Enteritis in Brazil. *Curr Microbiol*. 2015 Mar;70(3):330–7.
15. Santana-Jorge KTO, Santos TM, Tartaglia NR, Aguiar EL, Souza RFS, Mariutti RB, et al. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. *Microb Cell Fact*. 2016 Dec;15(1):83.
16. Devic E, Leschen W, Murray F, Little DC. Growth performance, feed utilization and body composition of advanced nursing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. *Aquacult Nutr*. 2018 Feb;24(1):416–23.
17. Vilela J, Andronicos NM, Kolakshyapati M, Hilliar M, Sibanda TZ, Andrew NR, et al. Black soldier fly larvae in broiler diets improve broiler performance and modulate the immune system. *Animal Nutrition*. 2021 Sept;7(3):695–706.
18. Müller A, Wolf D, Gutzeit HO. The black soldier fly, *Hermetia illucens* – a promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2017 Sept 26;72(9–10):351–63.
19. Vilcinskis A. Evolutionary plasticity of insect immunity. *Journal of Insect Physiology*. 2013 Feb;59(2):123–9.
20. Koutsos E, Modica B, Freel T. Immunomodulatory potential of black soldier fly larvae: applications beyond nutrition in animal feeding programs. *Translational Animal Science*. 2022 July 1;6(3): txac084.
21. Choi IH, Ji SY, Park KH, Kim KH, Lee HS, Choi GS, et al. Changes in growth performance of broilers fed different levels of *Hermetia illucens* powder. *Journal of Environmental Science International*. 2018;27(12):1299–303.
22. Lee J, Kim YM, Park YK, Yang YC, Jung BG, Lee BJ. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae enhances immune activities and increases survivability of broiler chicks against experimental infection of *Salmonella Gallinarum*. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2018;80(5):736–40.

23. Pasotto D, Van Emmenes L, Cullere M, Giaccone V, Pieterse E, Hoffman LC, et al. Inclusion of *Hermetia illucens* larvae reared on fish offal to the diet of broiler quails: Effect on immunity and caecal microbial populations. 2020.
24. De Oliveira Silva MT, De Pinho RB, Bezerra FSB, Campos VF, Azevedo V, Borsuk S. Establishment of an objective endpoint in mice model for caseous lymphadenitis vaccine trials. *Veterinary Microbiology*. 2019 Mar; 230:86–9.
25. Alibi S, Ferjani A, Gaillot O, Marzouk M, Courcol R, Boukadida J. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathologie Biologie*. 2015 Sept;63(4–5):153–7.
26. Zavoshti FR, Khoojine ABS, Helan JA, Hassanzadeh B, Heydari AA. Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. *Comp Clin Pathol*. 2012 Oct;21(5):667–71.
27. Bertuzzi CA, Weschenfelder EA, Webber DA, Martins TA, Nino BSL, Frigotto TA, et al. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Brucella abortus* em ovinos de Toledo, Paraná, Brasil. *Semina: Ciênc Agrár*. 2022 Dec 22;43(6):2657–70.
28. Jost BH, Songer JG, Billington SJ. Identification of a second *Arcanobacterium pyogenes* neuraminidase and involvement of neuraminidase activity in host cell adhesion. *Infection and immunity*. 2002;70(3):1106–12.
29. Sheu SY, Tseng H juin, Huang S ping, Chien C hsiang. Cloning, expression, and deletion analysis of large nanH of *Clostridium perfringens* ATCC 10543. *Enzyme and microbial technology*. 2002;31(6):794–803.
30. Boon AC, DeBeauchamp J, Hollmann A, Luke J, Kotb M, Rowe S, et al. Host genetic variation affects resistance to infection with a highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mice. *Journal of virology*. 2009;83(20):10417–26.
31. Haseman J, Huff J, Rao G, Eustis S. Sources of variability in rodent carcinogenicity studies. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1989;12(4):793–804.
32. Tarleton RL, Grusby MJ, Zhang L. Increased Susceptibility of Stat4-Deficient and Enhanced Resistance in Stat6-Deficient Mice to Infection with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*. 2000 Aug 1;165(3):1520–5.
33. Lawrence RA, Allen JE, Gray CA. Requirements for *in vivo* IFN- γ induction by live microfilariae of the parasitic nematode, *Brugia malayi*. *Parasitology*. 2000 June;120(6):631–40.
34. Murphy K. *Imunobiologia de Janeway/Kenneth Murphy*; tradução. Dados eletrônicos Porto Alegre: Artmed. 2010.

35. Leusen JH, Nimmerjahn F. The role of IgG in immune responses. *Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity*. 2013;85–112.
36. Bournazos S, Ravetch JV. Diversification of IgG effector functions. *International Immunology*. 2017 July 1;29(7):303–10.
37. Koh CY, Yuan D. The Functional Relevance of NK-Cell-Mediated Upregulation of Antigen-Specific IgG2a Responses. *Cellular Immunology*. 2000;204(2):135–42.
38. Ståhl TDÍ, Heyman B. IgG2a-Mediated Enhancement of Antibody Responses is dependent on FcR γ ⁺ Bone Marrow-Derived Cells. *Scand J Immunol*. 2001 Nov;54(5):495–500.
39. Silva MT de O, Pinho RB de, Fonseca B da R, Bezerra FSB, Sousa FSS, Seixas FK, et al. NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Vaccine*. 2020;38(51):8099–106.
40. Román VRG, Murray JC, Weiner LM. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In: *Antibody Fc*. Elsevier; 2014. p. 1–27.
41. Alexander J, McFarlane E. Can type-1 responses against intracellular pathogens be T helper 2 cytokine dependent? *Microbes and Infection*. 2008;10(9):953–9.
42. Igietseme JU, Eko FO, He Q, Black CM. Antibody regulation of T-cell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert review of vaccines*. 2004;3(1):23–34.
43. Finlay BB, McFadden G. Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens. *Cell*. 2006 Feb;124(4):767–82.
44. Sebina I, Pepper M. Humoral immune responses to infection: common mechanisms and unique strategies to combat pathogen immune evasion tactics. *Current Opinion in Immunology*. 2018 Apr; 51:46–54.
45. Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*. 2009 Mar;27(12):1787–96.
46. Rajput ZI, Hu S hua, Xiao C wen, Arijó AG. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ - Sci B*. 2007 Mar;8(3):153–61.
47. Baltzer SA, Brown MH. Antimicrobial Peptides – Promising Alternatives to Conventional Antibiotics. *Microb Physiol*. 2011;20(4):228–35.
48. Wang J, Dou X, Song J, Lyu Y, Zhu X, Xu L, et al. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Medicinal Research Reviews*. 2019;39(3):831–59.

49. Yu M, Li Z, Chen W, Rong T, Wang G, Ma X. *Hermetia illucens* larvae as a potential dietary protein source altered the microbiota and modulated mucosal immune status in the colon of finishing pigs. *J Animal Sci Biotechnol*. 2019 Dec;10(1):50.
50. Elieh Ali Komi D, Sharma L, Dela Cruz CS. Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2018 Apr;54(2):213–23.
51. Ruzin A, Novick RP. Equivalence of Lauric Acid and Glycerol Monolaurate as Inhibitors of Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2000 May;182(9):2668–71.
52. Harlystiarini H, Mutia R, Wibawan IWT, Astuti DA. In Vitro Antibacterial Activity of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Larva Extracts Against Gram-Negative Bacteria. *BuletinPeternak* [Internet]. 2019 May 31 [cited 2025 June 29];43(2). Available from: <https://journal.ugm.ac.id/buletinpeternakan/article/view/42833>
53. Kumar P, Lee JH, Beyenal H, Lee J. Fatty Acids as Antibiofilm and Antivirulence Agents. *Trends in Microbiology*. 2020 Sept;28(9):753–68.
54. Szczepanik K, Oczkowicz M, Dobrowolski P, Świątkiewicz M. The Protective Effects of Astaxanthin (AST) in the Liver of Weaned Piglets. *Animals*. 2023 Oct 19;13(20):3268.

4.2 Manuscrito 2 - CLARA: An R script for 96-well plate assay reading and analysis

Manuscrito formatado para revista: Software Impacts

Henrique Goncalves Pegoraro¹, Frederico Schmitt Kremer², Sibele Borsuk¹

¹ Laboratório de Biotecnologia Infecto-parasitária, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil,

² Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil

*Corresponding author: Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Campus Universitário s/n, Prédio 19 –, Pelotas, RS, Brazil, 96010-900. Phone: +55 53 3275 7350. E-mail: sibeleborsuk@gmail.com

Abstract

The 96-well plate is a cornerstone of biological research, yet data analysis remains a significant bottleneck. Manual workflows are time-consuming, error-prone, and lack reproducibility, while commercial software can be costly and inflexible. To address these challenges, we developed CLARA (Centralized Logistic for Assay Reading and Analysis), an open-source, interactive R/Shiny application designed to automate the entire analysis pipeline. CLARA features an intuitive graphical interface for click-and-drag well selection, dedicated modules for analyzing ELISAs and generating BCA standard curves, and integrated statistical tests with publication-ready visualizations. We demonstrate its utility by analyzing total IgG from mice vaccinated against caseous lymphadenitis. The results show that CLARA significantly reduces analysis time compared to manual methods, ensures full reproducibility, and produces results highly concordant with the commercial software GraphPad Prism. By providing a free, powerful, and user-friendly tool, CLARA streamlines assay analysis and promotes open, reproducible science.

Keywords: Reproducibility, Script, Accessible

Code Metadata

Current code versionv1.0

Permanent link to code..... <https://github.com/HGPegoraro/CLARA>

Legal Code License..... MIT

Code version system usedgit

Software code languagesR

Compilation requirements R (4.5.1), RStudio (2025.05.1+513), Rtools (4.5.6608)

Link to developer documentation
.....<https://github.com/HGPegoraro/CLARA/blob/main/README.md>

Support email for questions..... henrique.pegoraro2@gmail.com

Introduction

The 96-well microplate format is widely used for high-throughput screening assays, such as the measurement of binding interactions, enzyme activity, and cell proliferation [1]. Image-based reader systems have been extensively developed for semi-quantitative measurements of these assays, utilizing LED illumination and k-means clustering for classification [2].

These results, often exported as an excel file, then need to be manually passed one by one to a program used for statistical analysis, prone to small errors that strongly impact the results of the study. Furthermore, this stage ends up as a huge bottleneck in studies utilizing a diverse range of samples. These methods may also vary between researchers, which leads to a lack of reproducibility that isn't easily traced. Commercially available software programs are extremely powerful due to their wide range of applications. But they tend to be inaccessible to some researchers due to their paid manor. These applications lack flexibility, a characteristic of tools that are closed-sourced. They also tend to have awkward user interfaces, which leads to further complications.

To address these challenges, we developed CLARA (Centralized Logistic for Assay Reading and Analysis), an R script designed to automate the entire analysis pipeline from raw plate reader output to final figures and tables. CLARA is at its core automated, highly accessible, easily reproduceable and scalable.

Methods and Implementation

CLARA is built in R, using several well-established packages, such as Shiny, DT and sortable allowing highly interactable interfaces. For data handling the main packages used were readxl, dplyr, tidyr, tibble and jsonlite. Plotting and graphical visualizations were made using ggplot2 packages. Lastly for statistical analysis, packages such as emmeans, multcomp, fBasics, afex and rstatix.

The user is firstly greeted by a choice of what plate reader was utilized to export the excel results, seeing as each plate reader program exports its data in a slightly different manner. This is required so that the right values appear once the user imports the excel file. Currently, CLARA is divided into two tabs, which can analyze multiple ELISA assays and design BCA Standard Curve.

Humoral Response Tab

On the side panel, after the user imports an Excel file, the respective well values are shown in a 96 well grid on the main panel (Figure 1a), where through click and drag selection, the user can select and name wells, also being capable of defining which days the samples were collected. Most importantly, the replica mode can be set between duplicate and triplicate, allowing a more versatile approach. The ability to name tests allows multiple groups that share the same name to exist without their values interfering. The user can then set a blank, which will only be applied to its respective plate. The project can be saved in a .rds file, allowing the user to resume data analysis after closing the program.

After group selection, a set of useful information, such as group and test name, well and values, will be presented under the plate interface (Figure 1b), allowing for easy trace back. As soon as the first group is created, a dynamic

graph is generated (Figure 1c), where the user can change Y-axis. The groups and test type can be selected and have their order changed by the user to generate a final graph (Figure 1c). Currently, three statistical analysis methods, two-way and one-way ANOVA and Kruskal-Wallis, are available to be chosen. The significance style can also be changed between Tukey Letters or Asterisks and bars. If the user requires confirmation of normality, a diagnosis is also present, which exports the normality values of a specific day to a designated file. When the user has a dynamic graph with the desired information, it can be saved in a final graph, that can be exported into a PDF, PNG or TIFF format. Further information on statistical analysis of this Tab is shown in the console.

BCA Curve Tab

On the side panel, the first two options are identical to those present in the humoral response tab. After the user imports an Excel file a standard curve containing 9 points will be drawn on the interface (Figure 2a). The user can then redefine the values and positions of those points (Figure 2b), being capable of adding more points and ignoring certain points by selecting them, if desired. After defining the standard curve, the user can assign a sample to selected wells. The project can be saved as previously mentioned in the Humoral Response Tab

In the main panel, below the 96 well grid, a BCA Standard Curve with the points and values previously selected are shown, with a linear regression summary (Figure 2c). Lastly, after definition of samples, a table containing average absorbance, Standard Deviation (SD) Absorbance, number of replicas and interpolated concentration are shown.

Software demonstration

CLARA was already used in an ELISA for total IgG from Balb/c mice vaccinated with four recombinant proteins against caseous lymphadenitis, a neglected gram-positive bacterial disease that affects sheep and goats worldwide [3].

Firstly, the quantification of these proteins was performed inside the BCA Standard Curve Tab, as shown in Figure 3a and the concentration was given right after the assembly of the Standard Curve, as shown in Figure 3b. After the quantification, 6 Excel files were uploaded to the Humoral Response Tab, and the saline and the recombinant proteins groups were selected, as shown in Figure 4. Which then resulted in a graph as shown in Figure 5a, and groups were ordered as Saline, B, A, D and C, for demonstration purposes. The one-way ANOVA option was utilized, using Letters as the Significance Style.

Software Impact

For this analysis, considerably less time was necessary to achieve previously shown results, as it only requires preparation of plate layout, compared to manual methods, which required data exportation, copy and paste, calculations inside Excel, exporting and analyzing data in a commercially available software program. Moreover, because the main components of the analysis are automated, it led to fewer analytical errors and are fully reproducible. The data presented was also evaluated using GraphPad Prism, as seen in Figure 5b, and both graphs show highly concordant results, confirming the effectiveness of CLARA against commercial software.

We have presented CLARA, an open-source tool that significantly streamlines the analysis of 96-well plate data, saving significant time while improving reproducibility and accuracy. Given its open-source and gratuity characteristics, it serves as an excellent base for specific 96 well-plate assays, promoting open science and allowing scientific reproducibility in places with limited budget.

Conclusion and Future Perspectives

CLARA showed a diverse range of benefits for being an open-source program, with fast assay input and analysis. Compared to conventional available programs, CLARA is more attractive given its free nature and readable interface.

Future perspectives include adding more Tabs of techniques used in a 96 well plate, centralizing the statistical analysis in one large program.

Authors' declarations

All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship.

Authors' contributions

--

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding information

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. SB (Proc. 308953 / 2019-3) are Technological Development fellows from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Legends

Figure 1: Humoral Response Tab and its Interface. **(A)** Grid build from data of an Excel file, showing different days of a group and well concentration. **(B)** Table containing columns identified as name of the file, well identification, well value, and respective Groups, Days and Tests.

Figure 2: BCA Curve Tab and its Interface. **(A)** Grid build from data of an Excel file, with a standard curve of 9 points in triplicate showing well and the curve concentration. The samples are presented in italic. **(B)** Collapsible menu which allows users to define all parameters about the Standard Curve. **(C)** BCA Standard Curve with a linear regression summary.

Figure 3: Result of a BCA Standard Curve quantification. **(A)** Grid interface of a 96 well plate containing the defined Standard Curve and samples in triplicate. **(B)** Table with the results of the quantification defined in the grid.

Figure 4: All groups after being selected in their respective wells, with different colors to avoid confusion during well selection.

Figure 5: **(A)** Resulting bar graph given by download at the end of the analysis in CLARA. **(B)** Same data passed through Graph Pad Prism showing highly concordant results.

Figures



Figure 1

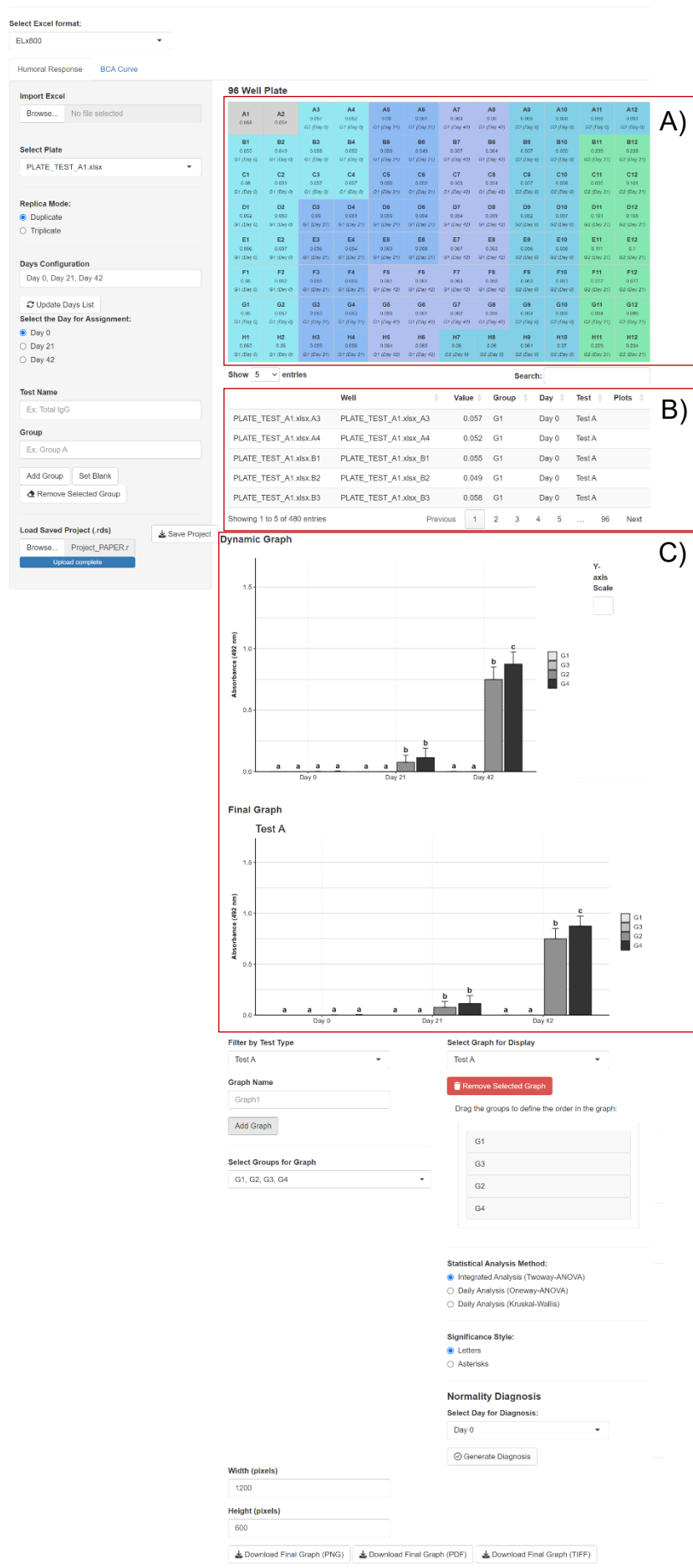


Figure 2

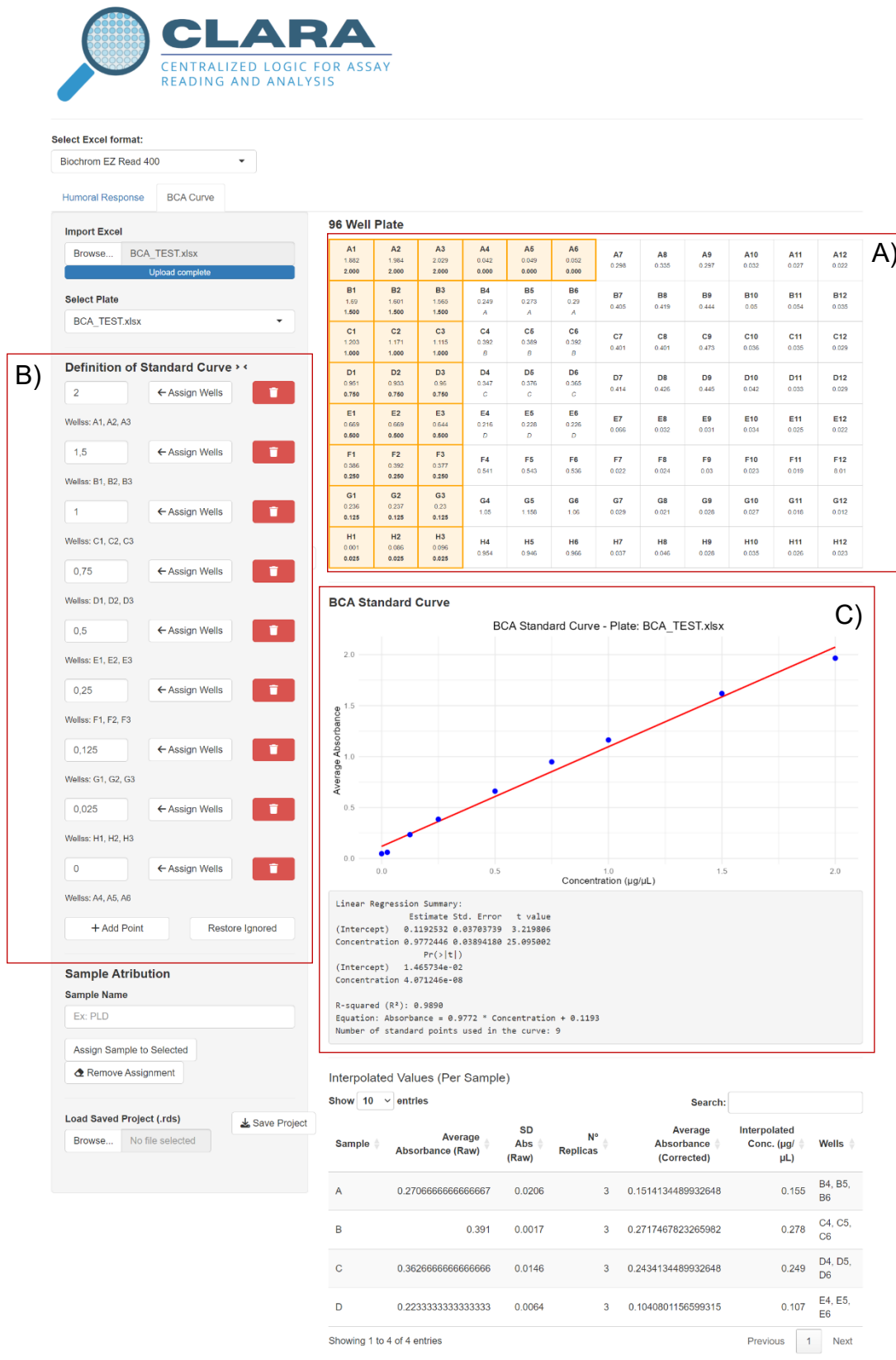


Figure 3

A)
96 Well Plate

A1 1.882 2.000	A2 1.984 2.000	A3 2.029 2.000	A4 0.042 0.000	A5 0.049 0.000	A6 0.052 0.000	A7 0.298	A8 0.335	A9 0.297	A10 0.032	A11 0.027	A12 0.022
B1 1.69 1.500	B2 1.601 1.500	B3 1.565 1.500	B4 0.249 A	B5 0.273 A	B6 0.29 A	B7 0.405	B8 0.419	B9 0.444	B10 0.05	B11 0.054	B12 0.035
C1 1.203 1.000	C2 1.171 1.000	C3 1.115 1.000	C4 0.392 B	C5 0.389 B	C6 0.392 B	C7 0.401	C8 0.401	C9 0.473	C10 0.036	C11 0.035	C12 0.029
D1 0.951 0.750	D2 0.933 0.750	D3 0.96 0.750	D4 0.347 C	D5 0.376 C	D6 0.365 C	D7 0.414	D8 0.426	D9 0.445	D10 0.042	D11 0.033	D12 0.029
E1 0.669 0.500	E2 0.669 0.500	E3 0.644 0.500	E4 0.216 D	E5 0.228 D	E6 0.226 D	E7 0.066	E8 0.032	E9 0.031	E10 0.034	E11 0.025	E12 0.022
F1 0.386 0.250	F2 0.392 0.250	F3 0.377 0.250	F4 0.541	F5 0.543	F6 0.536	F7 0.022	F8 0.024	F9 0.03	F10 0.023	F11 0.019	F12 8.01
G1 0.236 0.125	G2 0.237 0.125	G3 0.23 0.125	G4 1.05	G5 1.158	G6 1.06	G7 0.029	G8 0.021	G9 0.028	G10 0.027	G11 0.018	G12 0.012
H1 0.001 0.025	H2 0.086 0.025	H3 0.096 0.025	H4 0.954	H5 0.946	H6 0.966	H7 0.037	H8 0.046	H9 0.028	H10 0.035	H11 0.026	H12 0.023

B)

Interpolated Values (Per Sample)

Show 10 entries

Search:

Sample	Average Absorbance (Raw)	SD Abs (Raw)	N° Replicas	Average Absorbance (Corrected)	Interpolated Conc. (µg/µL)	Wells
A	0.2706666666666667	0.0206	3	0.1514134489932648	0.155	B4, B5, B6
B	0.391	0.0017	3	0.2717467823265982	0.278	C4, C5, C6
C	0.3626666666666666	0.0146	3	0.2434134489932648	0.249	D4, D5, D6
D	0.2233333333333333	0.0064	3	0.1040801156599315	0.107	E4, E5, E6

Showing 1 to 4 of 4 entries

Previous1Next

Figure 4

96 Well Plate

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0.058	0.068	0.061 Saline 0.9%	0.053 Saline 0.9%	0.05	0.05	0.051 Saline 0.9%	0.047 Saline 0.9%	0.048 Protein A (Day 0)	0.05	0.054 Protein A (Day 0)	0.037 Protein A (Day 0)
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0.053	0.068	0.078	0.072	0.048	0.044	0.044	0.044	0.055	0.045	0.045	0.048
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0.053	0.05	0.058	0.05	0.06	0.046	0.047	0.041	0.043	0.037	0.05	0.051
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
0.06	0.05	0.058	0.049	0.055	0.044	0.047	0.048	0.049	0.045	0.053	0.046
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
0.059	0.068	0.085	0.058	0.07	0.052	0.052	0.044	0.043	0.039	0.042	0.042
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0.053	0.049	0.053	0.054	0.061	0.046	0.045	0.049	0.052	0.047	0.039	0.054
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0.054	0.053	0.071	0.071	0.069	0.054	0.051	0.05	0.052	0.071	0.06	0.058
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
0.058	0.052	0.054	0.079	0.076	0.09	0.051	0.061	0.057	0.05	0.048	0.053

96 Well Plate

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0.092	0.049	Protein B (Day 0)	0.052 Protein B (Day 0)	0.052 Protein B (Day 0)	0.053 Protein B (Day 0)	0.042 Protein B (Day 0)	0.053 Protein B (Day 0)	0.048	0.047	0.05	0.049
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0.051	0.045	0.047	0.051	0.054	0.048	0.048	0.052	0.044	0.044	0.044	0.045
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0.064	0.049	0.054	0.045	0.048	0.052	0.051	0.048	0.045	0.045	0.048	0.048
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
0.059	0.062	0.055	0.053	0.059	0.058	0.044	0.044	0.044	0.045	0.046	0.045
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
0.059	0.062	0.051	0.055	0.052	0.057	0.045	0.047	0.046	0.047	0.047	0.047
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0.057	0.054	0.05	0.049	0.052	0.046	0.048	0.043	0.043	0.045	0.047	0.047
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0.052	0.052	0.048	0.053	0.057	0.048	0.045	0.045	0.051	0.052	0.053	0.057
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
0.053	0.047	0.05	0.056	0.058	0.071	0.052	0.049	0.049	0.048	0.052	0.052

96 Well Plate

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0.06	0.078	1.78 Protein C (Day 42)	2.095 Protein C (Day 42)	0.05	0.07	0.052	0.051	0.045	0.056	0.052	0.064
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0.433	0.399	1.525	1.547	0.05	0.051	0.049	0.049	0.05	0.049	0.052	0.056
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0.127	0.115	1.454	1.431	0.046	0.054	0.047	0.049	0.055	0.052	0.053	0.057
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
0.1	0.1	1.382	1.718	0.047	0.052	0.067	0.052	0.053	0.056	0.055	0.057
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
1.434	1.221	1.248	1.482	0.05	0.062	0.051	0.054	0.052	0.059	0.055	0.068
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
1.478	0.992	1.068	1.091	0.05	0.047	0.054	0.054	0.058	0.049	0.048	0.05
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
1.58	0.934	0.043	0.047	0.048	0.051	0.05	0.05	0.052	0.053	0.055	0.057
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
1.188	0.778	0.053	0.05	0.054	0.055	0.053	0.05	0.053	0.053	0.063	0.063

96 Well Plate

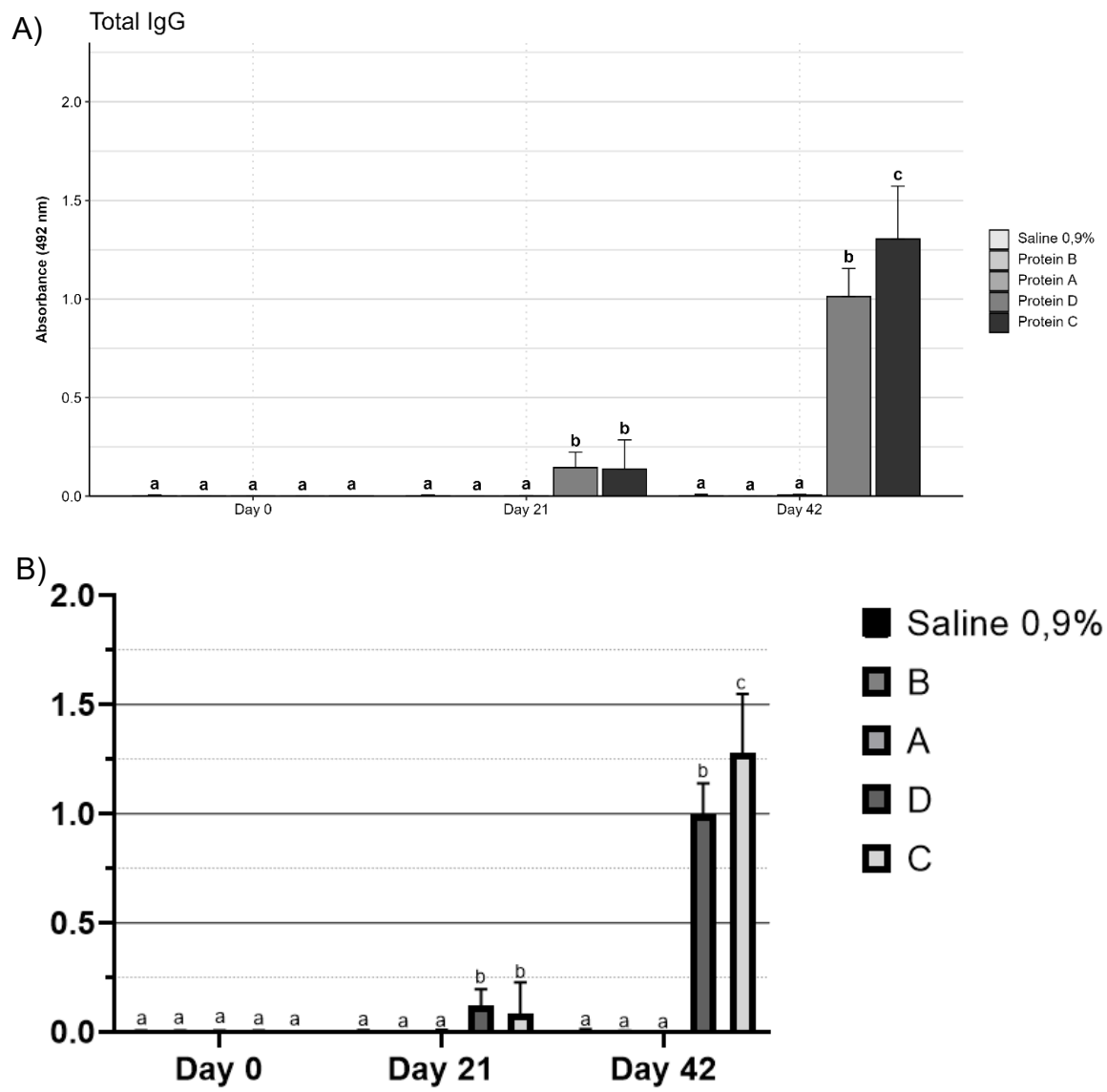
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0.047	0.044	0.051 Protein A (Day 42)	0.049 Protein A (Day 42)	0.044	0.044	0.046	0.047	0.044	0.045	0.049	0.049
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0.048	0.044	0.045	0.053	0.043	0.043	0.044	0.044	0.045	0.045	0.044	0.056
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0.048	0.045	0.043	0.052	0.043	0.047	0.045	0.045	0.047	0.051	0.051	0.048
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
0.051	0.043	0.047	0.049	0.043	0.044	0.045	0.044	0.046	0.046	0.048	0.047
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
0.052	0.052	0.047	0.047	0.044	0.048	0.047	0.045	0.046	0.047	0.043	0.045
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0.058	0.055	0.054	0.055	0.046	0.045	0.046	0.046	0.045	0.044	0.044	0.044
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0.057	0.057	0.044	0.044	0.044	0.046	0.045	0.045	0.047	0.047	0.05	0.046
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
0.049	0.05	0.045	0.048	0.047	0.045	0.047	0.047	0.049	0.047	0.043	0.05

96 Well Plate

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0.057	0.043	0.056	0.05	0.039	0.051	0.05	0.048	0.049	0.047	0.048	0.05
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0.049	0.044	0.054	0.051	0.05	0.049	0.049	0.052	0.046	0.052	0.496	0.473
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0.057	0.049	0.05	0.052	0.043	0.047	0.045	0.047	0.051	0.044	0.125	0.119
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
0.049	0.05	0.052	0.05	0.047	0.047	0.048	0.05	0.05	0.049	0.295	0.25
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
0.05	0.052	0.049	0.047	0.047	0.045	0.052	0.055	0.05	0.052	0.164	0.111
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0.051	0.05	0.047	0.048	0.049	0.042	0.051	0.051	0.05	0.051	0.046	0.046
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0.049	0.05	0.049	0.047	0.051	0.054	0.052	0.054	0.052	0.052	0.147	0.144
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
0.061	0.05	0.049	0.052	0.05	0.05	0.051	0.054	0.055	0.049	0.103	0.087

96 Well Plate

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
0.06	0.048	0.2 Protein D (Day 21)	0.147 Protein D (Day 21)	0.255 Protein D (Day 21)	0.236 Protein D (Day 21)	1.159 Protein D (Day 42)	1.25 Protein D (Day 42)	0.037	0.043	0.046	0.047
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
0.049	0.049	0.319	0.229	1.12	1.19	1.279	1.169	0.046	0.035	0.037	0.045
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0.052	0.048	0.146	0.132	1.113	0.961	1.303	1.237	0.048	0.046	0.046	0.05
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
0.053	0.051	0.124	0.109	1.248	0.88	0.043	0.048	0.045	0.038	0.051	0.05
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
0.067	0.051	0.16	0.153	0.884	0.934	0.042	0.041	0.049	0.038	0.038	0.042
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0.053	0.052	0.369	0.321	0.926	0.772	0.048	0.048	0.045	0.038	0.043	0.044
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
0.053	0.052	0.116	0.104	1.132	0.815	0.048	0.048	0.044	0.038	0.046	0.047
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
0.175	0.167	0.291	0.234	1.025	0.932	0.051	0.052	0.04	0.049	0.052	0.051

Figure 5

References

- [1] G. R. Nakayama, M. P. Nova, and Z. Parandoosh, "A Scintillating Microplate Assay for the Assessment of Protein Kinase Activity," *Journal of Biomolecular Screening*, vol. 3, no. 1, pp. 43–48, 1998, doi: 10.1177/108705719800300106.
- [2] T. M. Schaaf, K. C. Peterson, B. D. Grant, D. D. Thomas, and G. D. Gillispie, "Spectral Unmixing Plate Reader: High-Throughput, High-Precision FRET Assays in Living Cells," *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*, vol. 22, no. 3, pp. 250–261, 2017, doi: 10.1177/1087057116679637.
- [3] M. T. Guedes *et al.*, "Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos," *Pesq. Vet. Bras.*, vol. 35, no. 8, pp. 701–708, Aug. 2015, doi: 10.1590/S0100-736X2015000800001.

5. Conclusão Geral

A imunização por uma vacina de subunidade contendo NanH recombinante, sendo suplementada com *H. illucens* demonstrou uma resposta imunológica mista contra o patógeno *C. pseudotuberculosis*. A suplementação com *H. illucens* demonstrou uma capacidade de induzir uma resposta imune humoral e proteção nos animais que não haviam sido vacinados, elevado a taxa de sobrevivência em relação ao grupo salina sem suplementação.

Além disso, o *Software* CLARA, desenvolvido para auxiliar em análises estatísticas de ensaio colorimétricos efetuados em placa de 96 poços, demonstrou grande potencial em sua aplicação. Devido ao fato de o programa ser *open-source*, gratuito e permitir a automatização da computação de diversos dados em um curto período de tempo, a aplicação se torna uma alternativa muito atrativa por proporcionar um amplo alcance científico.

6. Referências Bibliográficas

ABEBE, D.; SISAY TESSEMA, T. Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 469–476, nov. 2015. <https://doi.org/10.1111/lam.12482>.

AGUIRRE-RIOFRIO, L.; MAZA-TANDAZO, T.; QUEZADA-PADILLA, M.; ALBITO-BALCAZAR, O.; FLORES-GONZALEZ, A.; CAMACHO-ENRIQUEZ, O.; MARTINEZ-MARTINEZ, A.; CONSORTIUM, B.; DELGADO-BERMEJO, J. V. Genetic Characterization of the “Chusca Lojana”, a Creole Goat Reared in Ecuador, and Its Relationship with Other Goat Breeds. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 1026, 12 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10061026>.

ALI, F. Z.; MUHAMMAD, O.; TAKASHI, I.; ATSUSHI, M.; CHIEMI, M. The Dipterose of Black Soldier Fly. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, 2019. .

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas**. 1997.

ALVES, J. R. A.; DE FARIAS, A. E. M.; DOS ANJOS, D. M.; LIMA, A. M. C.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; DE SOUZA, C. J. H.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; DE AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Seroepidemiological study of Caseous lymphadenitis in sheep from the Northeast region of Brazil using an indirect ELISA. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 4, p. 1945–1952, jul. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02214-9>.

AQUINO DE SÁ, M. D. C.; RAYNAL, J. T.; SALES ROSA, D.; AQUINO DE SÁ OLIVEIRA, S.; PEREIRA FREIRE, D.; ALCANTARA, M. E.; MATIUZZI DA COSTA, M.; MEYER, R. Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: Revisão. **Pubvet**, v. 12, n. 11, 20 nov. 2018. DOI 10.31533/pubvet.v12n11a202.1-13. Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/982>. Acesso em: 21 jun. 2025.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, , v. 137, n. 4, p. 179–210, nov. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.07.002>.

BARBA, M.; STEWART, A. J.; PASSLER, T.; WOOLDRIDGE, A. A.; VAN SANTEN, E.; CHAMORRO, M. F.; CATTLEY, R. C.; HATHCOCK, T.; HOGSETTE, J. A.; HU, X. P. Experimental Transmission of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Biovar *equi* in Horses by House Flies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, , v. 29, n. 2, p. 636–643, mar. 2015. <https://doi.org/10.1111/jvim.12545>.

BARRAL, T. D.; KALIL, M. A.; MARIUTTI, R. B.; ARNI, R. K.; GISMENE, C.; SOUSA, F. S.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; BORSUK, S.; ESTRELA-LIMA, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Immunoprophylactic properties of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*-derived MBP:PLD:CP40 fusion protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**, , v. 106, n. 24, p. 8035–8051, dez. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12279-1>.

BERTUZZI, C. A.; WESCHENFELDER, E. A.; WEBBER, D. A.; MARTINS, T. A.; NINO, B. S. L.; FRIGOTTO, T. A.; GARCIA, J. L.; ZULPO, D. L. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Brucella abortus* em ovinos de Toledo, Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, , v. 43, n. 6, p. 2657–2670, 22 dez. 2022. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2022v43n6p2657>.

BEZERRA, F. S. B.; SILVA, M. T. D. O.; REZENDE, A. D. F. S.; LOPES, A. S.; DE PINHO, R. B.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T. V.; PORTELA, R. W. D.; AZEVEDO, V. A. D. C.; BORSUK, S. Saponin-adjuvanted recombinant vaccines containing rCP00660, rCP09720 or rCP01850 proteins against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Vaccine**, v. 39, n. 18, p. 2568–2574, abr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.062>.

BHATT, A.; ABBASSI, B. Review of environmental performance of sheep farming using life cycle assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 293, p. 126192, abr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126192>.

BILLINGTON, S. J.; ESMAY, P. A.; SONGER, J. G.; JOST, B. H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 1, p. 41–45, fev. 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11058.x>.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES, S. F. Synergistic Hemolysis-Inhibition Titers Associated with Caseous Lymphadenitis in a Slaughterhouse Survey of Goats and Sheep in Northeastern Brazil. 1987. .

BROWN, G.; SINGER, A.; PROUDFOOT, M.; SKARINA, T.; KIM, Y.; CHANG, C.; DEMENTIEVA, I.; KUZNETSOVA, E.; GONZALEZ, C. F.; JOACHIMIAK, A.; SAVCHENKO, A.; YAKUNIN, A. F. Functional and Structural Characterization of Four Glutaminases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v. 47, n. 21, p. 5724–5735, 1 maio 2008. <https://doi.org/10.1021/bi800097h>.

BRUM, A. A.; REZENDE, A. D. F. S.; BRILHANTE, F. S.; COLLARES, T.; BEGNINE, K.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T. V.; DELLAGOSTIN, O. A.; AZEVEDO, V.; SANTOS, A.; PORTELA, R. W.; BORSUK, S. Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 635–642, 1 maio 2017. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000477>.

BRUNDAGE, C.; BURMAYAN, A. Caseous lymphadenitis outbreak in a small ruminant herd. **Open Veterinary Journal**, v. 11, n. 4, p. 530, 2021. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i4.2>.

BRUNO, D.; BONELLI, M.; CADAMURO, A. G.; REGUZZONI, M.; GRIMALDI, A.; CASARTELLI, M.; TETTAMANTI, G. The digestive system of the adult *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): morphological features and functional properties. **Cell and Tissue Research**, v. 378, p. 221–238, 2019. .

BULA GLANVAC. **Glanvac 6: Vacina Inativada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* (ovis), *Clostridium perfringens* tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium novyi* tipo B, *Clostridium septicum* e *Clostridium***

chauvoei . [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: https://www.zoetis.com.br/global-assets/private/glanvac-6_0.pdf.

BUSH, R. D. Advances in smallholder large ruminant production and profitability in Southeast Asia over the past decade – lessons from the Mekong region: a review. **Animal Production Science**, v. 64, n. 13, 26 ago. 2024. DOI 10.1071/AN23406. Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/AN/AN23406>. Acesso em: 21 jun. 2025.

CAMERON, R. S.; THORNTON, B. K.; SWIFT, R. S.; POSNER, A. M. MOLECULAR WEIGHT AND SHAPE OF HUMIC ACID FROM SEDIMENTATION AND DIFFUSION MEASUREMENTS ON FRACTIONATED EXTRACTS. **Journal of Soil Science**, v. 23, n. 4, p. 394–408, dez. 1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1972.tb01670.x>.

CARVALHO, J. S.; SILVA, T. R. D.; SANTOS, P. V. D. M.; ALMEIDA, F. F.; JESUS, T. K. S. D.; RIZZO, H. Characterization of goat and sheep production in the state of Sergipe, Northeast of Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 14, n. 2, p. 121–131, 30 jun. 2020. <https://doi.org/10.21708/avb.2020.14.2.9247>.

ÇETİNGÜL, İ. S.; SHAH, S. R. A. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae as an ecological, immune booster and economical feedstuff for aquaculture. **Marine Science and Technology Bulletin**, v. 11, n. 1, p. 52–62, 2022. .

CHEN, Y.; ZHUANG, Z.; LIU, J.; WANG, Z.; GUO, Y.; CHEN, A.; CHEN, B.; ZHAO, W.; NIU, J. Effects of *Hermetia illucens* larvae meal on the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) revealed by innate immunity and 16S rRNA gene sequencing analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 46, p. 101080, 2023. .

CHOI, I.-H.; JI, S.-Y.; PARK, K.-H.; KIM, K.-H.; LEE, H.-S.; CHOI, G.-S.; LIM, Y.-J.; YU, R.; CHUNG, T.-H. Changes in growth performance of broilers fed different levels of *Hermetia illucens* powder. **Journal of Environmental Science International**, v. 27, n. 12, p. 1299–1303, 2018. .

CHOI, W. H.; CHOI, H.; GOO, T. W.; QUAN, F. Novel antibacterial peptides induced by probiotics in *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. **Entomological Research**, v. 48, n. 4, p. 237–247, 2018. .

CORRÊA, J. I.; STOCKER, A.; TRINDADE, S. C.; VALE, V.; BRITO, T.; BASTOS, B.; RAYNAL, J. T.; DE MIRANDA, P. M.; DE ALCANTARA, A. C.; FREIRE, S. M.; COSTA, L. M.; MEYER, R. In vivo and in vitro expression of five genes involved in *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 89, dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0598-z>.

DE FILIPPIS, F.; SEQUINO, G.; BRUNO, D.; BONELLI, M.; NOLASCO, A.; ESPOSITO, F.; CIRILLO, T.; TETTAMANTI, G.; ERCOLINI, D.; CASARTELLI, M. A comprehensive analysis of coffee silverskin bioconversion by *Hermetia illucens* larvae. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 1, n. aop, p. 1–16, 2024. .

DE OLIVEIRA ZAMPROGNA, T.; RIBEIRO, D.; AZEVEDO, V. A. C.; LARA, G. H. B.; MOTTA, R. G.; DA SILVA, R. C.; SIQUEIRA, A. K.; DE NARDI JÚNIOR, G.; LISTONI, F. J. P.; DE SOUZA ARAÚJO MARTINS, L.; DA SILVA, A. V.; PORTILHO, F. V. R.; DA ROCHA MOTA, A.; RODRIGUES, C. A.; DE ALMEIDA, B. O.; RIBEIRO, M. G. Bacteriological, cytological, and molecular investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, mycobacteria, and other bacteria in caseous lymphadenitis and healthy lymph nodes of slaughtered sheep. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 431–438, mar. 2021. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00403-0>.

DE PINHO, R. B.; DE OLIVEIRA SILVA, M. T.; BEZERRA, F. S. B.; BORSUK, S. Vaccines for caseous lymphadenitis: up-to-date and forward-looking strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 6, p. 2287–2296, mar. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11191-4>.

DE SOUZA VILELA, J.; ANDRONICOS, N. M.; KOLAKSHYAPATI, M.; HILLIAR, M.; SIBANDA, T. Z.; ANDREW, N. R.; SWICK, R. A.; WILKINSON, S.; RUHNKE, I. Black soldier fly larvae in broiler diets improve broiler performance and modulate the immune system. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 695–706, set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.08.014>.

DELGADO DUNO, A.; ZÁRRAGA, J.; CHIRINO-ZÁRRAGA, C. I.; CARRERO PORTILLO, L. L. Caracterización epidemiológica de la linfadenitis caseosa en rebaños caprinos de la península de Paraguaná, Venezuela. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 31, p. 35, 27 dez. 2015. <https://doi.org/10.19052/mv.3706>.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K. V.; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 167–175, jul. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00217-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00217-0).

DEVIC, E.; LESCHEN, W.; MURRAY, F.; LITTLE, D. C. Growth performance, feed utilization and body composition of advanced nursing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 416–423, fev. 2018. <https://doi.org/10.1111/anu.12573>.

DOPUĐ, M.; ZDELAR-TUK, M.; DUVNJAK, S.; REIL, I. Caseous Lymphadenitis in sheep and goats – “Cheese Glands”. **Veterinarska stanica**, v. 56, n. 3, p. 303–316, 23 out. 2024. <https://doi.org/10.46419/vs.56.3.8>.

DORELLA, Fernanda A; PACHECO, L. G.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 205–213, fev. 2009. <https://doi.org/10.1586/14760584.8.2.205>.

DORELLA, Fernanda Alves; CARVALHO PACHECO, L.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201–218, mar. 2006. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005056>.

DROPPA-ALMEIDA, D.; DA SILVA, G. A.; GASPAR, L. M. D. A. C.; PEREYRA, B. B. S.; NASCIMENTO, R. J. M.; BORSUK, S.; FRANCESCHI, E.; PADILHA, F.

F. Peptide vaccines designed with the aid of immunoinformatic against Caseous Lymphadenitis promotes humoral and cellular response induction in mice. **PLOS ONE**, v. 16, n. 11, p. e0256864, 29 nov. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256864>.

DROPPA-ALMEIDA, D.; FRANCESCHI, E.; PADILHA, F. F. Immune-Informatic Analysis and Design of Peptide Vaccine From Multi-epitopes Against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 12, p. 1177932218755337, 1 jan. 2018. <https://doi.org/10.1177/1177932218755337>.

DUDEK, K.; SEVIMLI, U.; MIGLIORE, S.; JAFARIZADEH, A.; LORIA, G. R.; NICHOLAS, R. A. J. Vaccines for Mycoplasma Diseases of Small Ruminants: A Neglected Area of Research. **Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 75, 7 jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010075>.

FACCIOLI-MARTINS, P.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite Caseosa: perspectivas no diagnóstico, tratamento e controle**. [S. l.: s. n.], 2014.

FARIAS, A. M.; ALVES, J. R. A.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LIMA, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Soroprevalência da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos no Nordeste brasileiro utilizando técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA-indireto). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1344–1350, jul. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5282>.

FRANCO, A.; SCIEUZO, C.; SALVIA, R.; PETRONE, A. M.; TAFI, E.; MORETTA, A.; SCHMITT, E.; FALABELLA, P. Lipids from *Hermetia illucens*, an innovative and sustainable source. **Sustainability**, v. 13, n. 18, p. 10198, 2021. .

FU, M.; XU, X.; CHENG, Z.; ZHU, J.; SUN, A.; XU, G.; AN, X. Combined Transcriptomic and Proteomic of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in the Spleen of Dairy Goats. **Animals**, v. 12, n. 23, p. 3270, 24 nov. 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12233270>.

GASCO, L.; BIASATO, I.; DABBOU, S.; SCHIAVONE, A.; GAI, F. Animals fed insect-based diets: State-of-the-art on digestibility, performance and product quality. **Animals**, v. 9, n. 4, p. 170, 2019. .

GOMIDE, A. C. P.; IBRAIM, I. C.; ALVES, J. T. C.; DE SÁ, P. G.; DE OLIVEIRA SILVA, Y. R.; SANTANA, M. P.; SILVA, W. M.; FOLADOR, E. L.; MARIANO, D. C. B.; DE PAULA CASTRO, T. L.; BARBOSA, S.; DORELLA, F. A.; CARVALHO, A. F.; PEREIRA, F. L.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P.; AZEVEDO, V.; SILVA, A.; FOLADOR, A. R. C. Transcriptome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar Equi in two conditions of the environmental stress. **Gene**, v. 677, p. 349–360, nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.08.028>.

GUEDES, M. T.; SOUZA, B. C.; SOUSA, T. J.; LOUREIRO, D.; MOURA-COSTA, L. F.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 701–708, ago. 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000800001>.

GUIMARÃES, A. de S.; RIBEIRO, D.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B.; MIYOSHI, A.; GOUVEIA, A. M. G. CASEOUS LYMPHADENITIS: EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS, AND CONTROL. 2011. .

HARLYSTIARINI, H.; MUTIA, R.; WIBAWAN, I. W. T.; ASTUTI, D. A. In Vitro Antibacterial Activity of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Larva Extracts Against Gram-Negative Bacteria. **Buletin Peternakan**, v. 43, n. 2, 31 maio 2019. DOI 10.21059/buletinpeternak.v43i2.42833. Disponível em: <https://journal.ugm.ac.id/buletinpeternakan/article/view/42833>. Acesso em: 29 jun. 2025.

HODGSON, A. L. M.; TACHEDJIAN, M.; CORNER, L. A.; RADFORDT, A. J. Protection of Sheep against Caseous Lymphadenitis by Use of a Single Oral Dose of Live Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. v. 62, 1994. .

IBGE. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>.

JESSE, F.; LATIF, N.; CHUNG, E.; ADAMU, L.; SARAH, S.; ZAMRISAAD, M.; HARON, A.; LILA, M.; ZAKARIA, Z. Cytokines (IL 1beta and IL 6) Responses in Non-Pregnant Does Infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* Following Intradermal Route of Infection in Chronic State. **International Journal of Livestock Research**, v. 6, n. 6, p. 1, 2016. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20160613104909>.

JOLLY, R. D. Some Observations on Surface Lipids of Virulent and Attenuated Strains of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 29, n. 1, p. 189–196, abr. 1966. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03467.x>.

JUCKER, C.; LUPI, D.; MOORE, C. D.; LEONARDI, M. G.; SAVOLDELLI, S. Nutrient recapture from insect farm waste: bioconversion with *Hermetia illucens* (L.)(Diptera: Stratiomyidae). **Sustainability**, v. 12, n. 1, p. 362, 2020. .

KIM, S.; OH, D.-B.; KWON, O.; KANG, H. A. Identification and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*. **The journal of biochemistry**, v. 147, n. 4, p. 523–533, 2010. .

KOUTSOS, E.; MODICA, B.; FREEL, T. Immunomodulatory potential of black soldier fly larvae: applications beyond nutrition in animal feeding programs. **Translational Animal Science**, v. 6, n. 3, p. txac084, 1 jul. 2022. <https://doi.org/10.1093/tas/txac084>.

KUMAR, P.; LEE, J.-H.; BEYENAL, H.; LEE, J. Fatty Acids as Antibiofilm and Antivirulence Agents. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 753–768, set. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.014>.

KURUKULASURIYA, M.; SILVA, P.; PICHLER, R.; A.K, T.; RAMASAMY, S.; PERIASAMY, K. Population structure and genetic relatedness of Sri Lankan Jaffna Local sheep with major South Indian breeds. **Small Ruminant Research**, v. 206, p. 106571, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106571>.

LEAL, K. S.; DE OLIVEIRA SILVA, M. T.; DE FÁTIMA SILVA REZENDE, A.; BEZERRA, F. S. B.; BEGNINI, K.; SEIXAS, F.; COLLARES, T.; DELLAGOSTIN, O.; PORTELA, R. W.; DE CARVALHO AZEVEDO, V. A.; BORSUK, S. Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. **Vaccine**, v. 36, n. 25, p. 3578–3583, jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.049>.

LEE, J.; KIM, Y.-M.; PARK, Y.-K.; YANG, Y.-C.; JUNG, B.-G.; LEE, B.-J. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae enhances immune activities and increases survivability of broiler chicks against experimental infection of *Salmonella Gallinarum*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 5, p. 736–740, 2018. .

LLANCO, L. A.; NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M. J. Sialidase Production and Genetic Diversity in *Clostridium perfringens* Type A Isolated from Chicken with Necrotic Enteritis in Brazil. **Current Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 330–337, mar. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0722-5>.

LOPES BASTOS, B. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 01, n. S4, 2012. DOI 10.4172/2155-9899.S4-005. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/corynebacterium-pseudotuberculosis-immunological-responses-in-animal-models-2155-9899.S4-005.php?aid=4644>. Acesso em: 29 jun. 2025.

M. A. SAEED, E.; B. ALHARBI, K. Morel's Disease and Caseous Lymphadenitis: a Literature Review with Special Reference to Saudi Arabia. **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 7, n. 5, p. 76–86, 2014. <https://doi.org/10.9790/2380-07537686>.

MAGDY SELIM, A.; ATWA, S. M.; EL GEDAWY, A. A.; YOUNIS, E. E. Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in sheep of Dakhlia, Egypt. **Animal Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 1655–1660, 12 dez. 2022. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1928683>.

MARKOVA, J.; LANGOVA, D.; BABAK, V.; KOSTOVOVA, I. Ovine and Caprine Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* on Czech Farms—A Comparative Study. **Microorganisms**, v. 12, n. 5, p. 875, 27 abr. 2024. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050875>.

MATHEWOS, M.; FESSEHA, H. Cytopathological and bacteriological studies on caseous lymphadenitis in cattle slaughtered at Bishoftu municipal abattoir, Ethiopia. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 3, p. 1211–1218, maio 2022. <https://doi.org/10.1002/vms3.744>.

MAZINANI, M.; RUDE, B. Population, World Production and Quality of Sheep and Goat Products. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 15, n. 4, p. 291–299, 1 abr. 2020. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2020.291.299>.

MENZIES, Paula I; MUCKLE, C. A. The Use of a Microagglutination Assay for the Detection of Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Naturally Infected Sheep and Goat Flocks. 1989. .

MENZIES, P.I; HWANG, Y.-T.; PRESCOTT, J. F. Comparison of an interferon- γ to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1–2, p. 129–137, maio 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.012>.

MEZA-HERRERA, C. A.; NAVARRETE-MOLINA, C.; LUNA-GARCÍA, L. A.; PÉREZ-MARÍN, C.; ALTAMIRANO-CÁRDENAS, J. R.; MACÍAS-CRUZ, U.; DE LA PEÑA, C. G.; ABAD-ZAVALA, J. Small ruminants and sustainability in Latin America & the Caribbean: Regionalization, main production systems, and a combined productive, socio-economic & ecological footprint quantification. **Small Ruminant Research**, v. 211, p. 106676, jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106676>.

MOHAMED, H.; MARUSICH, E.; DIVASHUK, M.; LEONOV, S. A unique combination of natural fatty acids from *Hermetia illucens* fly larvae fat effectively combats virulence factors and biofilms of MDR hypervirulent mucoviscus *Klebsiella pneumoniae* strains by increasing Lewis acid–base/van der Waals

interactions in bacterial wall membranes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, p. 1408179, 2024. .

MOREIRA, L. S.; LOPES, N. D. R.; PEREIRA, V. C.; ANDRADE, C. L. B.; TORRES, A. J. L.; RIBEIRO, M. B.; FREIRE, S. M.; SANTOS, R. M. D.; D'ÁVILA, M.; NASCIMENTO, R. M.; MARCHIORO, S. B. The Association of Bacterin and Recombinant Proteins Induces a Humoral Response in Sheep against Caseous Lymphadenitis. **Vaccines**, v. 10, n. 9, p. 1406, 27 ago. 2022. <https://doi.org/10.3390/vaccines10091406>.

MOTTA, R. G.; CREMASCO, A. de C. M.; RIBEIRO, M. G. **Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção**. [S. l.]: Vet. e Zootec.; 17(2): 200-213., 2010.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 1982. .

MÜLLER, A.; WOLF, D.; GUTZEIT, H. O. The black soldier fly, *Hermetia illucens* – a promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 72, n. 9–10, p. 351–363, 26 set. 2017. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0030>.

NAMIRA, R. W. N.; AFIFAH, F. N.; PRATAMA, A. P. A. Bioconversion of black soldier fly (*Hermetia illucens*) on agricultural waste: Potential source of protein and lipid, the application (A mini-review). 2024. .

PARISE, D.; TEIXEIRA DORNELLES PARISE, M.; PINTO GOMIDE, A. C.; FIGUEIRA ABURJAILE, F.; BENTES KATO, R.; SALGADO-ALBARRÁN, M.; TAUCH, A.; ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO, V.; BAUMBACH, J. The Transcriptional Regulatory Network of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 415, 17 fev. 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020415>.

PASOTTO, D.; VAN EMMENES, L.; CULLERE, M.; GIACCONE, V.; PIETERSE, E.; HOFFMAN, L. C.; ZOTTE, A. D. Inclusion of *Hermetia illucens* larvae reared

on fish offal to the diet of broiler quails: Effect on immunity and caecal microbial populations. 2020. .

PEPIN, M.; CANNELLA, D.; FONTAINE, J.-J.; PITTET, J.-C.; LE PAPE, A. Ovine mononuclear phagocytes in situ: identification by monoclonal antibodies and involvement in experimental pyogranulomas. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 51, n. 2, p. 188–198, 1 fev. 1992. <https://doi.org/10.1002/jlb.51.2.188>.

PERIASAMY, K.; VAHIDI, S. M. F.; SILVA, P.; FARUQUE, M. O.; NAQVI, A. N.; BASAR, M.; CAO, J.; ZHAO, S.; THUY, L. T.; PICHLER, R.; PODESTA, M. G.; SHAMSUDDIN, M.; BOETTCHER, P.; GARCIA, J. F.; HAN, J.-L.; MARSAN, P. A.; DIALLO, A.; VILJOEN, G. J. Mapping molecular diversity of indigenous goat genetic resources of Asia. **Small Ruminant Research**, v. 148, p. 2–10, mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.12.035>.

RAMOS, C. P.; DORNELES, E. M. S.; HAAS, D. J.; VESCHI, J. L. A.; LOUREIRO, D.; PORTELA, R. D.; AZEVEDO, V.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P. Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. silvaticum*, and *C. auriscanis* by ERIC-PCR. **Ciência Rural**, v. 52, n. 11, p. e20210328, 2022. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210328>.

REZENDE, A. F. S.; BRUM, A. A.; BEZERRA, F. S. B.; BRAITE, D. C.; SÁ, G. L.; THUROW, H. S.; SEIXAS, F. K.; AZEVEDO, V. A. C.; PORTELA, R. W.; BORSUK, S. Assessment of the acid phosphatase CP01850 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit vaccine formulations against caseous lymphadenitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 1, p. 199–207, jan. 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10790>.

RUIZ, H.; FERRER, L. M.; RAMOS, J. J.; BASELGA, C.; ALZUGUREN, O.; TEJEDOR, M. T.; DE MIGUEL, R.; LACASTA, D. The Relevance of Caseous Lymphadenitis as a Cause of Culling in Adult Sheep. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1962, 24 out. 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10111962>.

RUZIN, A.; NOVICK, R. P. Equivalence of Lauric Acid and Glycerol Monolaurate as Inhibitors of Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. **Journal of**

Bacteriology, v. 182, n. 9, p. 2668–2671, maio 2000. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2668-2671.2000>.

SÁ, M. C. A. D.; SILVA, W. M. D.; RODRIGUES, C. C. S.; REZENDE, C. P.; MARCHIORO, S. B.; ROCHA FILHO, J. T. R.; SOUSA, T. D. J.; DE OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. D.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PORTELA, R. D.; CASTRO, T. L. D. P.; AZEVEDO, V.; SEYFFERT, N.; MEYER, R. Comparative Proteomic Analyses Between Biofilm-Forming and Non-biofilm-Forming Strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated From Goats. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 614011, 16 fev. 2021. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.614011>.

SÁ, M. D. C. A. D.; GOUVEIA, G. V.; KREWER, C. D. C.; VESCHI, J. L. A.; MATTOS-GUARALDI, A. L. D.; COSTA, M. M. D. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 265–268, 9 abr. 2013. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000013>.

SALAHUDDIN, M.; ABDEL-WARETH, A. A.; HIRAMATSU, K.; TOMBERLIN, J. K.; LUZA, D.; LOHAKARE, J. Flight toward sustainability in poultry nutrition with black soldier fly larvae. **Animals**, v. 14, n. 3, p. 510, 2024. .

SANTANA-JORGE, K. T. O.; SANTOS, T. M.; TARTAGLIA, N. R.; AGUIAR, E. L.; SOUZA, R. F. S.; MARIUTTI, R. B.; EBERLE, R. J.; ARNI, R. K.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; AZEVEDO, V. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 83, dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0479-6>.

SANTOS, R. G. D.; SEYFFERT, N.; DORNELES, E. M. S.; AGUIAR, E. R. G. R.; RAMOS, C. P.; HAAS, D. J.; ASSIS, G. B. N.; PORTELA, R. D.; GOES-NETO, A.; PACHECO, L. G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; SOUSA, T. D. J.; TIWARI, S.; JAISWAL, A. K.; LAGE, A. P.; CASTRO, T. L. P.; AZEVEDO, V. Exploring the MALDI Biotyper for the Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

biovar Ovis and Equi. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 33, n. 11, p. 2055–2062, 2 nov. 2022. <https://doi.org/10.1021/jasms.2c00174>.

SCHOLL, N. R.; SILVA, M. T. D. O.; BARBOSA, T. N.; DE PINHO, R. B.; ALVES, M. S. D.; PORTELA, R. W.; AZEVEDO, V. A. D. C.; BORSUK, S. Evaluation of the Association of Recombinant Proteins NanH and PknG from *Corynebacterium pseudotuberculosis* Using Different Adjuvants as a Recombinant Vaccine in Mice. **Vaccines**, v. 11, n. 3, p. 519, 23 fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030519>.

SELIM, A. M.; ATWA, S. M.; EL GEDAWY, A. A.; HEGAZY, Y. M.; RIZK, M. A.; YOUNIS, E. E. Risk factors associated with the seroprevalence of caseous lymphadenitis in sheep. **Comparative Clinical Pathology**, v. 30, n. 2, p. 285–291, abr. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00580-021-03198-0>.

SEPLAG/RS. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/ovinos>.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 50–55, fev. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.07.002>.

SHIGIDI, M. T. A. A Comparison of Five Serological Tests for the Diagnosis of Experimental *Corynebacterium ovis* Infection in Sheep. **British Veterinary Journal**, v. 135, n. 2, p. 172–177, 1979. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)32938-X](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)32938-X).

Silva, B. C. R., Lehen, C. R., & Marcato, S. M. (2024). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) as a protein ingredient in poultry feed. *World's Poultry Science Journal*, 80(4), 1123–1154. <https://doi.org/10.1080/00439339.2024.2384880>

SILVA, M. T. D. O.; BEZERRA, F. S. B.; DE PINHO, R. B.; BEGNINI, K. R.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; PORTELA, R. D.; AZEVEDO, V.; DELLAGOSTIN, O.; BORSUK, S. Association of *Corynebacterium pseudotuberculosis* recombinant proteins rCP09720 or rCP01850 with rPLD as immunogens in caseous lymphadenitis immunoprophylaxis. **Vaccine**, v. 36, n. 1, p. 74–83, jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.029>.

SILVA, M. T. de O.; PINHO, R. B. de; FONSECA, B. da R.; BEZERRA, F. S. B.; SOUSA, F. S. S.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; NASCIMENTO, R. J. M.; PORTELA, R. W.; AZEVEDO, V. A. C.; BORSUK, S. NanH and PknG putative virulence factors as a recombinant subunit immunogen against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Vaccine**, v. 38, n. 51, p. 8099–8106, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.010>.

SILVA, R. A. B.; BATISTA, M. C. S.; NASCIMENTO, C. B.; ALVES, R. P. A.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, M. S.; DINIZ, B. L. M.; CARDOSO, J. F. S.; PAULA, N. R. O. CARACTERIZAÇÃO ZOOSANITÁRIA DA OVINOCULTURA E DA CAPRINOCULTURA NA MICRORREGIÃO HOMOGÊNEA DE TERESINA, PIAUÍ, BRASIL. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 593–598, dez. 2011. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p5932011>.

SILVA, W. M.; DORELLA, F. A.; SOARES, S. C.; SOUZA, G. H. M. F.; CASTRO, T. L. P.; SEYFFERT, N.; FIGUEIREDO, H.; MIYOSHI, A.; LE LOIR, Y.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. A shift in the virulence potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis after passage in a murine host demonstrated through comparative proteomics. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 55, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0925-6>.

SIMÕES, J.; ABECIA, J. A.; CANNAS, A.; DELGADILLO, J. A.; LACASTA, D.; VOIGT, K.; CHEMINEAU, P. Review: Managing sheep and goats for sustainable high yield production. **Animal**, v. 15, p. 100293, dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100293>.

SINGH, B.; BARDHAN, D.; VERMA, M. R.; PRASAD, S.; SINHA, D. K. Estimation of economic losses due to Peste de Petits Ruminants in small ruminants in India. **Veterinary World**, v. 7, n. 4, p. 194–199, abr. 2014. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.194-199>.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. **Goat medicine**. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2022.

SOHIER, M. S.; SELIM, S. A.; BAKRY, M. A.; ELGABRY, E. A.; REHAB, M. A. COMPARISON OF PROTECTION AGAINST CASEOUS LYMPHADENITIS IN SHEEP INDUCED BY LOCAL ISOLATED STRAIN OF CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS BY TOXOID PLD & TOXOID PLD WITH BACTERIN VACCINE. 2017. .

SOTO, A.; ZAPARDIEL, J.; SORIANO, F. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 8, p. 756–759, 1 ago. 1994. <https://doi.org/10.1136/jcp.47.8.756>.

STEFAŃSKA, I.; GIERYŃSKA, M.; RZEWUSKA, M.; BINEK, M. Survival of Corynebacterium pseudotuberculosis within macrophages and induction of phagocytes death. 2010. .

SURENDRA, K.; TOMBERLIN, J. K.; VAN HUIS, A.; CAMMACK, J. A.; HECKMANN, L.-H. L.; KHANAL, S. K. Rethinking organic wastes bioconversion: Evaluating the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.))(Diptera: Stratiomyidae)(BSF). **Waste Management**, v. 117, p. 58–80, 2020. .

SVERGUZOVA, S. V.; SHAIKHIEV, I. H.; SAPRONOVA, Z. A.; FOMINA, E. V.; MAKRIDINA, Y. L. Use of fly larvae *Hermetia illucens* in poultry feeding: a review paper. **Journal of Water and Land Development**, n. 49, p. 95–103, 2021. .

SYAME, S. M.; ABUELNAGA, A. S. M.; IBRAHIM, E. S.; HAKIM, A. S. Evaluation of specific and non-specific immune response of four vaccines for caseous lymphadenitis in sheep challenged. **Veterinary World**, v. 11, n. 9, p. 1272–1276, set. 2018. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1272-1276>.

TEIXEIRA, A.; SILVA, S.; GUEDES, C.; RODRIGUES, S. Sheep and Goat Meat Processed Products Quality: A Review. **Foods**, v. 9, n. 7, p. 960, 20 jul. 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9070960>.

TER LAAK, E. A.; BOSCH, J.; BIJL, G. C.; SCHREUDER, B. E. C. Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 7, p. 1125–1132, 1 jul. 1992. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1992.53.7.1125>.

TERAB, A. M. A.; ABDEL WAHAB, G. E. D.; ISHAG, H. Z. A.; KHALIL, N. A. H.; EL TIGANI-ASIL, E. T. A.; HASHEM, F. M.; KHALAFALLA, A. I.; SHAH, A. A. M.; AL MUHAIRI, S. S. M. Pathology, bacteriology and molecular studies on caseous lymphadenitis in *Camelus dromedarius* in the Emirate of Abu Dhabi, UAE, 2015-2020. **PLOS ONE**, v. 16, n. 6, p. e0252893, 8 jun. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252893>.

TORKY, H. A.; SAAD, H. M.; KHALIEL, S. A.; KASSIH, A. T.; SABATIER, J.-M.; BATIHA, G. E.-S.; HETTA, H. F.; ELGHAZALY, E. M.; DE WAARD, M. Isolation and Molecular Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Association with Proinflammatory Cytokines in Caseous Lymphadenitis Pyogranulomas. **Animals**, v. 13, n. 2, p. 296, 14 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13020296>.

VALE, V. L. C.; SILVA, M. D. C.; DE SOUZA, A. P.; TRINDADE, S. C.; DE MOURA-COSTA, L. F.; DOS SANTOS-LIMA, E. K. N.; NASCIMENTO, I. L. D. O.; CARDOSO, H. S. P.; MARQUES, E. D. J.; PAULE, B. J. A.; NASCIMENTO, R. J. M. Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune response against a *C. pseudotuberculosis* strain. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 195, dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0811-8>.

VILCINSKAS, A. Evolutionary plasticity of insect immunity. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 2, p. 123–129, fev. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.08.018>.

VIMR, E. R. Microbial sialidases: does bigger always mean better? **Trends in microbiology**, v. 2, n. 8, p. 271–277, 1994. .

WILLIAMSON, L. H. Caseous Lymphadenitis in Small Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359–371, jul. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30033-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30033-5).

WINDSOR, P. A. Control of Caseous Lymphadenitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 193–202, mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.019>.

YAACOB, M. F.; MURATA, A.; NOR, N. H. M.; JESSE, F. F. A.; RAJA YAHYA, M. F. Z. Biochemical composition, morphology and antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biofilm. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 1, p. 101225, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.10.022>.

YITAGESU, E.; ALEMNEW, E.; OLANI, A.; ASFAW, T.; DEMIS, C. Survival Analysis of Clinical Cases of Caseous Lymphadenitis of Goats in North Shoa, Ethiopia. **Veterinary Medicine International**, v. 2020, p. 1–8, 17 ago. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8822997>.

YU, M.; LI, Z.; CHEN, W.; RONG, T.; WANG, G.; MA, X. *Hermetia illucens* larvae as a potential dietary protein source altered the microbiota and modulated mucosal immune status in the colon of finishing pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 50, dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0358-1>.

ZDYBICKA-BARABAS, A.; BULAK, P.; POLAKOWSKI, C.; BIEGANOWSKI, A.; WAŚKO, A.; CYTRYŃSKA, M. Immune response in the larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. **Invertebrate Survival Journal**, v. 14, n. 1, p. 9–17, 2017. .

ZIECH, R. E.; FARIAS, L. D.; ARDISON-ARAÚJO, D. M. P.; CAMARGO, G. M. F. D.; FREY, J.; VARGAS, A. C. D. Molecular characterization of virulence genes *cctA*, *nanA*, and *fliC* in *Clostridium chauvoei* from Rio Grande do Sul and São

Paulo State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, n. 5, p. e20181006, 2019.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20181006>.